



**L'origine mitochondriale de la défaillance cardiaque suite à une
hausse de température chez *Salvelinus alpinus* et *Salvelinus
fontinalis***

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en gestion de la faune et de ses habitats

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR
GABRIEL LEDUC

Décembre 2019

Composition du jury :

Magella Guillemette, président du jury, Université de Québec à Rimouski

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

Patrice Couture, examinateur externe, INRS-ete

Dépôt initial le 28 juin 2019

Dépôt final le 16 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.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada, Ressources Aquatiques Québec, Aquaculture Gaspésie Inc. et la Pisciculture des Monts de Bellechasse pour avoir offert un soutien financier, rendant le projet possible. Je remercie également Véronique Desrosiers, Felix Christen, Bernard-Antonin Dupont-Cyr, Amélie St-Pierre, Enrique Rodriguez, Alain Caron et Richard Cloutier, qui ont répondu à mes questions. Et finalement, je remercie Pierre Blier, qui a cru en moi et m'a ouvert un poste au sein de son laboratoire.

RÉSUMÉ

Certains chercheurs ont proposé que le stress oxydant est à l'origine de la défaillance cardiaque lors d'épisodes de stress thermique chez les ectothermes. Établir la relation entre la gestion du stress oxydant et la tolérance thermique des ectothermes permettrait de cibler des biomarqueurs de la tolérance thermique, un outil nécessaire dans un contexte où les changements climatiques vont redessiner l'aire de répartition des espèces. *Salvelinus fontinalis* et *Salvelinus alpinus* sont deux salmonidés adaptés aux températures froides, qui seront particulièrement affectés par les changements climatiques. Puisque ces espèces sont vulnérables face aux changements climatiques, nous avons récolté des spécimens de chacune des espèces, ainsi que des hybrides entre les deux espèces. Ces poissons ont été soumis à une épreuve thermique afin de mesurer leurs tolérances à la température. Après avoir soumis nos salmonidés à une augmentation graduelle de la température, nous nous sommes intéressés à plusieurs caractères physiologiques qui interviennent dans la gestion du stress oxydant ou dans la susceptibilité des membranes face au stress oxydant. Quatre enzymes ont été étudiées, soit la catalase, le glutathion peroxydase, le glutathion disulfide reductase et le superoxyde dismutase. L'astaxanthine, une molécule antioxydante qui se retrouve dans la diète des salmonidés ainsi que l'indice de peroxydation qui calcule la susceptibilité des lipides face au stress oxydant ont également été étudiés. Comme ces caractères interviennent dans la gestion du stress oxydant ou la résistance des membranes face au stress oxydant, ils pourraient représenter des biomarqueurs intéressants pour estimer la tolérance thermique chez des ectothermes comme *S. fontinalis* et *S. alpinus*. Deux de ces paramètres ont démontré une relation avec la tolérance thermique. L'activité de la catalase, une enzyme dont la fonction est de dégrader le peroxyde d'hydrogène en eau était positivement reliée à la tolérance thermique, alors que l'indice de peroxydation était négativement relié. Ces résultats proposent que le stress oxydant soit impliqué dans la défaillance cardiaque des ectothermes lors d'épisodes d'élévation de la température.

Mots clés : Stress oxydant, stress thermique, salmonidés, ERO, catalase, astaxanthine, indice de peroxydation

ABSTRACT

Some researcher postulated that oxidative stress causes heart failure during thermal stress episodes for ectotherms. Establishing the relationship between oxidative stress management and thermal resistance of ectotherms would identify thermal tolerance biomarkers, a necessary tool to understand the coming changes brought by global warming. *Salvelinus fontinalis* and *Salvelinus alpinus* are two salmonids adapted to cold water and will most likely be influenced by climate change. The study was conducted on oxidative stress management parameters. Four oxidative stress management enzymes were studied, catalase, glutathione peroxidase, glutathione disulfide reductase and superoxide dismutase. Astaxanthin, a singlet oxygen quencher, and peroxidation index, which determines lipids peroxidation sensitivity, were also studied. Since these characters are involved in oxidative stress management or the resistance of membranes toward oxidative stress, they might play a role as thermal tolerance biomarker. Two parameters showed a relationship to thermal tolerance. Catalase, which degrades hydrogen peroxide to water, showed a positive relationship, while peroxidation index, showed a negative relationship. These results propose that oxidative stress causes heart failure of ectotherms during rising temperature episodes.

Keywords: Oxidative stress, thermal stress, salmonid, ROS, catalase, astaxanthin, peroxidation index

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	vi
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
<i>Adaptation aux changements climatiques</i>	1
<i>Stress oxydant</i>	2
<i>Modèle de l'étude</i>	5
<i>Température maximum critique</i>	7
<i>L'étude</i>	8
INTRODUCTION	12
MATERIALS AND METHODS	13
<i>Fish breeding</i>	13
<i>Critical Thermal Maximum</i>	14
<i>Enzyme activities</i>	14
<i>Superoxide dismutase (SOD, EC: 1.15.1.1)</i>	15
<i>Catalase (CAT, EC: 1.11.1.6)</i>	15
<i>Glutathione peroxidase (GPx, EC: 1.11.1.9)</i>	15
<i>Glutathione disulfide reductase (GSR, EC: 1.8.1.7)</i>	15
<i>Protein concentration</i>	16
<i>Fatty acid transmethylation</i>	16
<i>Peroxidation index</i>	16
<i>Gas chromatographic conditions</i>	17
<i>Statistical analysis</i>	17
RESULTS	17
DISCUSSION	18

CONCLUSION	21
CONCLUSION GÉNÉRALE	22
<i>Adaptation.....</i>	22
<i>Tolérance thermique</i>	22
<i>Indice de peroxydation (PI)</i>	23
<i>Catalase (CAT)</i>	24
<i>Résultats non corrélés.....</i>	24
<i>Groupes de poissons</i>	26
<i>Astaxanthine</i>	26
<i>Perspectives</i>	27
ANNEXE I.....	28
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	32

LISTE DES TABLEAUX

Table 1 Statistical Analysis Results

LISTE DES FIGURES

Figure 1 CT_{max}'s Performance in Relationship to Catalase Activity

Figure 2 CT_{max}'s Performance in Relationship to Peroxidation Susceptibility

Figure 3 Catalase Activity per Fish's Group

Figure 4 CT_{max}'s Performance per Fish's Group

Figure 5 Superoxide Dismutase per Fish's Diet

Figure 6 Peroxidation Susceptibility per Fish's Group

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

¹O₂ Oxygène singulet (Singlet oxygen)

AGI Acide gras insaturé

AGS Acide gras saturé

ATP Adenosine Triphosphate Potassium

CAT Catalase

CT_{min} Minimum thermique critique

CT_{max} Maximum thermique critique (Critical Thermal Maximum)

Cu⁺ Ion cuivreux

ERO (ROS) Espèce réactive de l'oxygène (reactive oxygen species)

F₁ Hybride de première génération, hétérozygote à tous les locus

F₂ Hybride de deuxième génération

FAMES Fatty acid methyl esthers

Fe²⁺ Ion ferreux

GIEC Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat

GPx Glutathione peroxidase

GSH Glutathione réduit

GSR Glutathione disulfide reductase

GSSG Disulfure de glutathione

H₂O₂ Hydrogen peroxide

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES (suite)

H. chevalier Hybride dont la mitochondrie provient de *S. alpinus*

H. de fontaine Hybride dont la mitochondrie provient de *S. fontinalis*

KCN Cyanure de potassium

ADNmt ADN mitochondrial

ADNnuc ADN nucléaire

PI Peroxidation index

O₂⁻ Superoxyde

•OH Hydroxyl radical

S. alpinus Omble chevalier

S. fontinalis Omble de fontaine

SOD Superoxyde dismutase

SOD1 Superoxyde dismutase dont le complexe est cuivre/zinc et qui se situe dans le cytosol et l'espace intermembranaire

SOD2 Superoxyde dismutase dont le complexe est manganèse et qui se situe dans la mitochondrie

SOD3 Superoxyde dismutase extracellulaire dont le complexe est cuivre/zinc

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Adaptation aux changements climatiques

Le Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) a publié un rapport en 2018 stipulant que l'émission de gaz à effet de serre anthropique fera augmenter la température globale moyenne de 1,5 °C d'ici 2052. Bien que cette augmentation semble négligeable, elle pourrait avoir des conséquences importantes sur la distribution des espèces. Puisque la température interne des ectothermes dépend de celle de l'environnement, ces derniers sont particulièrement affectés par l'augmentation de la température. En effet, la capacité métabolique des organismes augmente avec la température jusqu'à un certain point, puis elle diminue rapidement. Cette diminution de la performance métabolique peut par la suite se traduire par une réduction de la croissance, du succès reproducteur et de la survie des individus (Schulte, 2015). Par ailleurs, l'optimum thermique varie en fonction des espèces et des populations (voir Lee et al 2003), ce qui laisse présager que le seuil de tolérance thermique pourrait varier selon les espèces et populations.

Pörtner et Knust (2007) ont émis l'hypothèse selon laquelle les seuils de tolérance thermique seraient causés par une perte de capacité de transport de l'oxygène de l'environnement aux tissus lors d'une augmentation de la température : "Oxygen and Capacity Limitation of Thermal Tolerance". Nous savons par exemple que l'augmentation de la température induit à la fois une hausse de la demande en oxygène des organismes aquatiques et une diminution de l'oxygène dissous dans l'eau (Zhou *et al.*, 2010). Ainsi, le seuil de tolérance thermique des organismes aquatiques serait atteint lorsque leur demande grandissante en oxygène excède la disponibilité de l'oxygène dissous dans l'eau ou la capacité de transporter celui-ci jusqu'aux tissus. Certains auteurs ont toutefois suggéré que l'augmentation de la température devrait faciliter la diffusion de l'oxygène, ce qui permettrait de contrebalancer la diminution de l'oxygène dissous dans le milieu (Verberk *et al.*, 2011). Iftikar et Hickey (2013) ont analysé la saturation en oxygène des hémoglobines de poissons soumis à une augmentation de température. Ils n'ont observé aucun impact de l'augmentation de température sur la saturation de l'hémoglobine, et ce

même aux températures auxquelles le rythme cardiaque devenait instable. Cette même étude a toutefois observé une hausse de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) dans les mitochondries cardiaques lorsque la température du milieu de réactionnel atteignait la température qui provoquait la défaillance cardiaque chez les individus. Bien que cette étude réfute que la disponibilité en oxygène soit le facteur limitant, elle met en évidence le rôle des DRO dans la détermination de la tolérance thermique des ectothermes.

Stress oxydant

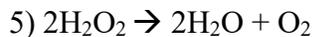
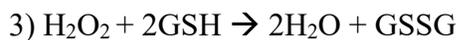
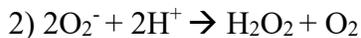
Une nouvelle hypothèse s'intéresse au rôle des DRO pour déterminer ce qui fixe la tolérance thermique chez les organismes (Blier *et al.*, 2014; Davidson *et al.*, 1996; Christen *et al.*, 2018). Bien que les DRO soient importants dans la signalisation cellulaire et la gestion de plusieurs fonctions, telles l'apoptose et l'inflammation, leur excès dans l'organisme peut entraîner la peroxydation des lipides, la carbonylation des protéines et endommager l'ADN (Hermes-Lima, 2004), ce qui peut induire une perte de l'homéostasie cellulaire. Afin de contrôler la concentration de DRO, les organismes disposent de divers mécanismes de défense. Leur tolérance aux attaques des DRO ainsi que leur capacité à se défendre contre leur excédent pourraient en partie expliquer à la fois le seuil et la variabilité de la tolérance thermique (Blier *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'accumulation de DRO dans la mitochondrie peut perturber son intégrité et ses fonctions métaboliques (Iftikar et Hickey, 2013). Plusieurs enzymes sont responsables de la gestion des DRO et maintiennent ceux-ci à des concentrations compatibles avec l'homéostasie générale de la cellule.

