

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

GESTION DU STRESS OXYDATIF COMME DÉTERMINANT DE LA SANTÉ DES
SALMONIDÉS

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE
UQAM-INRS0IAF EXTENSIONNÉE À L'UQAR

PAR
FELIX CHRISTEN

OCTOBRE 2018

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

Tout d'abord merci à Pierre Blier.

De m'avoir accepté en tant que candidat au doctorat
de m'avoir soutenu pendant les 5 dernières années
de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé me réaliser
de m'avoir laissé façonner mon doctorat à ma guise et de m'avoir accompagné là-
dedans.

J'ai été choyé de t'avoir comme directeur.

Merci surtout pour ton écoute et d'être là quand il faut!

Merci Grant Vandenberg mon codirecteur, de m'avoir accompagné dans cette aventure
et de m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'Université LAVAL pendant la deuxième
année de mon doc.

Merci aux membres du comité d'avoir pris le temps de corriger le présent document.

Merci à Guy Claireaux, Denis Chabot et Pierre Blier de m'avoir accepté dans vos projets
de recherche malgré mes relevés de notes extrêmement moyens.

Merci à tout le monde qui fait ou faisait partie du lab à Pierre pendant que j'étais là
surtout Véro, Nicolas, Dan, Enriquez, Bernouche, Gab, Ari, Manu Vandasmaehren,
Mireille et tous ceux que j'ai oubliés de nommer

Merci à tous les étudiantes et étudiants qui ont aidé à la réalisation de ce projet,
Santiago, Mathilde, Amélie, Aude, Kevin, Christophe, Yannis, David, Manue, Gab,
Oscar, Géraldine et tous ceux que j'ai oubliés

Merci à Daniel, Jo, Steven et Pierre Roux. Je n'aurais pas ben ben avancé sans vous.

Merci à Alain et Bernard pour l'aide en stats

Merci à Étienne Michaud de m'avoir aidé dans mes papiers d'immigration.

Merci à tous mes amies et amis sur Rimouski.

Merci à Florence de t'être occupée aussi bien de Lena pendant le dernier bout

Merci à l'équipe de soutien dans le dernier Blitz de la fin de rédaction que ce soit pour la correction la mise en page ou la mise en garde des enfants. (Mitch, Enrique, Elise, Max et Flo)

Merci aux beaux-parents de nous avoir autant aidés dans ces 5 années

Merci à Sam et Bertrand

Merci surtout à Pascale de m'avoir enduré pendant tout ce temps, de m'avoir soutenue de m'avoir écouté de me faire voir qu'il y a autre chose que la science.

Merci d'être ma coauteure pour nos deux meilleures <<publications>> Lena et Lutz c'est dur d'avoir un facteur d'impact plus important que ça.

Danke für alles Ich liebe dich!

Estas muy.

LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
ABSTRACT	xiii
RÉSUMÉ.....	xv
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
0.1 Les oméga-3 et la santé humaine.....	3
0.2 Les rôles et les voies de synthèse des oméga-3 et oméga-6	4
0.3 Les poissons comme source d'oméga-3	6
0.4 Oméga-3 et stress oxydatif – <i>The dark side of n-3</i>	7
0.5 La mitochondrie.....	12
0.6 Mitochondrie et DRO.....	14
0.7 CT _{max}	16
0.8 Le rôle central du cœur	17
0.9 Mitochondries et température.....	20
0.10 Le modèle animal.....	22
0.11 Les hybrides.....	23
0.12 Objectifs du projet.....	25
CHAPITRE 1	
OXIDATIVE STRESS AND GROWTH PERFORMANCE IN	
SALMONIDS	28
1.0 Abstract.....	30
1.1 Introduction.....	31
1.2 Material and methods.....	32
1.2.1 Fish	32
1.2.2 Feeding and diets.....	33
1.2.3 Fish sampling	34
1.2.4 Proximate analysis	35
1.2.5 Fatty acid profiles of filets and experimental diets.....	35
1.2.6 Oxidative stress parameters and antioxidant activity	36
1.2.7 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).....	36
1.2.8 Protein Carbonyls	36
1.2.9 Catalase activity.....	36

1.2.10 Superoxide dismutase activity (SOD).....	37
1.2.11 Calculations and statistical analysis.....	37
1.3 Results	38
1.3.1 Fatty acid composition and proximate analysis of diets and fish.....	38
1.3.2 Growth rates and oxidative stress parameters.....	41
1.4 Discussion.....	42
1.4.1 Fatty acid profiles.....	43
1.4.2 Oxidative stress related parameters.....	44
1.5 Conclusion.....	46
CHAPITRE 2	
THERMAL TOLERANCE AND FISH HEART INTEGRITY: FATTY ACIDS AS PREDICTORS OF SPECIES RESILIENCE	
	48
2.0 Abstract.....	49
2.1 Introduction.....	50
2.2 Materials and methods	52
2.2.1 Fish	52
2.2.2 Temperature challenge test (TCT).....	52
2.2.3 ROS production on permeabilized fibres.....	53
2.2.4 Fatty acid profiles of ventricular muscle	53
2.2.5 Calculations and Statistical Analysis.....	54
2.3 Results	55
2.3.1 Temperature challenge test (TCT)mass effect and ROS production.....	55
2.3.2 Fatty acid profiles and correlations with time to CT _{max}	58
2.4 Discussion.....	60
2.4.1 Thermal tolerance and body mass	60
2.4.2 Fatty acid profiles, oxidative stress and thermal tolerance	61
CHAPITRE 3	
THERMAL TOLERANCE AND THERMAL SENSITIVITY OF HEART MITOCHONDRIA: MITOCHONDRIAL INTEGRITY AND ROS PRODUCTION.....	
	65
3.0 Abstract.....	66
3.1 Introduction.....	67
3.2 Materials and methods	70