Les DRO peuvent prendre diverses formes : anion superoxyde (O_2^-), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), radical hydroxyle ($\bullet OH$), oxygène singulet (1O_2), etc. De nombreuses enzymes antioxydantes, qui assurent la défense de l'organisme face aux DRO, se sont, par conséquent, diversifiées afin de mieux les contrer: superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPx), catalase (CAT), etc. (Sies, 1997). Durant le processus normal de production de l'ATP, l' O_2 est l'accepteur final d'électrons (Cowan, 2004). Le NADH déshydrogénase (complexe I) est la première enzyme à intervenir dans le processus de transfert d'électrons vers l' O_2 [équation 1] (Weiss et al., 1987). Le complexe I est également un des principaux sites de production d' O_2^- , un radical libre très réactif avec une très courte demi-vie (Turrens, 1997). Certains auteurs suggèrent que si l' O_2^- n'est pas

rapidement mobilisé et neutralisé, il pourrait réagir avec les peroxydes organiques et produire l' $^1\text{O}_2$ (MacManus-Spencer, 2006). L' $^1\text{O}_2$, qui est très réactif, endommage les lipides, les protéines et l'ADN (Beutner *et al.*, 2001). Afin de prévenir, en partie, cette cascade de production de DRO, l'enzyme antioxydante SOD dismute l' O_2^- [équation 2], ce qui conduit à une production de H_2O_2 . Bien que ce dernier ne soit pas très réactif, sa capacité à traverser la membrane mitochondriale lui permet de contaminer d'autres parties de la cellule.

Dans les mitochondries, la GPx peut par la suite dégrader le H_2O_2 en eau grâce à l'oxydation du glutathion réduit (GSH) [équation 3]. Une autre enzyme, la glutathion disulfide reductase (GSR), régénère le GSH utilisé en réduisant le disulfure de glutathion (GSSG) [équation 4]. À l'extérieur des mitochondries et dans le cytoplasme, la CAT dégrade également le H_2O_2 [équation 5] (Radi *et al.*, 1991). Comme nous l'avons mentionné antérieurement, le H_2O_2 est un agent d'oxydation faible, mais sa capacité à traverser la membrane mitochondriale lui permet de se diffuser dans d'autres parties de la cellule, où il peut réagir avec des métaux de transition tels que l'ion ferreux (Fe^{2+}) et l'ion cuivreux (Cu^+) (Hashimoto *et al.*, 2013). Ces interactions conduisent alors à la production du radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) et de l'anion hydroxyde (HO^-) [équation 6]. Finalement, puisque $\bullet\text{OH}$ est extrêmement réactif, il réagit spontanément avec presque tout et peut causer la peroxydation des lipides (Hermes-Lima, 2004).

Équations



La peroxydation des lipides réduit l'intégrité structurale et fonctionnelle des membranes du cœur et peut donc conduire à un arrêt cardiaque (Röth *et al.*, 1985). Considérant l'impact de la température sur la production et la gestion des DRO et la susceptibilité des acides gras membranaires, il est facile de proposer un lien entre la peroxydation des lipides membranaires et la perte des fonctions cardiaques observée à hautes températures chez des espèces de salmonidés (Farrell, 2002). Une étude récente conduite par Christen *et al.* (2018) a également mis en évidence l'implication potentielle des DRO dans la perte fonctionnalité cardiaque chez un ectotherme (*Salvelinus fontinalis*) soumis à un stress thermique. Ceux-ci ont noté une augmentation importante de la production de H₂O₂ par les mitochondries du cœur lorsque la température avoisinait le seuil de tolérance thermique maximal. Ces résultats suggèrent donc que les DRO pourraient être à l'origine de l'effondrement général (et dans le cœur) chez *S. alpinus*, lors d'un stress thermique. Cette espèce constitue donc un excellent modèle pour tenter d'établir un lien entre la susceptibilité des membranes, la tolérance au stress oxydant du cœur et le seuil de tolérance thermique.

Il existe différentes formes d'acides gras associés aux phospholipides membranaires, entre autres les acides gras saturés (AGS) et acides gras insaturés (AGI). Ces derniers comprennent divers niveaux d'insaturation, lesquels sont importants, puisqu'ils déterminent le degré de susceptibilité des lipides face à la peroxydation. Cette susceptibilité augmente avec le niveau d'insaturation (Holman, 1954). L'indice de peroxydation (PI) confère une valeur de susceptibilité à chaque type d'acides gras. Lorsque nous connaissons la composition d'une membrane en termes de proportion des différents acides gras qu'elle contient, nous sommes en mesure de calculer un indice de peroxydation général de la membrane et donc sa susceptibilité aux attaques des DRO.

Calcul PI

$$\text{PI} = 0,025 \times (\% \text{monoenoics}) + 1 \times (\% \text{dienoics}) + 2 \times (\% \text{trienoics}) + 4 \times (\% \text{tetraenoics}) + 6 \times (\% \text{pentaenoics}) + 8 \times (\% \text{hexaenoics})$$

Outre la résistance des membranes face à la peroxydation et le système interne de gestion des DRO qui peuvent moduler l'impact des DRO, l'alimentation peut procurer une source d'antioxydants qui assurent une certaine protection. C'est le cas de l'astaxanthine, de la famille des caroténoïdes, qui se retrouve naturellement dans l'alimentation de certains salmonidés et confère à leur chair la couleur rosée (Torrissen, 1986).

À la lumière de ces faits, la complexité du système de gestion des DRO implique que plusieurs paramètres peuvent jouer à différents niveaux pour influencer la tolérance thermique d'un individu. Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes donc intéressés à quatre enzymes impliquées dans la détoxification des DRO (SOD, CAT, GPx et GSR) ainsi qu'à l'astaxanthine. Dans cette optique, les mesures des activités enzymatiques ont été effectuées à 15 °C, afin de nous rapprocher de la température optimale des poissons. L'objectif était de comparer l'activité des différentes enzymes entre les salmonidés et de corrélérer ces quantités aux seuils de tolérance thermique mesurés chez chacun des poissons. Les mesures effectuées à 15 °C assuraient une bonne précision à une température se situant dans la gamme rencontrée par l'organisme. Nous avons également estimé la susceptibilité des membranes lipidiques face à la peroxydation en caractérisant le profil d'acides gras de ces membranes et en calculant leur indice de peroxydation (PI).

Modèle de l'étude

Deux espèces de salmonidés ont été choisies comme modèles : *S. alpinus* et *S. fontinalis*, deux espèces de poissons nordiques. Soulignons qu'elles ont la capacité de vivre en eau douce ou en eau salée (Roberts, 2000; Pêches et Océans Canada, 2015) et possèdent une croissance optimale à 15,4 °C chez les deux espèces (McCormick *et al.*, 1972; Elliott et Elliott, 2010). Cependant, ces valeurs varient beaucoup d'une étude à l'autre, puisque l'alimentation joue un rôle important dans la croissance (Elliott et Hurley, 2000). La diète des deux salmonidés est assez variée et contient notamment des crustacés, qui peuvent s'avérer une source d'astaxanthine significative (Roberts, 2000; Grainger, 1952). Ces deux espèces revêtent également une grande importance économique. *S. fontinalis* est généralement élevé à des fins d'ensemencement pour la pêche sportive (Roberts, 2000) et son élevage est un des plus considérables chez les poissons d'eau douce du Canada (Pêches et Océans Canada, 2017). L'élevage de *S. alpinus* est une industrie plus

jeune, mais en pleine expansion. Comme il s'agit d'une espèce adaptée aux eaux plus froides, son élevage dans le nord canadien est bien adapté. Contrairement à *S. fontinalis*, *S. alpinus* est élevé à des fins de commercialisation pour la consommation humaine (Pêches et Océans Canada, 2015).

Bien que *S. alpinus* soit l'espèce la plus nordique des deux, leurs aires de répartition se chevauchent à certains endroits où des hybrides naturels ont été observés (Bernatchez *et al.*, 1995). Une hybridation interspécifique peut induire soit une réduction ou une augmentation de la valeur adaptative. Dans le deuxième cas nous parlons de vigueur hybride. La vigueur hybride peut d'ailleurs être induite par deux phénomènes : l'avantage hétérozygote et la valeur de la recombinaison. L'avantage hétérozygote réfère à une interaction bénéfique d'allèles hétérosécifiques d'un seul locus, tandis que la valeur de la recombinaison met à profit une interaction bénéfique d'allèles hétérosécifiques de différents locus (Fitzpatrick et Schaffer, 2007). La valeur de la recombinaison peut s'expliquer par l'épistasie, interaction d'un ou de plusieurs gènes qui masquent ou modifient l'expression de facteurs situés à d'autres locus, ou par l'effet complémentaire d'allèles avantageux de différents locus de chaque population parentale. Un hybride possédant les deux gènes supérieurs aura par le fait même une valeur adaptative supérieure à ses deux parents (Fitzpatrick et Schaffer, 2007). Lorsque la vigueur hybride résulte de la valeur de la recombinaison, l'hérédité de la vigueur hybride est plus aisée puisque l'hybride peut transmettre ses deux gènes supérieurs qui proviennent de locus différents. D'un autre côté, si elle découle de l'avantage hétérozygote, elle peut s'estomper rapidement puisque la vigueur hybride est tributaire d'une association de deux allèles au même locus, et que l'hybride ne sera en mesure de transmettre qu'un seul de ces allèles à la fois à chacun de ses descendants (Fitzpatrick et Schaffer, 2007).

Dans le cas d'une réduction de la valeur adaptative des hybrides, l'interaction génomique a été mise en cause pour expliquer ce phénomène. La mitochondrie possède son propre ADN (ADNmt) qui, contrairement à l'ADN nucléaire (ADNnuc), est hérité strictement de la mère. L'ADNmt évolue plus rapidement que l'ADNnuc (Burton *et al.*, 2013) et l'ADNnuc doit s'adapter afin de maintenir les fonctions mitochondriales optimales (Osada et Akashi, 2012). Conséquemment, l'hybridation peut causer une rupture

au niveau de cette coadaptation entre l'ADNmt et l'ADNnuc qui serait à l'origine d'une réduction de la valeur adaptative des mitochondries.

Les mitochondries qui assurent la production aérobie de l'ATP sont constituées d'environ 1000 protéines (peptides) différentes dont 13 sont codées par le génome mitochondrial chez les vertébrés (Blier et al 2001, Calvo et Mootha, 2010). Les processus de transcription, de traduction et de réplication du génome mitochondrial sont principalement pris en charge par l'ADNnu (Lane, 2011; Burton et al., 2013). La recombinaison de l'ADN entre deux populations distinctes peut donc conduire à un bris au niveau des coadaptations entre l'ADNnuc (recombiné) et l'ADNmt (hérité maternellement). Les hybrides de première génération (F₁) sont hétérozygotes et possèdent nécessairement un allèle compatible à l'ADNmt, alors que chez ceux de deuxième génération (F₂), l'homozygotie peut survenir et imposer à certains locus d'allèles nucléaires non adaptés au génome mitochondrial rencontré. Les ruptures de coadaptations mitonucléaires sont donc plus apparentes chez les F₂ (Burton *et al.*, 2013), mais peuvent quand même être manifeste chez des hybrides F₁. Dans notre étude, peu importe que les hybrides possèdent une valeur adaptative supérieure (vigueur hybride) ou inférieure (rupture mitonucléaire), leur inclusion a pour objectif d'enrichir la variabilité génétique et phénotypique mitochondriale. Nous nous attendons à obtenir une plus grande variabilité dans la composition membranaire, l'induction du stress oxydant mitochondrial et la réponse à un stress thermique et ainsi une plus grande capacité à établir des liens entre ces paramètres.

Température maximum critique

Afin de déterminer la tolérance thermique des organismes, la température critique est souvent utilisée, que ce soit la température critique maximale (CT_{max}) ou la température critique minimale (CT_{min}). La mesure du CT_{max}, demande d'abord d'acclimater les poissons à une température de départ, puis de l'augmenter de façon contrôlée et graduelle jusqu'à l'atteinte de la perte de fonction ou de régulation physiologique (spasme musculaire, perte d'équilibre, évanouissement, etc) (Kingsolver et Umbanhowar, 2018). Ces tests sont en général répétables et offrent une méthode rapide pour définir un seuil de tolérance thermique chez les individus (Kingsolver et Umbanhowar, 2018).

L'étude

L'objectif de ce projet est d'évaluer le rôle de la gestion du stress oxydant dans la détermination de la tolérance thermique (CT_{max}). Pour mesurer la sensibilité des individus aux changements de température, nous avons effectué des tests de tolérance thermique sur quatre groupes de poissons différents : *S. fontinalis*, *S. alpinus*, des hybrides de première génération dont la mitochondrie est héritée de *S. fontinalis* (H. de fontaine) ou de *S. alpinus* (H. chevalier). En menant l'étude sur deux espèces différentes et leurs hybrides, nous augmentons la variabilité génétique et phénotypique, ce qui facilite l'établissement de liens entre ces caractères phénotypiques et les seuils de tolérances thermiques individuels. Chaque groupe a été nourri avec deux diètes différentes, soit des individus qui ont reçu une diète non enrichie en astaxanthine (AW0) et d'autres qui ont reçu une diète enrichie à 80 mg d'astaxanthine (AW8). Par conséquent, nous avons pu observer l'effet d'antioxydants exogènes sur la tolérance thermique d'organismes qui y ont naturellement accès.

Les poissons ont été acclimatés à une température de 10 °C pour une période minimale de 12 mois. Ils ont ensuite été soumis à une augmentation rapide de la température, passant de 10 °C à 20 °C à l'intérieur d'une période de 2,5 heures. Par la suite la température a été augmentée de 2 °C par heure. Lorsqu'un poisson perdait l'équilibre, il était sorti du bassin et déposé dans un autre bassin dont la température était maintenue à 10 °C. Deux données ont alors été prélevées pour chaque poisson: la durée de l'expérience et la température atteinte. Finalement, les analyses statistiques utilisaient la durée de l'expérience comme variable dépendante. Afin de retirer l'effet de la masse des poissons, tous nos paramètres (CAT, SOD, GPx, GSR, PI, astaxanthine, durée du test) ont été transformés en résidus avec la masse des poissons comme variable indépendante.

Puisque le cœur est soupçonné d'être l'organe qui succombe lors d'épisodes de stress thermique (Farrell, 2002), nous l'avons prélevé de tous les poissons, et préservé à -80 °C avant de le pulvériser dans l'azote liquide. Le ventricule a été conservé à -80 °C afin de dresser par la suite le profil lipidique et de mesurer la susceptibilité des lipides face aux DRO (PI). L'activité des enzymes antioxydantes (GPx, GSR, CAT et SOD) a été mesurée dans les échantillons de cœur qui restaient après le prélèvement du ventricule et qui était également conservé à -80°C.

Notre hypothèse est que le seuil de tolérance thermique est dicté par la tolérance du cœur au stress oxydant.

Nos prédictions sont :

- 1) *S. fontinalis*, l'espèce dont l'aire de distribution est la plus au sud, résistera plus longtemps à l'épreuve thermique et possédera un profil lipidique moins susceptible à la peroxydation de même que des enzymes antioxydantes dont l'activité sera plus élevée que *S. alpinus*, l'espèce la plus nordique.
- 2) Les poissons qui ont été nourris avec un aliment enrichi en astaxanthine résisteront plus longtemps durant le test de tolérance thermique que ceux qui ont été nourris avec une moulée non enrichie en astaxanthine.
- 3) L'activité des enzymes antioxydantes (CAT, SOD, GPx et GSR) sera positivement corrélée à la durée du test de tolérance thermique, alors que l'indice de peroxydation sera négativement corrélé à cette durée.

CHAPITRE 1
L'INTÉGRITÉ CARDIAQUE
DURANT LES ÉPISODES DE STRESS THERMIQUE
CHEZ *SALVELINUS ALPINUS* ET *SALVELINUS FONTINALIS*

Résumé

Les espèces réactives de l'oxygène, et le stress oxydant, ont été proposé comme étant à l'origine de la défaillance cardiaque chez les ectothermes lorsqu'ils sont exposés à une augmentation rapide de la température (stress thermique). Les organismes aérobies ont développé plusieurs stratégies de défense face aux dérivés réactifs de l'oxygène. Parmi ces défenses se trouvent les enzymes antioxydantes, la résistance des membranes lipidiques, et l'alimentation. Des salmonidés, *Salvelinus alpinus* et *Salvelinus fontinalis*, ont été nourris avec de la moulée enrichie en astaxanthine, une molécule antioxydante. Ils ont été comparés à un groupe contrôle, des salmonidés nourris avec une moulée non enrichie en astaxanthine. L'activité enzymatique antioxydante du cœur a été mesurée (catalase, glutathione peroxydase, glutathione réductase, superoxyde dismutase) et l'indice de peroxydation a été calculé. Afin de vérifier la relation entre ces paramètres et la tolérance thermique, les salmonidés ont subi une épreuve de Maximum Thermique Critique. La catalase et l'indice de peroxydation ont démontré une relation significative avec la tolérance thermique des salmonidés, alors que les autres biomarqueurs (SOD, GPx, GSR, astaxanthine), n'ont démontré aucune relation. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle le stress oxydant induit une crise cardiaque durant les épisodes de stress thermiques.

Mots clés : Stress oxydant, stress thermique, salmonidés, ERO, catalase, astaxanthine, indice de peroxydation

HEART INTEGRITY DURING THERMAL STRESS
IN *SALVELINUS ALPINUS* AND *SALVELINUS FONTINALIS*

Abstract

Reactive oxygen species and oxidative stress are suspected to be involved in ectotherm's heart failure at upper limit during thermal stress. The capacity to tolerate (membrane lipid resistance to peroxidation) or buffer (antioxidant enzymes) this oxidative stress should therefore correlate with the response to this thermal stress. To test this prediction, we determined CT_{max} of salmonid fishes (artic char, brook char and their hybrids). The fatty acid profiles and antioxidant enzymes activities were evaluated in the heart of the same fish. Catalase activity was positively correlated to salmonid's thermal resistance, and membrane robustness (estimated by calculating the Peroxidation Index, an index of susceptibility of lipids to peroxidation) was negatively correlated to salmonid's thermal resistance, while the other biomarkers (SOD, GPx, GSR, astaxanthine) did not correlate. Catalase is an antioxidant enzyme that transform hydrogen peroxide into water and oxygen, while lipid peroxidation is caused by hydrogen peroxide. These results support the hypothesis that oxidative stress is directly involved in heart failure during thermal stress.

Key words: Oxidative stress, thermal stress, salmonid, ROS, catalase, astaxanthine, peroxidation index

INTRODUCTION

Environmental temperature can be highly variable in different habitats and ectotherms developed different strategies to cope with these temperature fluctuations. The variations of high amplitude can however lead to thermal limits, eventually resulting in death (Richter *et al.*, 2010). It has been speculated that heart could be the first organ to fail at higher temperatures, since ATP production appears to be undermined at high temperature exposure (Farrell, 2002, Iftikar and Hickey, 2013). Heart activity is essentially supported by mitochondrial respiration which generates ATP (Harris and Das, 1991). Christen *et al.* (2018) observed that mitochondrial respiration and Reactive Oxygen Species (ROS) production were negatively correlated, proposing that ATP production efficiency might reduce ROS production. While ROS are now considered as important metabolites that can modulate important cellular functions such as apoptosis, cell differentiation and wound healing (Munro and Treberg, 2017), excess of ROS can lead to oxidative damage. The antioxidant defense therefore likely evolved to maintain ROS at concentrations appropriate with maintenance of cell homeostasis (Munro and Treberg, 2017). When these antioxidant defences are outstripped, lipids peroxidation, proteins carbonylation and DNA damage are the most documented deleterious effects of the resulting ROS excess (Hermes-Lima, 2004). Inside the heart, oxidative damage can alter ion transport, calcium cycling and muscle contractibility (Marin-Garcia *et al.*, 2013). These are suspected to play a role in heart failure (Marks, 2013, Choudhary and Dudley, 2002). Blier *et al.* (2014) also postulated that extreme temperatures could induce loss of mitochondrial functions leading to lower efficiency to generate ATP and higher production of ROS.

Christen *et al.* (2018) showed that high temperature induces metabolic impairment and a rise in ROS production in heart mitochondria of *Salvelinus alpinus*, which concurs with their upper temperature limit. These results hint at ROS inducing heart failure during thermal stress, emphasising that antioxidant defenses might lead to an improvement of thermal tolerance. To challenge the hypothesis of ROS involvement in heart failure we propose to test the relationship between antioxidant defenses, the susceptibility of membranes to the attack of ROS and response to a temperature challenge test.

To determine critical thermal maximum (CT_{max}), four groups of salmonids were subjected to a modified thermal challenge test (Roze *et al.*, 2013): Arctic charr (*Salvelinus alpinus*), brook charr (*Salvelinus fontinalis*) and their two hybrids: H. arctic charr and H. brook charr, named after their mother lineage. Both *S. alpinus* and *S. fontinalis* are adapted to cold environment, with *S. alpinus* being the northernmost (MacCrimmon and Campbell, 1969). Their distribution overlaps and natural hybrid zones exist (Bernatchez *et al.*, 1995). First generation hybrids are heterozygous and show high genetic variability, which might help detecting weak signals that a research focussed on one species might not detect (Pereira *et al.*, 2013).

The fish were separated into two groups, one receiving an enriched diet containing 80mg/kg of Astaxanthin (AX), an exogenous antioxidant, and a control group fed a diet without AX. Afterwards, the peroxidation index (PI) of lipids extracted from heart was determined. PI is calculated from fatty acid profiles and is used to evaluate lipid peroxidation susceptibility. Finally, antioxidant enzyme activity; superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione disulfide reductase (GSR) were measured. We then predicted that 1) *S. fontinalis*, the southernmost species, will perform better during the thermal challenge test; 2) Astaxanthin-enriched fed fish will perform better during the thermal challenge test, and 3) CAT, SOD, GPx and GSR will show a positive relationship and PI a negative relationship in response to the thermal challenge test.

MATERIALS AND METHODS

Fish breeding

Fish were provided by Pisciculture des Monts de Bellechasse (Saint-Damien-de-Buckland, QC, Canada). Eggs were fertilized on November 2011 and led to 4 groups *S. alpinus* (n=14), *S. fontinalis* (n=13), and their hybrids. Since mitochondrial DNA is maternally inherited, both hybrid groups have been named depending on their mitochondrial DNA inheritance: H. arctic charr (n=12) or H. brook charr (n=14). The fertilized eggs were sent to Aquaculture Gaspésie INC (Francis Dupuis, Gaspé, QC, Canada). Fish were later transported to the Université du Québec à Rimouski's aquatic

facilities and placed in 190 L rectangular tanks under natural photoperiod. Open circuit dechlorinated freshwater was supplied at 10 °C with a renewal rate of 0.7L/min. All individuals were subcutaneously tagged and identified using passive integrated transponders (PIT-Tag, Biomark, ID, USA). Each group were further subdivided in 2 groups: 1) fed with astaxanthin-free diet and 2) fed with astaxanthin-enriched diet (80 mg/kg). Fish were fasted 24 h prior to analysis. All experiments were authorized by the local animal ethics committee in accordance with the Canadian Council on Animal Care.