3.2.1 Fish	70
3.2.2 Temperature challenge test (TCT).....	70
3.2.3 Isolation of heart mitochondria	70
3.2.4 High resolution respirometry.	71
3.2.5 Detection of H ₂ O ₂ production	72
3.2.6 Statistical analysis.....	72
3.3 Results	74
3.3.1 CT _{max} , PMS _p and H ₂ O ₂ production.....	74
3.3.2 Loss of ROS management.....	76
3.3.3 Complex I and II.....	77
3.4 Discussion.....	78
3.4.1 Respiration rates at extreme temperatures	78
3.4.2 Hydrogen peroxide production rates	79
3.4.3 Possible sources of increased ROS production.....	81
3.4.4 Higher respiration rates decrease ROS production	81
3.4.5 Roles of complex I and II.....	82
3.5 Conclusion	83
4. DISCUSSION GENERALE	85
4.1 Oméga-3, stress oxydatif et croissance.....	85
4.2 Production de DRO, profils d'acides gras cardiaques et résistance thermique	89
4.3 L'homéostasie du stress oxydatif mitochondrial.....	93
4.4 Conclusion	98
4.5 Perspectives.....	101
4.5.1 Mitochondrie et CT _{max}	101
4.6.2 Métabolites des acides gras.....	105
4.6.3 Gestion du stress oxydatif comme indicateur de la santé des animaux.....	106
4.6.4 Mitochondries cardiaques et sélection.....	107
BIBLIOGRAPHIE.....	111

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 0.1 : Liste des espèces réactives de l'oxygène tirée de Halliwell and Gutteridge (2015)	9
Table 1.1 : Diet formulation.....	33
Table 1.2 : Lipid and proximate composition of the two experimental diets	34
Table 1.3 : Proximate composition (% on wet weight basis) of muscle and whole bodies of experimental fish.	38
Table 1.4 : Lipid composition (% of total fatty acids) of filets of the 4 experimental groups and two dietary treatments.....	39
Table 2.1: Mean values of morphologic, temperature related and ROS variables.....	57
Table 2.2 : Lipid composition (% of total fatty acids) of cardiac muscle of the four groups, Arctic char, Brook char, Hybrid arctic and hybrid brook.....	58

LISTE DES FIGURES

Figure 0.1 : Représentation théorique de l'évolution du régime alimentaire, tirée de Simopoulos, 2001.....	3
Figure 0.2: Conversion d'acides gras issus de plantes en acides gras à longue chaîne et polyinsaturés.....	6
Figure 0.3 : Représentation schématique du système de transport des électrons. La figure a été mise à disposition par Enrique Rodriguez (MS).....	13
Figure 0.4 : Représentation schématique du système de transport des électrons avec les principaux sites de production de ROS. De plus, les trois principaux antioxydants sont présentés : la superoxide dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion (GSH). La figure a été mise à disposition par Enrique Rodriguez (MS).....	14
Figure 0.5 : Augmentation de la température de l'eau d'un bassin expérimental. Tirée de Roze et al., 2013.	16
Figure 0.6 : Corrélation entre le CT _{max} et le volume ventriculaire relatif par rapport à la masse totale de l'individu. Tirée de Anttila et al., 2015.	18
Figure 0.7 : Taux de production d'ATP et ratio ATP/respiration de mitochondries cardiaques en fonction de la température. La ligne verticale en pointillé représente le CT _{max} de <i>Notolabrus celidotus</i> (27,5° C). Tirée de Iftikar and Hickey, 2014.....	20
Figure 0.8 : Participation du génome nucléaire et mitochondrial dans l'expression de sous-unités formant les complexes respiratoires. Figure tirée de Ellison et Burton, 2006.	24
Figure 1.1 : Specific growth rates (SGR) for all four groups in the two experimental dietary treatments	40
Figure 1.2 : Differences in TBARS content between dietary treatments and groups. (W. standard omega-3 content and WW. high omega-3 content). With Arctic char (AC). Brook char (BC). Hybrid Arctic (HA). and Hybrid Brook (HB). Different letters indicate significant differences (p < 0.05). values are mean ± SEM.	41
Figure 1.3 : Relationships between TBARS content, total omega 6 content (a), DHA (b), N3/N6 ratio (c) and catalase activity (d) for the two dietary treatments. With W (standard omega-3 content) in empty circles and dashed regression lines and WW (high omega-3 content) with closed circles and solid regression lines. Equation for regression lines a) solid (WW) : TBARS = 22.43x -35.5. dashed (W) : TBARS = 9.88x +4.00. b) solid (WW) : TBARS = -5.4x +184.34. dashed (W) : TBARS = -3.96x+121.06. c) solid (WW) : TBARS = -10.96x+154.42. dashed (W) : TBARS = -6.17x+ 92.36 and d) solid (WW) : TBARS = 2983.23x+11.87. dashed (W): TBARS = 1249.14x+16.91.....	42