Critical Thermal Maximum

Critical Thermal Maximum's protocol (CT_{max}) was adapted from Roze *et al.* (2013). Fish were acclimated to 10 °C for at least 12 months prior to experiments. The temperature challenge began with a fast increase from 10 °C to 20 °C within 2.5 hours, then the temperature was raised by 2 °C every hour until the end of the experiment. As soon as fish lost balance, they were collected from the experimental tank and sent back to a rest tank with water kept at 10 °C. Fish were identified (PIT-tag reading), the duration of the experiment and the temperature achieved were recorded. Two temperature regulators TECO TR15 (TECO, Ravenna, Italy) equipped with 400 W water heaters controlled the temperature of water during the experiment, while 2 EHEIM pumps (EHEIM, Deizisau, Germany) assured water homogeneity. During the experiment, oxygen was constantly maintained over 80% saturation.

Enzyme activities

Fish were sacrificed by a blow to the head, hearts were quickly extracted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Before enzymatic activity assays, tissues were homogenized using pestles in the following buffer: Trisma 100 mM, Triton X100 0.1%, pH 7.8. The homogenates were centrifuged at 1500 g for 5 min at 4 °C and the supernatant was collected for analysis. Enzyme assays were conducted using a microplate reader PowerWave XS2 (Biotek, Highland Park, USA) in a cold room kept at 15 °C. Specific assays conditions were the following:

Superoxide dismutase (SOD, EC: 1.15.1.1)

The SOD's assay was adapted from Malstrom *et al.*, (1975). SOD was compared to a standard curve of known SOD concentrations in the following reaction medium: Trisma 45 mM, DTPA 0.08 mM, Hypoxanthine 0.08 mM, phosphate potassium 4 mM, Xanthine oxydase 0.0326 U/ml (substrat), Radical detector (Cayman chemical) 0.002%, Tween 20 0.004%. After a 30 minutes incubation period, the reading was performed at 450 nm.

Catalase (CAT, EC: 1.11.1.6)

Catalase was measured by following H₂O₂ removal at 240 nm for 1 minute, assuming a 43.6 cm ml⁻¹ umol⁻¹ extinction coefficient. The reaction medium was: Phosphate potassium 100 mM, H₂O₂ 60 mM, Triton X100 0.1%, pH 7.5 (Orr and Sohal, 1992).

Glutathione peroxidase (GPx, EC: 1.11.1.9)

Glutathione peroxidase was measured by observing NADPH removal at 340 nm , assuming a 6.2 cm ml⁻¹ umol⁻¹ extinction coefficient, in the following reaction medium: Phosphate potassium 100 mM, EDTA 0.1 mM, Sodium azide 3 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 0.2 mM, Tert-butylhydroperoxide 0.5 mM, Glutathione reductase 0.24 U/ml, Triton X100 0.2%, pH 7.6. A control without the Tert-butylhydroperoxide was used (Munro *et al.*, 2016).

Glutathione disulfide reductase (GSR, EC: 1.8.1.7)

Glutathione disulfide reductase was measured by observing NADPH removal at 340 nm, assuming a 6.2 cm ml⁻¹ umol⁻¹ extinction coefficient in the following reaction medium: Phosphate potassium 100 mM, EDTA 0.1 mM, NADPH 0.1 mM, GSSG 2 mM, Triton X100 0.2%, pH 7.6. A control without GSSG was used (Munro *et al.*, 2016).

Protein concentration

Protein was quantified using the Bicinchoninic acid protein assay (Smith *et al.*, 1985). Homogenate's protein concentration was compared to a standard curve of known protein concentration (bovine serum albumin).

Fatty acid transmethylation

A protocol adapted from Lepage and Roy, 1984 already applied in Ekström *et al.*, (2017) was used in the current experiment. At least 50 mg of heart tissue (N~15 per strain) were homogenized in 100mM potassium phosphate buffer (1mM EDTA, pH 7.5) spiked with 0.1 mg of internally added tridecanoic and tricosanoic acid (Nu-Check Prep, Elysian MN, USA). Direct acid-catalyzed trans-methylation was performed adding 3ml of 3% sulfuric acid methanol solution at 90 °C for 1h. In order to prepare fatty acid methyl esters (FAME), samples were cooled to 4 °C, 5ml of H₂O and 1ml of hexane were added and the sample was vortexed and centrifuged at 3000 g for 10 min at room temperature. Hexane was evaporated, and the sample was suspended in 100µl toluene prior to injection. FAME were separated and quantified by gas chromatography (Trace Ultra 100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a 60 m x 0.25mm i.d. capillary column (DB-23, Agilent Technologies Canada, Mississauga, ON, Canada). Helium was used as a carrier gas (230 kPa constant pressure) and temperature vaporization was set at 230 °C with split injection of 100ml min⁻¹. Temperature programming was from 50 to 140 °C (25 °C min⁻¹), 140 to 195 °C (3 °C min⁻¹) and a final increase of 4 °C min⁻¹ up until 225 °C maintained for 5 min. Individual methyl esters were identified by comparison with known standards. All chemicals have been purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise mentioned.

Peroxidation index

The peroxidation index reflects the susceptibility of phospholipid fatty acids to peroxidative damage and is calculated according to Hulbert *et al.* (2007) as:

$$PI = 0.025 \times (\% \text{monoenoics}) + 1 \times (\% \text{dienoics}) + 2 \times (\% \text{trienoics}) + 4 \times (\% \text{tetraenoics}) + 6 \times (\% \text{pentaenoics}) + 8 \times (\% \text{hexaenoics})$$

Gas chromatographic conditions

FAMEs were separated and quantified by gas chromatography (Trace Ultra 100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using a 60 m × 0.32 mm i.d. capillary column (DB-23, Agilent Technologies Canada, Mississauga, ON, Canada). Helium was used as carrier gas (230 kPa constant pressure) and temperature vaporization was set at 230 °C with a split injection of 100 ml min⁻¹. The thermal protocol was programmed to increase the temperature from 50 to 140 °C at a rate of 25 °C min⁻¹, followed by an increase (heating rate: 3.0 °C min⁻¹) to 195 °C, at which the temperature was maintained for 5 min, followed by a final increase to 225 °C (heating rate: 4.0 °C min⁻¹) which was maintained for 5 min. Individual methyl esters were identified by comparison with known standards (Supelco 37 Component FAME mix and GLC-569).

Statistical analysis

R software (R Core Team, 2017) was used to process the statistical analysis. All data were residual transformed to take away the impact of mass, which is known to influence the thermal resistance. Analyse of variance has been used to investigate the effect of salmonid lines and diet on each parameter: PI, CAT, SOD, GPx, GSR and thermal challenge performance. Linear regressions were used to investigate the relationship between each parameter: PI, CAT, SOD, GPx, GSR and CT_{max} (time), which always acted as the dependent variable. Table 1 shows the result of every statistical analysis conducted. The relationship between PI and time to CT_{max} was also analyzed using general linear models (GLM) with mass as a covariate and AC, BC, HA and HB as group identity, no interaction was detected (p value = 0.29).

RESULTS

Mass had a significant impact on CT_{max} (p value = 0.017), therefore we removed the mass effect by using the residual of each variable with the mass. CT_{max} showed a positive relationship with CAT (p value < 0.01) (Figure 1), and a negative relationship with PI (p value = 0.01352) (Figure 2), while SOD, GPx and GSR did not show any significant relationship with CT_{max}.

Extracting mass effect, charr groups expressed significant differences in CT_{max} (p value < 0.01), where *S. fontinalis* expressed the highest average CT_{max}, *S. alpinus* showed

the lowest CT_{max} and both hybrid groups showed intermediate performance compared to parental groups. CAT activity varied among char lines (p value < 0.01) (Figure 3), where *S. fontinalis* showed the highest activity, *S. alpinus* showed the lowest and both hybrid lines showed intermediate activity compared to both parental groups. The peroxidation index also varied among char lines (p value < 0.01) (Figure 4), where *S. alpinus* showed the highest susceptibility and *S. fontinalis* and both hybrid lines showed lower susceptibility. Astaxanthin content in the food had no significant impact on temperature challenge test performance (p value = 0.269) (Table 1), but it significantly affected SOD activity (p value = 0.0139) (Figure 5), with groups fed with astaxanthin-enriched diet expressing lower SOD activity. Fish groups showed significant difference regarding their thermal tolerance (Figure 6), the temperate adapted species (*S. fontinalis*) performed better during the CT_{max} test than the cold adapted species (*S. alpinus*), while both hybrid groups showed intermediate thermal tolerance compared to both parental lines.

DISCUSSION

High activity of catalase in heart might improve thermal tolerance of salmonids such as *S. alpinus* and *S. fontinalis* [Figure 1]. Cassini et al. (1993), observed that heart's catalase activity of *Zosterisessor ophiocephalus*, a mediterranean fish, was significantly higher than *Pagothenia bernacchii*, an antarctic fish. Catalase degrades hydrogen peroxide (H_2O_2) to water and oxygen and is localized primarily in the peroxisome (Chance *et al.*, 1979) and occasionally in mitochondria. Madeira *et al.* (2013) observed, in some fish species, that catalase activity is positively correlated with malondialdehyde (TBARS) which might indicate that lipid peroxidation products induces catalase gene expression. Hydrogen peroxide has been proposed to interact with transition metals, such as ferrous ion (Fe^{2+}) and cuprous ion (Cu^+), leading to hydroxyl radical ($\bullet OH$) production (Halliwell, 1978 and Hashimoto *et al.*, 2013). $\bullet OH$ is very short-lived, and can cause, among other deleterious effect, lipid peroxidation (Hermes-Lima, 2004). Capacity to buffer hydrogen peroxide can therefore be a condition to support bursts of oxidative stress. Glutathione peroxidase also acts as a H_2O_2 scavenger, its intracellular distribution (mitochondria and cytosol) and its low reaction rate constant makes it the dominant H_2O_2 scavenger under normal conditions. At higher H_2O_2 concentration catalase contribution becomes dominant

(Chance *et al.*, 1979). As was discussed by Munro and Treberg (2017), thermal stress might increase H₂O₂ production to level where catalase is the dominant H₂O₂ scavenger.

Peroxidation susceptibility seems to corroborate the link between ROS tolerance or management and resistance to thermal stress [Figure 2]. Membrane lipid composition has been described as the most common adaptation to temperature. Evidence suggests that membrane lipid's state phase contributes to thermal limits of growth and function. Unsaturated fatty acids were proposed as an adaptation to cold temperature (Hazel, 1995, Hazel, 1988). Furthermore, our results suggest that the opposite might also be true; higher level of saturation of fatty acid ratio could be an adaptation to reduce susceptibility to peroxidation at warm temperature (Hulbert *et al.*, 2007). *S. fontinalis*, the southernmost species (MacCrimmon and Campbell, 1969), showed increased catalase activity [Figure 3], reduced lipid peroxidation susceptibility [Figure 4] and higher thermal tolerance performance [Figure 6] than *S. alpinus*. Hybrid groups showed intermediate performance level between parental's groups regarding catalase activity and thermal tolerance. Both hybrid's groups expressed the same susceptibility to lipid peroxidation as *S. fontinalis*, the southernmost species.

The heart has been suspected to be the first organ to fail during thermal stress (Farrell, 2002; Iftikar and Hickey, 2013) and heart mitochondria appear to play a major role in heart failure. Christen *et al.* (2018) conducted a study on H₂O₂ efflux from salmonid heart mitochondria exposed at different temperatures. Their data suggests that H₂O₂ efflux rates are maintained constant in a wide range of temperature, except when temperature approach the specie's CT_{max}, where H₂O₂ production rise. Since both catalase activity and peroxidation index revolves around H₂O₂, these results and our own suggest that H₂O₂ may be involved in heart failure during thermal stress episodes. High concentrations of H₂O₂ exacerbate lipid peroxidation, which in turn can lead to protein and DNA damage (Yamauchi *et al.*, 2008 and Marnett LJ, 2002).

On the other hand, SOD, GPx and GSR did not appear to alter thermal resistance. While CAT and PI showed a distinction between the different fish's group, it wasn't the case for SOD, GPx and GSR. Since a temperate adapted species (*S. fontinalis*) did not emphasise higher expression in SOD, GPx and GSR than a cold adapted species (*S. alpinus*), this might hint that these enzymes offer no protection against temperature

sensitivity. GPx and GSR are working together to degrade H_2O_2 to H_2O . While GPx oxidizes reduced glutathione (GSH) by degrading H_2O_2 , GSR reduces oxidized glutathione (GSSG), recycling GSH for GPx to use. Under normal conditions, when the organism is not stressed, H_2O_2 is mainly degraded by GPx. Under stressed conditions, when H_2O_2 is overproduced, CAT becomes its main scavenger (Chance *et al*, 1979). Since the rise of temperature raises H_2O_2 to oversaturation level (Christen *et al*, 2018), GPx's role regarding thermal tolerance might be negligible.

SOD scavenges superoxide (O_2^-), a ROS mainly produced in the complex I and III of the electron transfer chain (Lenaz, 2001). The interaction between O_2^- and organic peroxide has been reported to lead to singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) production, a reactive ROS that can cause lipid, protein and DNA damage (MacManus-Spencer, 2006). SOD reduces O_2^- to H_2O_2 to avoid the occurrence of such interaction. Even though SOD activity produces H_2O_2 and that our results indicate that H_2O_2 is somehow related to thermal tolerance, high SOD activity did not appear to lower thermal tolerance. This might be explained by the fact that $^1\text{O}_2$ also causes lipid peroxidation and that SOD activity inhibits $^1\text{O}_2$ production.

While astaxanthin did not appear to improve thermal resistance [Table 1], it seems to reduce superoxide dismutase activity [Figure 5]. Astaxanthin has been reported to quench $^1\text{O}_2$ (Beutner *et al*, 2001). Since $^1\text{O}_2$ is a product of the interaction between O_2^- and organic peroxide (MacManus-Spencer, 2006), astaxanthin intake might help SOD to maintain $^1\text{O}_2$ at stable concentration. This might explain why we observed that the activity of astaxanthin could partly modulate SOD activity. These results are in contradiction with Choi *et al*. (2011), who found that obese humans supplemented with astaxanthin (5 mg or 20 mg per day) raised SOD activity in blood to levels similar to non-obese human, while obese human with no astaxanthin supplementation showed lower SOD. In another study from Lawlor and O'Brien (1995), chicken embryo fibroblasts that were incubated in paraquat expressed higher SOD activity compared to non-paraquat incubated fibroblast. When the paraquat incubated groups were treated with astaxanthin, SOD activity significantly decreased. Obesity decreases SOD activity, while paraquat intake increases SOD activity. Astaxanthin seems to counterbalance both over and under expression of SOD activity in these two different metabolic systems.

CONCLUSION

These results showed that catalase activity and lipids peroxidation susceptibility are linked to thermal tolerance. Since these results were observed on two different species, as well as their hybrids, the next step would be to see if the same relation can be revealed at intraspecific level, which would require much more individuals of one species than the number used in the present study.

Moreover, the complexity of oxidative stress management might involve other pathways implicated in stress management. For example, heat shock proteins protect other proteins from denaturation, which might occur due to rising temperature (Schlesinger, 1990).

Establishing a good understanding of thermal tolerance is important to help us gain a better understanding of the upcoming change in the biotope. The expected rise in temperature will surely induce change in physiological properties to favor individuals with higher thermal tolerance. By studying the variability within and between populations we might be able to predict thermal tolerance of individuals. Further study might help us determine the associated genes with thermal tolerance and determine the heritability of those genes.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Adaptation

L'avènement des changements climatiques peut avoir des conséquences sur l'aire de distribution des espèces. Ainsi, face à l'augmentation de la température de leur environnement, les organismes ont trois options possibles : 1) la migration, 2) l'adaptation locale ou 3) la disparition. Afin d'anticiper le potentiel évolutif et d'adaptation des salmonidés (et autres espèces d'ectothermes) à de nouvelles conditions, il importe de répertorier, dans un premier temps, les caractères physiologiques qui gouvernent la tolérance thermique. Une fois les caractères physiologiques connus, l'étude de leur variabilité à l'intérieur et entre les populations permettrait de prédire le potentiel évolutif de la tolérance thermique et, conséquemment, leur potentiel de survie des populations et des espèces. Et finalement, associer les gènes qui contrôlent l'expression des caractères physiologiques liés à la tolérance thermique permettrait d'estimer l'héritabilité de ces caractères physiologiques.

Tolérance thermique

Plusieurs chercheurs ont tenté d'expliquer la thermosensibilité et de prédire la tolérance thermique des organismes. Pörtner et Knust (2007) soupçonnent que l'élévation de la température induit une augmentation de la demande énergétique, jusqu'à un point où l'organisme ne parvient plus à puiser et à transporter l'oxygène nécessaire pour subvenir à ses besoins. D'autres chercheurs (Blier *et al.*, 2014) suggèrent plutôt que l'excès de DRO endommage les mitochondries, qui ne sont plus en mesure de fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire à un moment où la demande énergétique de la cellule est en hausse.

Bien que les DRO jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire, lorsqu'ils se retrouvent en concentration excédentaire dans l'organisme, ils peuvent causer des dommages aux tissus. La peroxydation des lipides en est un exemple et certains auteurs suggèrent que cette peroxydation des lipides provoquerait l'arrêt cardiaque (Röth *et al.*, 1985) à l'origine du décès chez des ectothermes soumis à un épisode de stress thermique (Farrell, 2002).

Christen *et al.* (2018) ont démontré que, chez les salmonidés, l'élévation de la température cause une augmentation rapide de la consommation d'oxygène par les mitochondries du cœur et, par la suite, une hausse de la production de DRO lorsque la température approche le CT_{max} de cette population. Cette observation établit donc un lien entre la gestion du stress oxydant et la tolérance thermique. Ainsi, lorsque les DRO deviennent excédentaires dans la cellule et que leur système de gestion n'est plus en mesure de maintenir leur concentration, le cœur cesse de fonctionner. Comme les organismes ont développé plusieurs stratégies de défense contre les effets délétères des DRO. Nous nous sommes intéressés à la catalase, la glutathione peroxydase, la glutathione disulfide réductase, la superoxyde dismutase, l'indice de peroxydation et l'astaxantine, ainsi qu'à la robustesse des membranes aux attaques par les DRO, afin de déterminer s'ils sont en mesure de prédire la tolérance thermique des salmonidés.

Indice de peroxydation (PI)

Le PI des lipides membranaires du ventricule de cœurs des ombles présente une relation négative avec la tolérance thermique. Ce résultat concorde avec l'idée que l'arrêt cardiaque découlant du stress thermique soit liée à une exposition excédentaire aux DRO. Ide *et al* (2001) ont démontré qu'une augmentation de la peroxydation des lipides dans les mitochondries était caractéristique des arrêts cardiaques chez les mammifères.

La contraction rythmique du cœur est assurée par le cycle du calcium. Le muscle cardiaque se contracte lorsque la concentration de Ca_2^+ dans le sarcoplasme augmente et se relaxe lorsque le réticulum sarcoplasmique pompe vers lui l'excédent de Ca_2^+ (Choudary et Dudley, 2002; Marks, 2013). La peroxydation des lipides augmente la perméabilité des membranes face aux ions, ce qui pourrait perturber l'homéostasie calcique de la cellule et interférer dans la récupération du calcium par le réticulum membranaire (Paradies *et al*, 2009).

Catalase (CAT)

Un résultat important qui est ressorti de notre étude est la relation que nous avons établi entre la catalase et la tolérance thermique. Les individus possédant une activité de catalase plus élevée performaient mieux durant le test de tolérance thermique. De fait, le rôle de la CAT consiste à dégrader le H_2O_2 , qui est produit par la dégradation de l'anion superoxyde par l'enzyme SOD. La réactivité de H_2O_2 est faible, mais cette molécule est capable de traverser la membrane mitochondriale. Ainsi, elle peut se propager vers d'autres structures de la cellule. Malgré sa faible réactivité, H_2O_2 peut interagir avec les métaux de transition, principalement l'ion ferreux et l'ion cuivreux, ce qui produit un radical hydroxyle (Hashimoto *et al.*, 2013). Ce dernier est extrêmement réactif et peut causer, entre autres, la peroxydation des lipides (Hermes-Lima, 2004). Lorsque la CAT dégrade le H_2O_2 , elle prévient donc par le fait même la production de radical hydroxyle et, en partie, la peroxydation des lipides.

Résultats non corrélés

Les autres paramètres (GPx, GSR, SOD et astaxanthine) ne semblent pas liés à la tolérance thermique des individus. La GPx est une enzyme qui joue un rôle similaire à celui de la CAT, c'est-à-dire qu'elle dégrade le H_2O_2 . En condition physiologiques normales, elle est l'enzyme principalement responsable de la dégradation du H_2O_2 . Lorsque la concentration de H_2O_2 s'élève à un niveau excédentaire, la CAT devient dominante dans le système de dégradation (Chance *et al.*, 1979). En condition de stress thermique, le niveau de H_2O_2 pourrait devenir excédentaire et amener la CAT à devenir l'enzyme principale de dégradation du H_2O_2 (Munro et Treberg, 2017). De plus, puisque la GPx doit oxyder le glutathion pour dégrader le H_2O_2 , la disponibilité de glutathion peut limiter l'efficacité de l'enzyme (Jones *et al.*, 1981). Lorsque l'organisme se retrouve en condition non-stressée la disponibilité du glutathion n'est pas un problème puisque la GSR réduit le glutathion et le rend de nouveau disponible (Jones *et al.*, 1981). En condition stressée, où les DRO sont excédentaires, la GSR n'est peut-être pas en mesure de réduire le glutathion suffisamment rapidement pour permettre au GPx d'assurer l'évacuation de l'excédent de DRO, ce qui pourrait expliquer l'absence de lien entre le GPx et le CTmax de notre étude. On peut suivre le même raisonnement concernant la GSR. Alors que chez certains individus la GSR aurait

pu ne pas être en mesure de mettre le glutathion à disposition de la GPx assez rapidement pour qu'elle fonctionne à plein régime, chez d'autres individus ce pourrait être la GPx qui limite l'efficacité de la GSR, n'oxydant pas le glutathion suffisamment rapidement pour que la GSR puisse fonctionner à plein régime.

La SOD dismute l' O_2^- , un DRO qui peut interagir avec les peroxydes organiques et produire l' 1O_2 , un DRO très réactif qui peut peroxyder les lipides. La dismutation de l' O_2^- , conduit à la production de H_2O_2 . La SOD permet donc d'éviter la production de l' 1O_2 , mais en contrepartie conduit à une production de H_2O_2 qui traverse aisément la membrane mitochondriale et diffuse dans le reste de la cellule où il peut interagir avec les métaux de transition et produire le radical hydroxyle, un autre DRO très réactif qui peroxyde également les lipides (Halliwell, 1978; Hermes-Lima, 2004 and Hashimoto *et al.*, 2013).

Dans le règne animal, trois gènes codent l'expression de la SOD. Deux d'entre eux codent pour des peptides qui possèdent un centre catalytique REDOX dont le cofacteur ionique est soit un atome de cuivre (SOD1) ou un atome de zinc (SOD3), alors que le troisième possède un centre REDOX associé au manganèse (SOD2). La SOD1 se retrouve dans le cytosol et l'espace intermembranaire, la SOD2 loge dans la mitochondrie et la SOD3 est extracellulaire (Ighodaro et Akinloye, 2018). Nos analyses ont observé l'activité combinée des trois. Il est donc possible que l'une d'entre elles joue un rôle lors des épisodes de stress thermique, mais le biais de réponse occasionné par les autres SOD pourrait avoir masqué le signal.

Puisque la SOD2 possède un centre REDOX différent de la SOD1 et de la SOD3, il existe des moyens d'inhiber ces dernières afin de n'observer que l'activité de la première. Le cyanure en principe inhibe la SOD1 et la SOD3 permettant d'isoler l'activité de la SOD2 (Weisiger et Fridovich, 1973). Pour des raisons qui nous échappent nous n'avons pas été en mesure de différencier la SOD2 de la SOD1 et de la SOD3.