- Figure 2.1 : Frequency distribution of CT_{max} (Temperature at which fish lose equilibrium) of the 4 experimental groups. Arctic char (AC, black bars), Hybrid arctic (HA, dark grey bars), Hybrid brook (HB, light grey bars) and Brook char (BC, white bars), N = 18, 21, 16 and 17 respectively.55
- Figure 2.2 : Relationship between body mass (g) and TCT challenge duration (min). Arctic char (AC, full circles), Brook char (BC, full squares), Hybrid arctic (HA, empty circles) and Hybrid brook (HB, empty squares). Equation for all groups; TCT duration (min) = $-0.08x+321.8$, for AC: TCT duration (min) = $-0.12x+306.28$, BC: TCT duration (min) = $-0.04x+330.27$, HA: TCT duration (min) = $-0.03x+315.65$, HB: TCT duration (min) = $-0.1x+330.78$56
- Figure 2.3 : Relationships between Peroxidation Index (a), total omega-3 content (b), EPA (c), ARA (d) and temperature challenge test (TCT) duration in min. All values are expressed as residuals calculated from least linear regressions on body mass. Arctic char (AC, full circles), Brook char (BC, full squares), Hybrid arctic (HA, empty circles) and Hybrid brook (HB, empty squares). Equation a) Peroxidation index = $-0.69x+8.74*10^{-15}$, b) Total n-3 content = $-0.087x+3.32*10^{-16}$, c) EPA = $-0.017x+8.6*10^{-17}$ and d) ARA = $-0.009x+3.93*10^{-17}$59
- Figure 3.1 : Frequency distribution of CT_{max} (Temperature at which fish lose equilibrium) of experimental fish (n=18).74
- Figure 3.2 : Effect of temperature on mitochondrial oxygen consumption (closed black circles) and hydrogen peroxide production (open white diamonds) during PMS_p fuelled with pyruvate, malate, succinate and ADP ($10^{\circ}C$; n = 5, $15^{\circ}C$; n = 7, $20^{\circ}C$; n = 7, $25^{\circ}C$; n=6). The vertical dashed line represents mean CT_{max} ($23.16 \pm 0.31^{\circ}C$). Different letters indicate a significant difference, lowercase letters for oxygen consumption and uppercase letters for H_2O_2 production ($P < 0.05$). Values are mean \pm SEM.75
- Figure 3.3 : Relationship between individual H_2O_2 production and mitochondrial respiration rates during OXPHOS fueled with pyruvate, malate, succinate and ADP at a) $10^{\circ}C$, b) $15^{\circ}C$, c) $20^{\circ}C$ and d) $25^{\circ}C$. R^2 and probability values are from least squares linear regression analysis with the following equations a) $y=0.043x-0.089$, b) $y=0.125x-0.030$, c) $y=0.155x-0.041$, and d) $y=0.003+0.089$76
- Figure 3.4 : Maximum mitochondrial respiration rates for complex I (CI) and complex II (CII) working concomitantly and the sum of the two working separately. White bars represent the sum of PM_p (pyruvate, malate, ADP) and S_p (succinate, rotenone, ADP). Grey bars show PMS_p (pyruvate, malate, succinate, ADP). Different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$). Values are mean \pm SEM.77
- Figure 3.5 : Temperature influence on the relative contribution of complex I (CI) and complex II (CII) to OXPHOS with pyruvate, malate and succinate. a) box plot of the contribution of complex II to total respiratory flux. Box plots show maximum, 75th

quartile, median, 25 percentile and minimum. Outliers are represented individually as points. Different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$). Values are mean \pm SEM.78

ABSTRACT

The human species possesses a very limited ability to synthesize long-chain polyunsaturated fatty acids such as omega-3 (n-3). These fatty acids are an essential component of cell membranes and their health benefits to human beings are undeniable. Humans rely mostly on their diet to get a sufficient n-3 supply and the main source of n-3 are fatty fish. Global fish populations have reached their limit of exploitation and aquaculture has become more and more important and now accounts for 50% of worldwide fish supply. The industry is currently trying to further increase the amount of omega-3 in fish to improve their nutritional quality for humans. However, due to their structure n-3s are extremely sensitive to peroxidation processes, a process triggered by reactive oxygen species. Due to the high omega-3 content in fish flesh, they are highly susceptible to oxidative stress caused by reactive oxygen species that can induce damage to membrane lipids, protein, and DNA that may negatively affect the fish health.

In this context, the aim of this thesis is to provide a complete picture of fish health in aquaculture and the effect of oxidative stress on two biomarkers of an organism's health: growth and resistance to heat stress. In particular, it attempts to fill gaps in the understanding of the consequences of the high LC-PUFA content of fish in aquaculture at the level of mitochondrial biochemistry and oxidative stress management. The animal model, Arctic char (*Salvelinus alpinus*), brook trout (*S. fontinalis*) and their hybrids were chosen because of their importance in the Quebec aquaculture industry.