Groupes de poissons

La CAT et le PI, se distinguent considérablement entre les quatre groupes de salmonidés. Alors que *S. fontinalis* avait une activité de la CAT plus élevée que les autres groupes de poissons, son PI était égal à celui des deux groupes hybrides et inférieur à celui de *S. alpinus* [voir figures 3 et 6, respectivement, dans l'annexe]. D'ailleurs, l'objectif de conduire cette expérience sur plusieurs groupes de poissons était d'augmenter la variabilité génétique et phénotypique, ce qui permettait de faire ressortir des relations trop faibles entre le CTmax et ces paramètres pour être détectés au niveau intraspécifique. La SOD, la GPx et la GSR ne présentent aucune différence notable entre tous les groupes de poissons [voir Table 1, pour les résultats de toutes les analyses statistiques]. Il est tout de même possible que la SOD, la GPx et la GSR aient un impact sur la détermination de la tolérance thermique des individus, mais que leur signal soit trop faible pour être détecté avec une précision qui permette de lier ces caractères avec la tolérance thermique. Il est également possible que ces paramètres ne jouent qu'un rôle négligeable pour établir la tolérance thermique des salmonidés.

Astaxanthine

Nous avons également tenté d'estimer l'impact potentielle de l'astaxanthine, une molécule antioxydante qui protège les membranes contre l'effet de l' 1O_2 (Beutner *et al*, 2001), sur l'établissement du seuil de tolérance thermique supérieur. L'ajout d'astaxanthine dans la diète des poissons ne semble pas améliorer leur tolérance thermique (voir Table 1). Cependant, nous avons pu observer un autre résultat intéressant : L'activité totale de la SOD semble avoir été affectée par la diète enrichie en astaxanthine. Les poissons qui ont été nourris avec une diète enrichie en astaxanthine (AW8) avaient une activité de la SOD inférieure à ceux qui ont été nourris avec une diète non-enrichie (AW0) [voir figure 5 de l'annexe]. Nos observations diffèrent de celle de Choi *et al* (2011), qui avait observé que chez des humains obèses, un supplément de 5 ou 20 mg d'astaxanthine par jour augmentait leur activité de la SOD dans le sang à un niveau similaire à celle d'humains non-obèses, alors que les humains obèses qui ne prenaient pas ce supplément avaient une activité de la SOD plus basse. Cependant, une autre étude, conduite par Lawlor et O'Brien (1995), s'intéressait à l'activité de la SOD à l'intérieur de fibroblastes d'embryons de poussins

incubés dans du paraquat, un insecticide. Lorsque ces embryons étaient traités avec de l'astaxanthine, leur activité de SOD diminuait significativement. Les résultats de Lawlor et O'Brien concordent avec les nôtres. En somme, ces résultats indiquent que l'astaxanthine pourrait moduler l'expression des gènes de la SOD.

Perspectives

Cette étude représente une première tentative pour déterminer quels biomarqueurs permettent de prédire la tolérance thermique d'ectothermes comme les salmonidés. Sur les cinq paramètres que nous avons étudiés, deux sont ressortis, soit la catalase et l'indice de peroxydation. Dans les deux cas, *S. fontinalis*, l'espèce ayant le CT_{max} le plus élevé, avait à la fois une activité de catalase dans le cœur plus élevée (positivement corrélé avec le CT_{max}) et un indice de peroxydation plus bas (négativement corrélé avec le CT_{max}), ce qui pourrait indiquer une adaptation à des températures sensiblement plus élevées. Étant donné la complexité du système de gestion du stress oxydant et l'implication d'autres paramètres dans ce système, il est probable que d'autres traits phénotypiques puissent contribuer à établir la tolérance thermique chez les salmonidés. Par exemple, les protéines de choc thermique 70 (HSP70) pourraient faire partie des biomarqueurs intéressants à vérifier. L'expression de ces protéines se fait en réaction à une perturbation de l'environnement, comme l'augmentation de la température. Ces protéines interagissent avec les protéines structurales et fonctionnelles de la cellule afin que ces dernières maintiennent leur intégrité structurale et ne soient pas dénaturées, conservant ainsi leurs fonctionnalités (Beckman *et al.*, 1990). Étant donné que l'augmentation de la température cause la dénaturation des protéines (Craig *et al.*, 1996), HSP70 pourrait jouer un rôle important dans la détermination de la tolérance thermique chez des ectothermes comme les salmonidés.

Il serait également pertinent d'évaluer l'efficacité de la catalase et de l'indice de peroxydation au niveau intraspécifique. Dans notre étude, nous avons pu établir une relation positive entre l'activité de la catalase et la tolérance thermique et une relation négative entre l'indice de peroxydation et la tolérance thermique. Il reste à voir si ces relations, qui ont été distinctement mises en évidence entre les quatre groupes de poissons, sont également observables au sein d'un seul groupe.

ANNEXE I

Table 1 Statistical Analysis Results. Significant relationship is shown in bold

Dependent variable	Independent variable	Statistical analysis	P value	R ²	Anova group
CT _{max} 's performance	SOD	Linear regression	0.975	Not significant	-
CT _{max} 's performance	CAT	Linear regression	< 0.01 (Figure 1)	0.135	-
CT _{max} 's performance	GPx	Linear regression	0.777	Not significant	-
CT _{max} 's performance	GSR	Linear regression	0.5591	Not significant	-
Peroxidation Index	SOD	Linear regression	0.3616	Not significant	-
Peroxidation index	CAT	Linear regression	0.01352	0.1138	-
Peroxidation Index	GPx	Linear regression	0.4273	Not significant	-
Peroxidation Index	GSR	Linear regression	0.3077	Not significant	-
CT _{max} 's performance	Peroxidation index	Linear regression	0.0196 (Figure 2)	0.1022	-
SOD	Group	ANOVA	0.224	-	F - <i>a</i> M - <i>a</i> HA - <i>a</i> HB - <i>a</i>
CAT	Group	ANOVA	< 0.01 (Figure 3)	-	F - <i>b</i> M - <i>a</i> HA - <i>ab</i> HB - <i>ab</i>
GPx	Group	ANOVA	0.533	-	F - <i>a</i> M - <i>a</i> HA - <i>a</i> HB - <i>a</i>
GSR	Group	ANOVA	0.318	-	F - <i>a</i> M - <i>a</i> HA - <i>a</i> HB - <i>a</i>
CT _{max} 's performance	Diet	ANOVA	0.269	-	AW0 - <i>a</i> AW8 - <i>a</i>
CT _{max} 's performance	Group	ANOVA	< 0.01 (Figure 4)	-	F - <i>c</i> M - <i>a</i> HA - <i>b</i> HB - <i>b</i>
CAT	Diet	ANOVA	0.137	-	AW0 - <i>a</i> AW8 - <i>a</i>
GPx	Diet	ANOVA	0.261	-	AW0 - <i>a</i> AW8 - <i>a</i>
GSR	Diet	ANOVA	0.052	-	AW0 - <i>a</i> AW8 - <i>a</i>
SOD	Diet	ANOVA	0.0139 (Figure 5)	-	AW0 - <i>a</i> AW8 - <i>b</i>
Peroxidation index	Group	ANOVA	< 0.01 (Figure 6)	-	F - <i>a</i> M - <i>b</i> HA - <i>b</i> HB - <i>b</i>
Peroxidation index	Diet	ANOVA	0.0608	-	AW0 - <i>a</i> AW8 - <i>a</i>

ANNEXE II

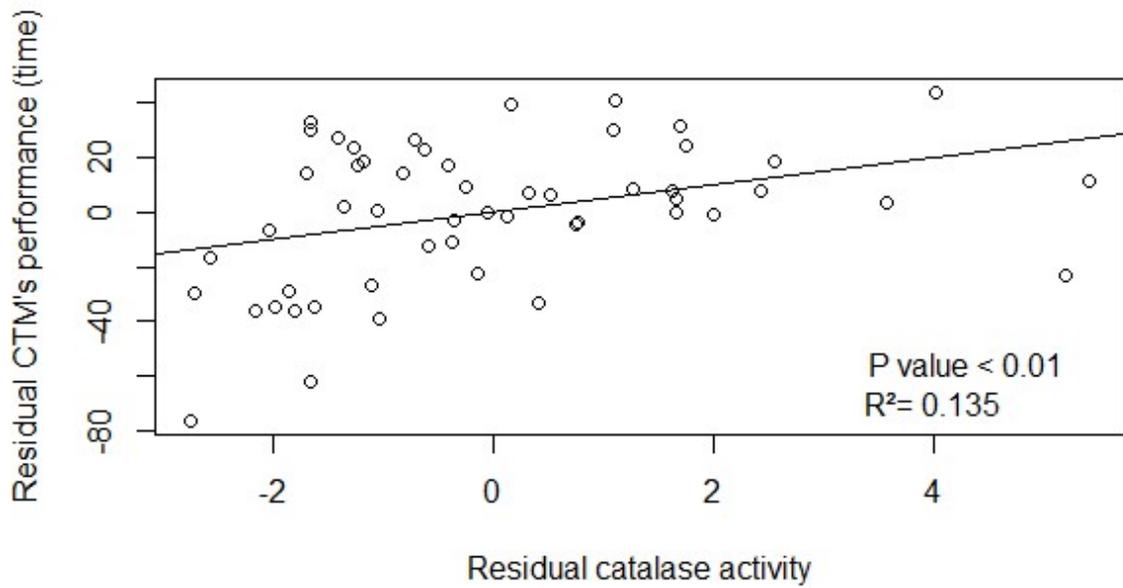


Figure 1 CT_{max}'s Performance in Relationship to Catalase Activity

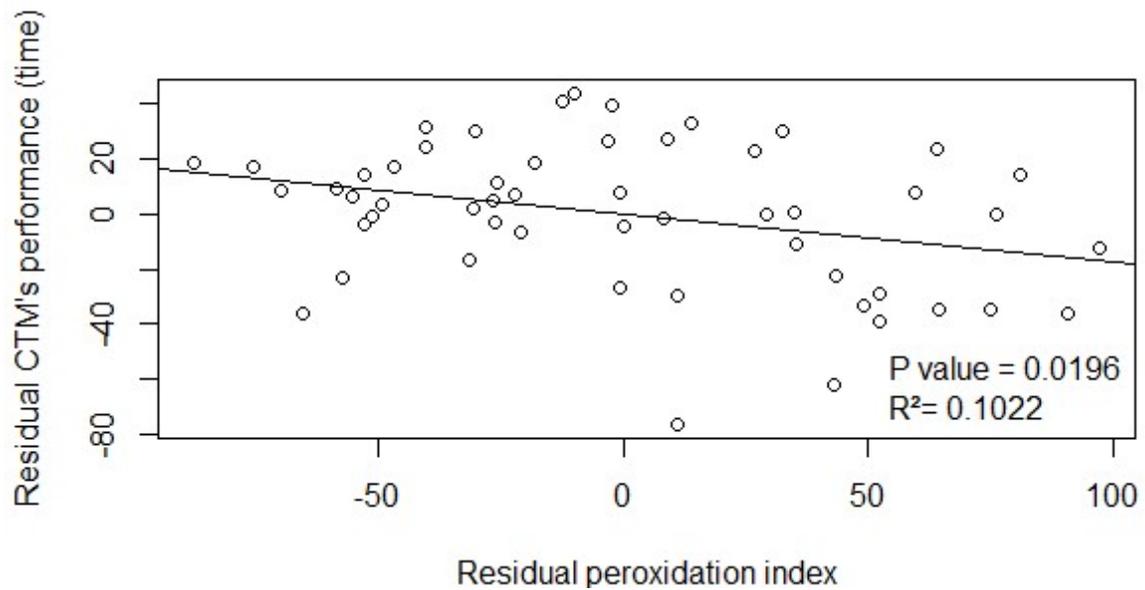


Figure 2 CT_{max}'s Performance in Relationship to Peroxidation Susceptibility

ANNEXE III

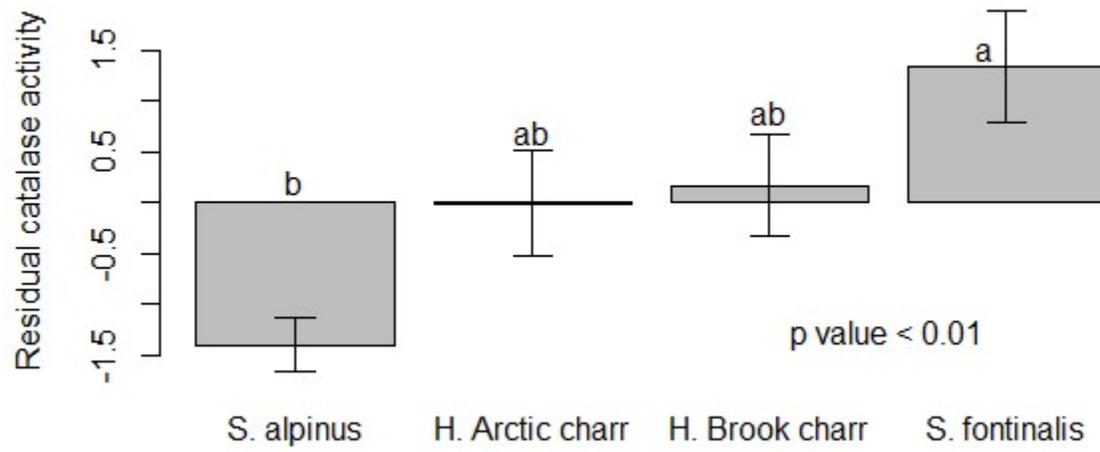


Figure 3 Catalase Activity per Fish's Group

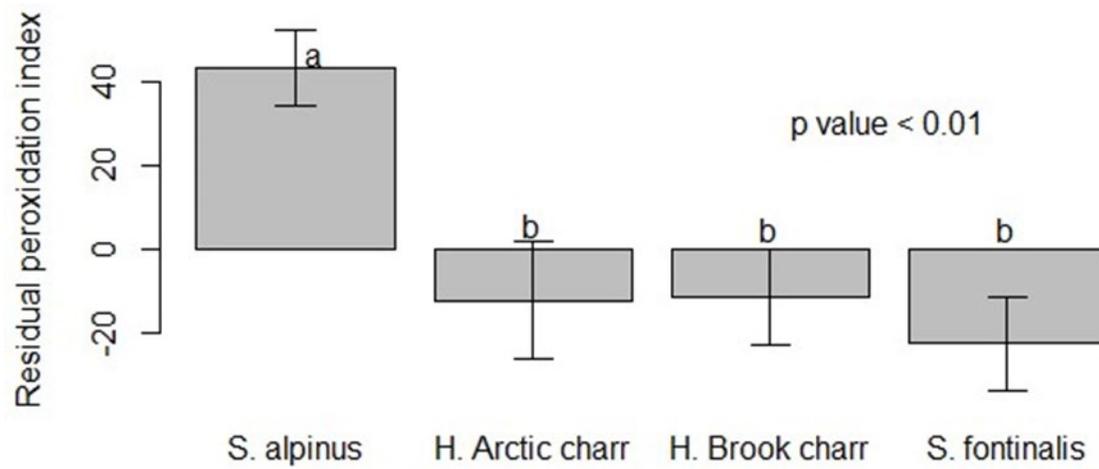


Figure 4 Peroxidation Susceptibility per Fish's Group

ANNEXE IV

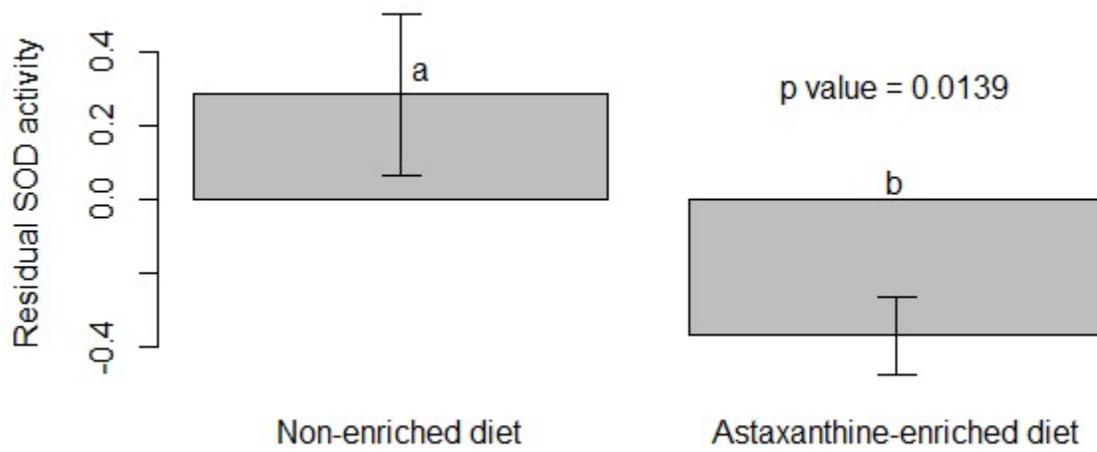


Figure 5 Superoxide Dismutase Activity per Fish's Diet

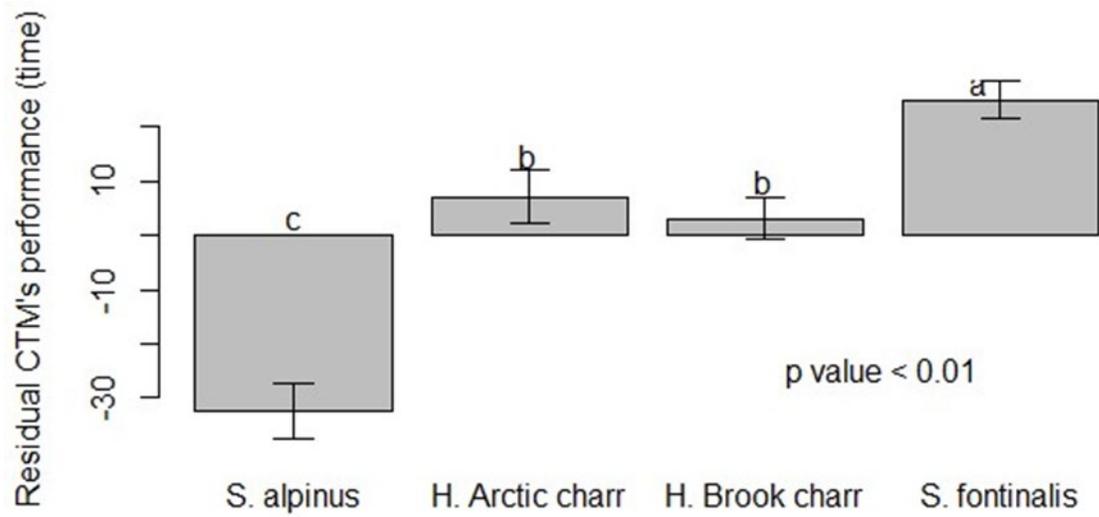


Figure 6 CT_{max} 's Performance per Fish's Group

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Allen M, Babiker M, Chen Y, de Coninck H, Connors S, van Diemen R, Dube OP, Ebi K, Engelbrecht F, Ferrat M, Ford J, Forster P, Fuss S, Guillen T, Harold J, Hoegh-Guldberg O, Hourcade JC, Huppmann D, Jacob D, Jiang K, Johansen TG, Kainuma M, de Kleijne K, Kriegler E, Ley D, Liverman D, Mahowald N, Masson-Delmotte V, Matthews R, Melcher R, Millar R, Mintenbeck K, Morelli A, Moufouma-Okia W, Mundaca L, Nicolai M, Okereke C, Pathak M, Payne A, Pidcock R, Pirani A, Poloczanska E, Pörtner HO, Revi A, Riahi K, Roberts DC, Rogelj J, Roy J, Seneviratne S, Shukla PR, Skea J, Slade R, Shindell D, Singh C, Solecki W, Steg L, Taylor M, Tschakert P, Waisman H, Warren R, Zhai P, Zickfeld K (2018). Global Warming of 1.5 °C, *Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC 1.5*, 1-33

Aoki S, Rintoul SR, Ushio S, Watanabe S and Bindoff NL(2005). Freshening of the Adelie Land Bottom Water near 140°E, *Geophysical Research Letters*, **32**, L23601, doi:10.1029/2005GL024246.

Beckman RP, Mizzen LA, and Welch WJ (1990). Interaction of Hsp 70 with Newly Synthesized Proteins: Implications for Protein Folding and Assembly, *Science*, 248 (**4957**), 850-854

Bernatchez L, Glémet H, Wilson CC, Danzmann RG (1995). Introgression and fixation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*), *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**, 179-185

Beutner S, Bloedorn B, Frixel S, Hernandez Blanco I, Hoffmann T, Martin HD, Mayer B, Noack P, Ruck C, Schmidt M, Schülke I, Sell S, Ernst H, Haremza S, Seybold G, Sies H, Stahl W and Walsh R (2001). Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 559-568

Blier P.U, Lemieux H and Pichaud N (2014). Holding our breath in our modern world: will mitochondria keep the pace with climate changes?, *Canadian Journal of Zoology*, **92**, 591-601

Burton RS, Pereira RJ and Barreto FS (2013). Cytonuclear Genomic Interactions and Hybrid Breakdown, *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **44**, 281-302

Cahill AE, Aiello-Lammens ME, Fisher-Reid MC, Hua X, Karanewsky CJ, Yeong Ryu H, Sbeglia GC, Spagnolo F, Waldron JB, Warsi O and Wiens JJ, How does climate change cause extinction?, *Proceedings of the Royal Society B*, **280**, 20121890 <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2012.1890>

Calvo SE and Mootha VK (2010). The Mitochondrial Proteome and Human Disease, *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **11**, 25-44

Cardounel AJ, Dumitrescu C, Zweier JL and Lockwood SF (2003). Direct superoxide anion scavenging by a disodium disuccinate astaxanthin derivative: relative efficacy of individual stereoisomers versus the statistical mixture of stereoisomers, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **307**, 704-712

Cassini A, Favero M and Albergoni V (1993). Comparative studies of antioxidant enzymes in red-blooded and white-blooded antarctic teleost fish. *Pagothenia Bernacchii* and *Chionodraco Hamatus*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **2**, 333-336

Chance B, Sies H and Boveris A (1979). Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs, *Physiological Reviews*, **59**, 531-542

Choi HD, Kim JH, Chang MJ, Kyu-Youn Y and Shin WG (2011). Effects of Astaxanthin on Oxidative Stress in Overweight and Obese Adults. *Phytotherapy Research*, **25**, 1813-1818

Choudhary G and Dudley SC (2002). Heart Failure, Oxidative Stress, and Ion Channel Modulation, *Congestive Heart failure*, **8**, 148-155

Christen F, Desrosiers V, Dupont-Cyr BA, Vandenberg GW, Le François NR, Tardif JC, Dufresne F, Lamarre SG, Blier PU (2018). Thermal tolerance and thermal sensitivity of heart mitochondria: Mitochondrial integrity and ROS production, *Free Radical Biology and Medicine*, **116**, 11-18

Clarke A and Johnston NM (1999). Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost, *Journal of Animal Ecology*, **68**, 893-905

Cossins AR and Prosser CL (1978). Evolutionary adaptation of membranes to temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **75**, 2040-2043

Cowan K.J (2004). The mitochondria: Powerhouse of the cell, *Functional Metabolism: Regulation and adaptation*, edited by Kenneth B. Storey. 211–241

Craig DB, Arriaga EA, Wong JCY, Lu H et Dovichi NJ (1996). Studies on Single Alkaline Phosphatase Molecules: Reaction Rate and Activation Energy of a Reaction Catalyzed by a Single Molecule and the Effect of Thermal DenaturationsThe Death of an Enzyme, *Journal of the American Chemical Society*, **118 (22)**, 5245-5253

Danen WC and Arudi RL (1978). Generation of Singlet Oxygen in the Reaction of Superoxide Anion Radical with Diacyl Peroxides, *Journal of the American Chemical Society*, **100**, 3944-3945

Davidson JF, Whyte B, Bissinger PH and Schiestl RH (1996). Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 5116-5121

Dill KA (1990). Dominant Forces in Protein Folding, *Biochemistry*, **29 (31)**, 7133-7155

Ekström, A., Sandblom, E., Blier, P. U., Dupont, B., Brijs, J. and Pichaud, N. (2017). Thermal sensitivity and phenotypic plasticity of cardiac mitochondrial metabolism in European perch, *Perca fluviatilis*. *Journal of Experimental Biology*, **220**

Elliott JM and Hurley MA (2000). Optimum energy intake and gross efficiency of energy conversion for brown trout, *Salmo trutta*, feeding on invertebrates or fish. *Freshwater Biology* **44**, 605–615.