The first objective was to evaluate the impact of an n-3 rich diet on growth performance, fatty acid profiles, oxidative stress markers and antioxidant activity in the four groups of salmonids. Omega-3 rich feed induced a loss in growth performance in all four groups. This was accompanied by an increase in oxidative damage. Growth thus seemed to be an indicator of the loss of homeostasis correlated with markers of oxidative stress, thus highlighting the validity of these markers in animal health. In addition, the endogenous antioxidant defenses appeared to have reached their limit of protection against omega-3-induced oxidative stress.

The second objective was to determine whether there is a correlation between stress resistance (an increase in temperature), heart fatty acid content, and ROS production rates in salmonids. At this stage we failed to demonstrate a direct link between ROS production and individual temperature resistance. In this paper we chose to work on permeabilized cardiac fibers which are known to keep the natural environment of mitochondria intact. It appears that increased temperature induced ROS production was efficiently managed by the cardiac cellular apparatus. Since we have not quantified oxidative damage at this stage, it is impossible to conclude with certainty on an absence of the correlation between oxidative stress and temperature resistance. Moreover, we have been able to establish a link between temperature resistance and cardiac peroxidation index, an indicator of susceptibility to oxidative stress. The latter is significantly higher for species and individuals less resistant to a rapid temperature increase. The susceptibility to oxidative stress induced by a greater quantity of n-3 seems then closely related to the management of the functional homeostasis of the heart during stress.

The final objective was to determine the effect of an acute increase in temperature on cardiac mitochondria isolated from Arctic char. The heart was chosen as an organ due to its primary role in the adaptation of fish to temperature. We have shown that at temperatures close to the maximum of this species mitochondrial integrity deteriorated and the production of reactive oxygen species increased significantly. The temperature resistance seems to be related to the generation of ROS at the cardiac level. Oxidative stress would therefore be a parameter that increases at high temperatures and deteriorates the mitochondrial function thus limiting stress resistance.

Mots clés : CT_{max} , mitochondria, oxidative stress, ROS, health, omega-3

RÉSUMÉ

L'espèce humaine a des capacités très limitées de synthétiser les acides gras polyinsaturés à longue chaîne comme les oméga-3 (n-3). Alors que ces acides gras sont une composante essentielle des membranes cellulaires et que leurs bienfaits sur la santé des êtres humains sont indéniables. Il devient alors primordial de s'approvisionner en n-3 à travers notre alimentation et la source principale de ces derniers sont les poissons gras. Les stocks de poisson sauvages ayant atteint leur limite d'exploitation l'aquaculture a pris de plus en plus de place et représente aujourd'hui 50% de la production. L'industrie essaye d'augmenter davantage la quantité d'oméga-3 dans les poissons afin d'améliorer leur qualité nutritionnelle pour l'humain. Cependant, dû à leur structure les n-3 sont extrêmement sensibles aux processus de peroxydation, un processus enclenché par les espèces réactives de l'oxygène. Vu le contenu élevé en oméga-3 dans la chair des poissons, ils hautement susceptible au stress oxydatif causé par les espèces réactives de l'oxygène qui peut induire des dommages au niveau des lipides membranaires, des protéines et de l'ADN affectant négativement la santé des poissons.

Dans ce contexte, le but de cette thèse est de dresser une image complète de la santé des poissons en aquaculture et de l'effet du stress oxydatif sur deux marqueurs de la santé : la croissance et la résistance au stress thermique. Cela en partant de l'organisme entier, en passant par le cœur pour finir au niveau de la mitochondrie. Elle tente notamment de combler les lacunes béantes dans la compréhension des conséquences du contenu élevé en LC-PUFA des poissons en aquaculture au niveau de la biochimie mitochondriale, de la gestion du stress oxydatif et de l'homéostasie des poissons. Le modèle animal, l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*), l'omble de fontaine (*S. fontinalis*) et leurs hybrides ont été choisis en raison de leurs importances au niveau de l'industrie aquacole du Québec.

Le premier objectif était d'évaluer l'impact d'un régime riche en n-3 sur les performances de croissance, le profil d'acides gras de la chair, certains marqueurs du stress oxydatif et l'activité antioxydante dans les quatre groupes de salmonidés. Un aliment riche en oméga-3 induisait une perte au niveau des performances de croissance chez les quatre groupes. Ceci était accompagné d'une augmentation des dommages oxydatifs. La croissance semblait donc être un indicateur de la perte d'homéostasie corrélée aux marqueurs du stress oxydatif, soulignant

ainsi la validité de ces marqueurs comme étant représentatif de la santé des animaux. De plus les défenses antioxydantes endogènes semblaient avoir atteint leur limite de protection contre le stress oxydatif induite par les oméga-3, et ce même dans le traitement avec un aliment avec un taux de n-3 proches des aliments commerciales.

Le deuxième objectif était de déterminer s'il existe une corrélation entre la résistance au stress (une augmentation de la température), la teneur en acides gras du cœur et les taux de production de DRO dans nos quatre groupes de salmonidés. Nous avons démontré qu'il ne semble pas exister un lien direct avec la production de DRO à température élevée et la résistance à la température individuelle. Ici nous avons choisi de travailler sur des fibres cardiaques perméabilisées qui gardent intact l'environnement naturel de la mitochondrie. Il semblerait alors que, une production de DRO accrue induite par la température a été efficacement gérée par l'appareil cellulaire cardiaque. Vu que nous n'avons pas quantifié les dommages oxydatifs à ce stade-ci, il reste que c'est impossible de conclure sur une absence de corrélation entre stress oxydatif et résistance à la température. Par ailleurs nous avons pu déterminer un lien entre la résistance à la température et l'indice de peroxydation cardiaque, un indicateur de la susceptibilité au stress oxydatif. Ce dernier est nettement plus élevé pour les espèces et individus tolérant moins bien une augmentation rapide de la température. La susceptibilité au stress oxydatif induit par une plus grande quantité de n-3 semble alors étroitement liée à la gestion de l'homéostasie fonctionnelle du cœur pendant un stress.

Le dernier objectif était de déterminer l'effet d'une augmentation aiguë de la température sur des mitochondries cardiaques isolées de l'omble chevalier. Le cœur a été choisi comme organe dû à son rôle primordial dans l'adaptation des poissons à la température. Nous avons démontré qu'à des températures près de la limite maximale de cette espèce l'intégrité mitochondriale se détériorait et la production d'espèces réactives de l'oxygène augmentait significativement. La résistance à la température semble alors liée à la génération de DRO au niveau cardiaque. Le stress oxydatif serait donc être un paramètre qui augmente à températures élevées et détériore le fonctionnement mitochondrial ainsi limitant la résistance au stress thermique de cette espèce. Néanmoins, une approche in vitro comme les mitochondries isolées est loin des conditions physiologiques réelles. Nous n'avons donc pas pu conclure définitivement si cette

augmentation des espèces réactives de l'oxygène causait effectivement des dommages au niveau cardiaque.

Mots clés : CT_{max} , mitochondrie, stress oxydatif, DRO, homéostasie, oméga-3

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Il y a 200 000 ans, l'espèce humaine arrivait à un moment décisif de son évolution. La croissance de la taille du cerveau est passée d'une croissance qui était jusque-là linéaire à une augmentation exponentielle de la masse (Crawford et al., 1999 ; Ruff et al., 1997). Ce phénomène serait à l'origine de l'évolution remarquable d'*Homo spp.* grâce à une amélioration des capacités cognitives et une augmentation de la conception d'outils sophistiqués (Ambrose, 2001 ; Susman, 1994).

Cependant, l'élément déclencheur de ce changement drastique dans la croissance de la masse cérébrale reste le sujet de fervents débats dans la communauté scientifique. Plusieurs hypothèses tentent d'explorer ce phénomène. Une des approches explicatives se nomme la « *expensive tissue hypothesis* » (l'hypothèse du tissu coûteux) de Aiello et Wheeler (Aiello & Wheeler, 1995). Cette hypothèse tire son origine du fait que le taux métabolique de base des êtres humains et celui de leur plus proche parent, le genre des chimpanzés, sont semblables alors que l'humain possède un cerveau 2 à 3 fois plus grand et que sa demande en carburant métabolique est largement supérieure aux autres organes (Magistretti & Allaman, 2015). La question se posait alors : comment a-t-il pu y avoir un doublement de la masse cérébrale sans autant affecter le métabolisme de base ? Leur explication insinue qu'il existerait un compromis entre la taille du cerveau et celle du tractus digestif, ce dernier étant nettement moins développé chez le genre *Homo spp.* Le réacheminement de l'énergie métabolique mise à disposition par un rétrécissement de l'appareil digestif vers le cerveau aurait soutenu l'augmentation de son taux de croissance. Cette théorie est loin d'être acceptée de manière unanime dans la communauté scientifique. Elle a récemment été déconstruite par un article démontrant une absence de corrélation négative entre la taille du cerveau et la masse des organes digestifs (Navarrete et al., 2011). Les chercheurs ici proposent que l'augmentation de la masse cérébrale vienne plutôt d'une amélioration de la qualité nutritionnelle des aliments, d'un approvisionnement en nourriture plus constant et d'une diminution des dépenses énergétiques liées à la locomotion, la reproduction et la croissance.

L'amélioration du régime alimentaire constitue un point commun de plusieurs théories évolutives de l'expansion de l'encéphale. Une équipe de scientifiques autour des chercheurs

Crawford, Cunnane et Broadhurst proposent que cette bonification de l'alimentation se soit produite par le biais de l'inclusion d'aliments d'origine marine (Broadhurst et al., 2002 ; Crawford, 1992 ; Crawford et al., 1999 ; Cunnane et al., 2007). En effet, Crawford et al., 1999, soulignent que la majorité des fossiles appartenant à *Homo spp.* ont été découverts en milieu côtier ou en proximité de courants d'eau douce. De plus, des analyses d'isotopes stables des ossements de ces spécimens prouvent que la protéine animale qu'ils consommaient majoritairement était d'origine aquatique (Richards et al., 2001). Ce régime était avantage par l'abondance de crustacés, mollusques et poissons dans ces régions et par leur facilité d'accès (Broadhurst et al., 2002).