Elliott JM and Elliott JA (2010). Temperature requirements of Atlantic salmon *Salmo salar*, brown trout *Salmo trutta* and Arctic charr *Salvelinus alpinus* : predicting the effects of climate change, *Journal of Fish Biology*, **77**, 1793-1817

Fangue NA, Hofmeister M and Schulte PM (2006). Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus*, *The Journal of Experimental Biology*, **209**, 2859-2872

Farrell AP (2002). Cardiorespiratory performance in salmonids during exercise at high temperature: insights into cardiovascular design limitations in fishes, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **132**, 797-810

Fitzpatrick BM and Schaffer HB (2007). Hybrid vigor between native and introduced salamanders raises new challenges for conservation, *National Academy of Sciences of the USA*, 104 (**40**), 15793-15798

Halliwell B (1978). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates, *North-Holland Biomedical Press*, **92**, 321-326

Harley CDG, Hughes AR, Hultgren KM, Miner BG, Sorte CJB, Thomber CS, Rodriguez LF, Tomanek L, Williams SL (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems *Ecology Letters*, **9**, 228-241

Harris and Das (1991). Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart, *Biochemical Journal*, **280**, 561-573

Hashimoto H, Arai K, Hayashi S, Okamoto H, Takahashi J, Chikuda M et Obara Y (2013). Effects of astaxanthin on antioxidation in human aqueous humor, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **53**, 1-7

Hazel JR (1972). The effect of thermal acclimation upon succinic dehydrogenase activity from the epaxial muscle of the common goldfish (*Carassius auratus*)-I1. Lipid reactivation of the soluble enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **43B**, 863-882

Hazel JR (1995). THERMAL ADAPTATION IN BIOLOGICAL MEMBRANES: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation?, *Annual Review of Physiology*, **57**, 19-42

Helm KP, Bindoff NL, Church JA (2010). Changes in the global hydrological-cycle inferred from ocean salinity, *Geophysical Research Letters*, **37**, L18701, doi:10.1029/2010GL044222

Hermes-Lima M (2004). Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals, *Functional Metabolism: Regulation and adaptation*, edited by Kenneth B Storey. 319-368

Holman RT (1954). Autoxidation of Fats and Related Substances, In *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, **2**, 51-98

Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R and Buttemer WA (2007). Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals, *Physiological Reviews*, **87**, 1175-1213

Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A (2001). Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction Associated With Oxidative Stress in Failing Hearts After Myocardial Infarction, *Circulation Research*, **88**, 529-535

Iftikar FI and Hickey AJR (2013). Do Mitochondria Limit Hot Fish Hearts? Understanding the Role of Mitochondrial Function with Heat Stress in *Notolabrus celidotus*, *School of Biological Sciences*, **8**, 1-15

Ighodaro OM and Akinloye OA (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine*, **54**, 287-293

Jones DP, Eklöv L, Thor H, Orrenius S (1981). Metabolism of Hydrogen Peroxide in Isolated Hepatocytes: Relative Contributions of Catalase and Glutathione Peroxidase in Decomposition of Endogenously Generated H₂O₂, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **210** (2), 505-516

Kamunde, C., Sharaf, M., & MacDonald, N. (2018). H₂O₂ metabolism in liver and heart mitochondria: Low emitting-high scavenging and high emitting-low scavenging systems. *Free Radical Biology and Medicine*, **124**, 135-148. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.064

Kingsolver JG and Umbanhowar J (2018). The analysis and interpretation of critical temperatures, *Journal of Experimental Biology*, **221**, 1-8

Lane N (2011). Mitonuclear match: Optimizing fitness and fertility over generations drives ageing within generations. *BioEssays*, **33**(11), 860–869. doi:10.1002/bies.201100051

Lawlor SM and O'Brien NM (1995). Astaxanthin: Antioxidant effects in chicken embryo fibroblasts, *Nutrition Research*, **15**, 1695-1704

Lee CG, Farrell AP, Lotto A, MacNutt MJ, Hinch SG and Healey MC (2003). The effect of temperature on swimming performance and oxygen consumption in adult sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and coho (*O. kisutch*) salmon stocks, *The Journal of Experimental Biology*, **206**, 3239-3251

Lenaz G (2001). The Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species: Mechanisms and Implications in Human Pathology, *Life*, **52**, 159-164

MacCrimmon HR and Campbell JS (1969). World Distribution of Brook Trout, *Salvelinus fontinalis*, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **26**(7): 1699-1725

MacManus-Spencer LA, Edhlund BL and McNeill K (2006). Singlet Oxygen Production in the Reaction of Superoxide with Organic Peroxides, *The Journal of Organic Chemistry*, **71**, 796-799

Madeira D, Narciso L, Cabral HN, Vinagre C and Diniz MS (2013). Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **166**, 237-243

Malstrom B, Andreasson L and Reinhammer B (1975). The Enzymes, *Boyer, P., editor. XIIB, Academic Press, New York*, **533**

Marin-Garcia J, Akhmedov AT and Moe GW (2013). Mitochondria in heart failure: the emerging role of mitochondrial dynamics, *Heart Failure Reviews*, **18**, 439-456

Marks AR (2013). Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics, *Journal of Clinical Investigation*, **123**, 46-52

- Marnett LJ (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage, *Toxicology*, **181-182**, 219-222
- McCormick JH, Hokanson KEF, Jones BR (1972). Effects of Temperature on Growth and Survival of young Brook Trout, *Salvelinus fontinalis*, *Journal fo the Fisheries Research Board of Canada*, 29 (8), 1107-1112
- Munro D, Banh S, Sotiri M, Tamanna N, Treberg J.R. (2016). The thioredoxin and glutathione-dependent H₂O₂ consumption pathways in muscle mitochondria: Involvement in H₂O₂ metabolism and consequence to H₂O₂ efflux assays. *Free Radical Biology and Medicine*, **96**, 334-346
- Munro D et Treberg JR (2017). A radical shift in perspective: mitochondria as regulators of reactive oxygen species, *Journal of Experimental Biology*, **220**, 1170-1180
- Murphy MP (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochemical Journal*, **417**, 1-13
- Naguib YMA (2000). Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (4), 1150-1154
- Orr, W. C. and R. S. Sohal (1992). The Effects of Catalase Gene Overexpression on Life Span and Resistance to Oxidative Stress in Transgenic Drosophila melanogaster, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **297**, 35-41
- Osada N, Akashi H. 2012. Mitochondrial – nuclear interactions and accelerated compensatory evolution: Evidence from the primate cytochrome c oxidase complex. *Molecular Biology and Evolution*, **29**, 337 – 346
- Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM (2009). Role of cardiolipin peroxidation and Ca²⁺ in mitochondrial dysfunction and disease, *Cell Calcium*, **45**, 643-650
- Pêches et Océans Canada (2015). Omble Chevalier, Accessed February 13 2019 at <http://www.dfo-mpo.gc.ca/species-especes/profiles-profil/arctic-char-omble-chevalier-fra.html>
- Pêches et Océans Canada (2015). Omble Chevalier d'élevage, Accessed February 13 2019 at <http://www.dfo-mpo.gc.ca/aquaculture/sector-secteur/species-especes/arctic-char-omble-chevalier-fra.htm>
- Pêches et Océans Canada (2017). Truite d'élevage, Accessed February 13 2019 at <http://www.dfo-mpo.gc.ca/aquaculture/sector-secteur/species-especes/trout-truite-fra.htm>
- Pereira RJ, Barreto FS and Burton RS (2013). Ecological novelty by hybridization: Experimental evidence for increased thermal tolerance by transgressive segregation in *Tigriopus californicus*, *Evolution*, 68 (1), 204-215
- Pörtner HO and Langenbuch M (2005). Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: From Earth history to global change. *Journal of Geophysical Research*, 110, C09S10, doi:10.1029/2004JC002561.

Pörtner HO and Knust R (2007). Climate Change Affects Marine Fishes Through The Oxygen Limitation of Thermal Tolerance, *Science*, **315**, 95-97

Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD and Freeman BA (1991). Detection of Catalase in Rat Heart Mitochondria, *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 22028-22034

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/>

Richter K, Haslbeck M and Buchner J (2010). The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death, *Molecular Cell*, **40**, 253-266

Roberts, J. 2000. "Salvelinus fontinalis" (On-line), Animal Diversity Web. Accessed February 13, 2019 at https://animaldiversity.org/accounts/Salvelinus_fontinalis/

Röth E, Török B, Zsoldos T and Matkovics B (1985). Lipid peroxidation and scavenger mechanism in experimentally induced heart infarcts, *Basic Research in Cardiology*, **80**, 530-536

Roze T, Christen F, Amerand A, Claireaux G (2013). Trade-off between thermal sensitivity, hypoxia tolerance and growth in fish, *Journal of Thermal Biology*, **38**, 98-106

Schlesinger MJ (1990). Heat Shock Proteins, *The Journal of Biochemistry Biology*, **265**, 12111-12114

Schulte PM (2015). The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment, *The Journal of Experimental Biology*, **218**, 1856-1866

Shirayama Y and Thornton H (2005). Effect of increased atmospheric CO₂ on shallow water marine benthos. *Journal of Geophysical Research*, **110**, C09S08, doi:10.1029/2004JC002618.

Sies H (1997). Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants, *Experimental Physiology*, **82**, 291-295

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC (1985). [Measurement of protein using bicinchoninic acid.](#) *Analytical Biochemistry* **150(1)** 76-85

Torrissen OJ (1986). PIGMENTATION OF SALMONIDS - A Comparison of Astaxanthin and Canthaxanthin as Pigment Sources for Rainbow Trout, *Aquaculture*, **53**, 271-278

Turrens JF (1997). Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain, *Bioscience reports*, **17**, 3-8

Velasco J, Gutiérrez-Cánovas C, Botella-Cruz M, Sánchez-Fernández D, Arribas P, Carbonell JA, Millán and Pallarés S (2018). Effects of salinity changes on aquatic organisms in a multiple stressor context, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **374**, 20180011. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2018.0011> Verberk WCEP, Bilton DT, Calosi P and Spicer JI (2011).

Oxygen supply in aquatic ectotherms: Partial pressure and solubility together explain biodiversity and size patterns, *Ecology*, 92 (8), 1565-1572

Weisiger RA and Fridovich I (1973). Superoxide Dismutase, *The Journal of Biological Chemistry*, 248 (10), 3582-3592

Weiss H, Friedrich T, Hofhaus G and Preis D (1991). The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria, *EJB Reviews*, 197, 563-576

Yamauchi Y, Furutera A, Seki K, Toyoda Y, Tanaka K and Sugimoto Y (2008). Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants, *Plant physiology and Biochemistry*, 46, 786-793

Zhou J, Wang L, Xin Y, Wang WN, He WY, Wang AL and Liu Y (2010). Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *Journal of Thermal Biology*, 35, 284-289