Cependant, d'après ces trois chercheurs, la principale différence d'un tel régime par rapport à un régime essentiellement terrestre est son contenu en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (LC-PUFA) et surtout en acide docohexaénoïque (ADH). Le nom LC-PUFA provient du fait que ces acides gras possèdent plusieurs doubles liaisons C=C. Le ADH, qui fait partie de la classe des oméga-3 (n-3), est l'acide gras le plus abondant dans le cerveau des mammifères (Innis, 2007) alors que la plupart d'entre eux, incluant l'humain, sont incapables de les synthétiser *de novo* et doivent s'en procurer par le biais de la nourriture. Le faible niveau d'abondance du ADH dans la chaîne alimentaire terrestre (Hixson et al., 2015) aurait limité l'expansion de la masse cérébrale. Conséquemment, la grande différence entre le ratio masse cérébrale/masse corporelle de l'humain et celui d'autres mammifères terrestres, comme le genre des chimpanzés (4,26 et 1,57 respectivement; Harvey and Clutton-Brock, 1985), serait induite par une grande divergence dans le contenu en ADH de leurs régimes alimentaires (Crawford et al., 1999). Cette hypothèse semble confirmée par une récente augmentation du nombre d'études sur le cerveau soulignant l'importance des oméga-3 dans son fonctionnement. En effet, les oméga-3 (surtout le ADH) jouent un rôle dans le vieillissement du cerveau (Denis et al., 2015), dans la prévention de maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer (Thomas et al., 2015) et pendant le développement de celles-ci (Lassek & Gaulin, 2015 ; Lauritzen et al., 2016).

0.1 Les oméga-3 et la santé humaine

L'omniprésence des n-3 dans la recherche sur la santé humaine (Calder, 2014 ; Simopoulos, 2008 ; Wall et al., 2010a ; Yashodhara et al., 2009) ne peut que témoigner du rôle primordial que ces acides gras ont pu jouer dans l'évolution de l'espèce humaine. La découverte du rôle essentiel que jouent les n-3 dans la santé humaine date des années 60-70. Une augmentation exponentielle de l'incidence des maladies cardiovasculaires dans les années 60 mettait pression sur la communauté médicale et scientifique à trouver la cause de la propagation massive de ces maladies. Même si cela n'a été prouvé que dans les années 2000 (Hunter, 2005), les chercheurs associaient ces maladies à un changement important dans l'approvisionnement en nourriture des êtres humains. Ce changement était largement encouragé par la révolution industrielle et l'intensification du machinisme agricole rendant plus accessibles les huiles de graines de céréales riches en oméga-6 (n-6). De plus en plus de ces acides gras étaient introduits dans l'alimentation en même temps que la consommation d'oméga-3 diminuait, déplaçant ainsi le ratio entre les deux en faveur des oméga-6 (Simopoulos, 2002, Fig.0.1).

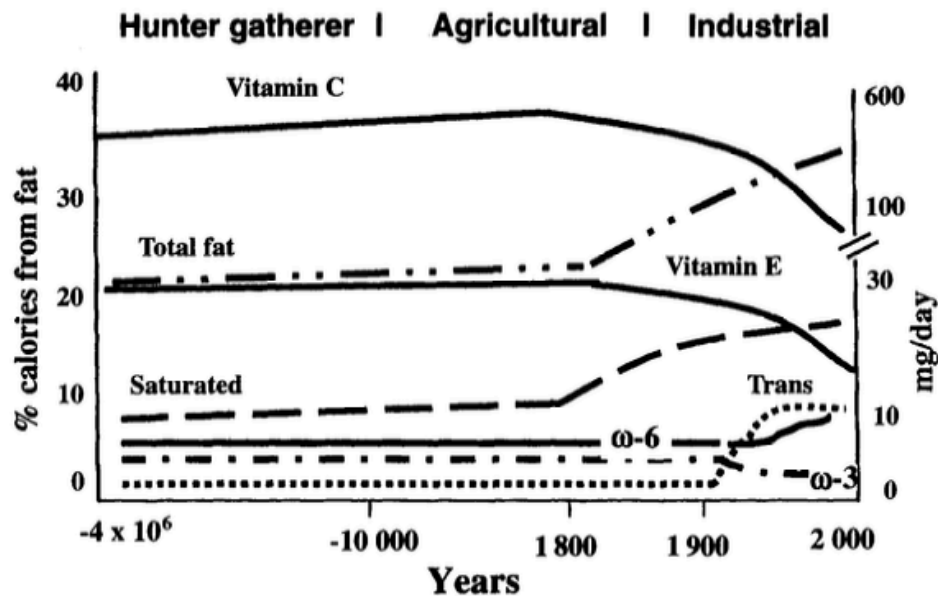


Figure 0.1 : Représentation théorique de l'évolution du régime alimentaire, tirée de Simopoulos, 2001.

En même temps, plusieurs observations venaient souligner l'importance des n-3 dans la santé cardiovasculaire. Par exemple, l'équipe de Bang a mis en évidence un faible taux de maladies

cardiovasculaires chez un peuple autochtone vivant au Groenland, dont le régime alimentaire était principalement constitué de viandes riches en n-3 (Bang et al., 1971). De plus, au Japon, les personnes dont le régime alimentaire était marqué par une grande consommation d'oméga-3 sous forme de poisson démontraient elles aussi une incidence moindre de maladies liées au système circulatoire (Hirai et al., 1980). Dans les deux cas, les chercheurs associaient une mortalité inférieure induite par ce type de maladie à une forte concentration en oméga-3 du plasma sanguin menant à une augmentation de la fluidité sanguine et à une réduction du taux de formation de thrombocytes souvent à l'origine d'un AVC. Les exemples de conséquences bénéfiques des n-3 et de leurs métabolites sur la santé humaine sont nombreux : une diminution d'apparition d'ulcères et une réduction de maladies cardiovasculaires, chroniques et inflammatoires (Barbosa et al., 2003 ; Hudert et al., 2006 ; Kris-Etherton, 2002 ; Lordan et al., 2011 ; C. Wang & Harris, 2006). Aujourd'hui, il est largement accepté que le déplacement du ratio N3/N6 en faveur des n-6 soit responsable d'une multitude de maladies (Patterson et al., 2012). Afin de comprendre les modes d'action des oméga-3 et oméga-6 et comment ils peuvent avoir un effet sur la santé, il faut en savoir plus sur leur structure et leurs voies de synthèse et de dégradation.

0.2 Les rôles et les voies de synthèse des oméga-3 et oméga-6

Les principaux n-3, soit l'AEP, le DPA et le ADH, se retrouvent surtout dans les membranes cellulaires et mitochondriales, et la plupart de leurs effets fonctionnels dépendent de leur incorporation dans ces membranes (Calder, 2014). Leur structure influence les propriétés physicochimiques des membranes et module le fonctionnement des protéines transmembranaires. Ainsi, ils agissent sur la signalisation cellulaire entre autres à travers l'activation ou l'inhibition de certains facteurs de transcription et la modulation de l'expression génétique qui en découle (Rodríguez-Cruz & Serna, 2017). La dégradation ciblée des oméga-3 produit des molécules antiinflammatoires appelées « résolvines », alors que la dégradation des n-6 entraîne la production de molécules pro-inflammatoires. Ce mécanisme semble être à l'origine de l'effet bénéfique des n-3 sur les maladies inflammatoires, le système immunitaire et la thrombose (Moro et al., 2016). Autrement dit, le déséquilibre du ratio N3/N6 pendant la dernière décennie a joué en faveur de la voie de dégradation des n-6 et de la production de

métabolites pro-inflammatoires, induisant ainsi cette augmentation exponentielle de l'incidence de maladies cardiovasculaires dans les années 60 (Simopoulos, 2006). Une autre raison pour le débalancement du ratio N3/N6 s'explique à partir des voies de synthèse des LC-PUFA (Fig. 0.2). Premièrement, à cause de leur incapacité à synthétiser de doubles liaisons C=C aux positions n-3 et n-6, les mammifères (et les poissons) doivent se procurer les acides gras dans leur nourriture. De ce fait, les acides linoléiques et alpha linoléiques se nomment des « acides gras essentiels » (Burr, 2000). L'humain ainsi que le poisson ont une capacité très limitée de synthétiser d'autres n-3 et n-6 à partir de leurs précurseurs, et loin d'être suffisante pour soutenir les besoins de l'organisme. De plus, les voies de désaturation et d'élongation des n-3 et n-6 partagent les mêmes enzymes; ils entrent donc en compétition directe (Calder, 2015). Vu que le régime alimentaire est manifestement dominé par les n-6, l'activité de synthèse déjà très faible se situe surtout du côté des oméga-6. Donc, étant donné notre incapacité de synthétiser efficacement des oméga-3, le rôle primordial des oméga-3 dans notre santé, la place centrale que le ADH joue dans le développement et le vieillissement du cerveau et surtout en raison d'un déséquilibre flagrant du ratio N3/N6 dans notre régime alimentaire, l'humain doit consommer des oméga-3 à travers sa nourriture afin d'améliorer sa santé.

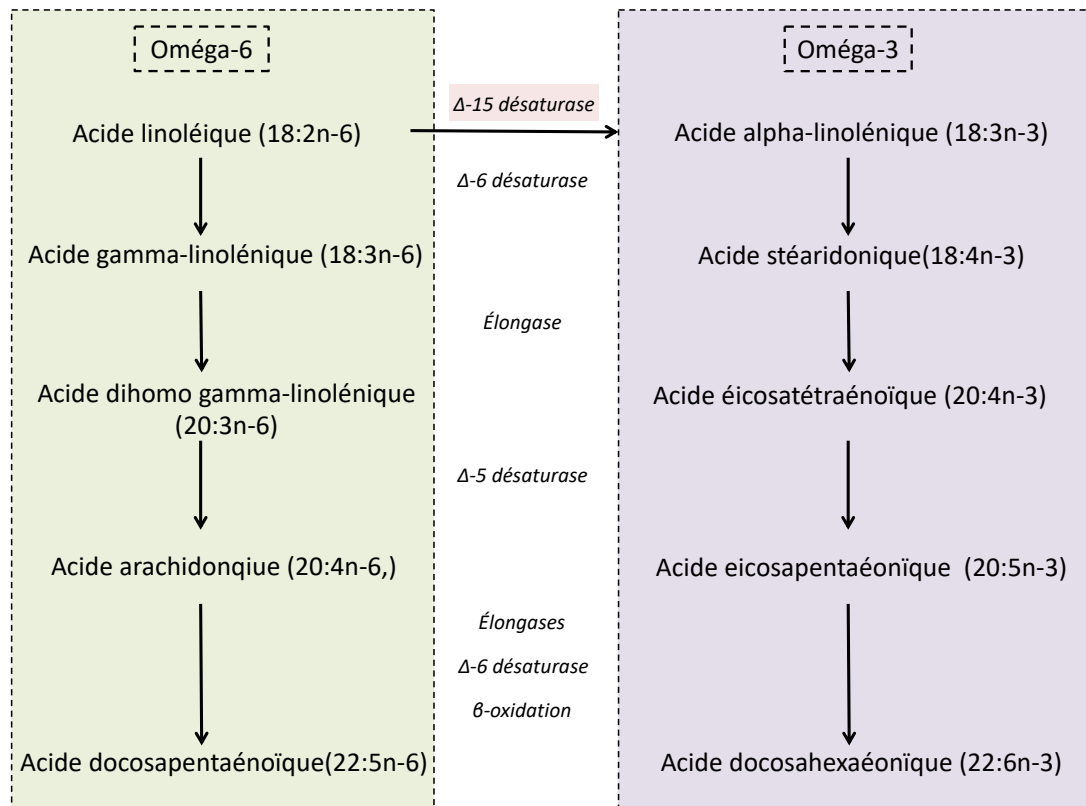


Figure 0.2: Conversion d'acides gras issus de plantes en acides gras à longue chaîne et polyinsaturés.

0.3 Les poissons comme source d'oméga-3

Les principales sources d'oméga-3 sont les fruits de mer et surtout les poissons gras comme les salmonidés, le maquereau ou encore le hareng (FAO, 2014). Ces poissons sont naturellement riches en n-3 par bioaccumulation à travers la chaîne alimentaire, en partant du phytoplancton. Ce dernier possède la capacité de synthétiser efficacement les oméga-3 *de novo* en raison de la présence de la delta-15 désaturase (Fig. 0.2). Toutefois, plus de 50 % des stocks de poissons pêchés commercialement sont surexploités et les pêcheries mondiales stagnent (Worm et al., 2009). De ce fait, le secteur de l'aquaculture a pris de plus en plus de place dans l'approvisionnement en poissons et représente aujourd'hui la moitié du poisson consommé mondialement (FAO, 2014). Néanmoins, il existe un paradoxe : l'aliment utilisée en aquaculture pour nourrir les poissons est majoritairement élaborée à partir de poissons fourrages et contribue donc à augmenter la pression exercée sur la pêche de ces espèces (Tacon

& Metian, 2015). Il s'avère donc indispensable de développer des solutions durables quant à l'alimentation du poisson en aquaculture (Lenihan-Geels et al., 2013). Un exemple de solution prometteuse est la culture de microalgues capables de synthétiser des oméga-3 *de novo* ou encore de plantes génétiquement modifiées possédant les gènes nécessaires à la synthèse de n-3 (Adarme-Vega et al., 2014). Une autre alternative a fait sujet de multiples recherches dans les 20 dernières années et portait sur le remplacement des farines et huiles d'origine marine par une alternative à base de plantes terrestres (riche en n-6 et pauvre en n-3). Cependant, enlever toute source marine dans la formulation de l'aliment a des conséquences négatives sur l'apport en LC-PUFA et surtout, le faible taux d'oméga-3 rend la chair moins intéressante pour la consommation humaine (Bell et al., 2001; Turchini et al., 2009). Comme chez l'humain, les n-3 sont une composante essentielle des membranes cellulaires, constituent une source d'énergie incontournable et sont nécessaires à une bonne croissance chez le poisson (Tocher, 2010). Une carence en oméga-3 peut alors affecter négativement la santé des poissons. La santé étant définie par la capacité du poisson de réagir et de s'adapter à des changements dans son milieu et/ou d'en contrôler les impacts (Frankish et al., 2001). Dans certains cas, un régime pauvre en n-3 peut détériorer cette capacité et causer une diminution de la croissance, un arrêt des activités liées à la reproduction, diverses pathologies ou encore causer la mort de l'animal (Das, 2006). D'après Tocher, il y a trois niveaux d'approvisionnement en oméga-3 chez les poissons en aquaculture : 1) un niveau de base qui permet la survie de l'organisme et qui n'affecte pas sa santé globale; 2) un niveau assurant un taux de croissance maximale; et 3) un niveau qui dépasse de loin les besoins nutritionnels de l'animal, mais augmente sa qualité nutritionnelle (Tocher, 2015). Non seulement ce troisième point assurerait un apport élevé en n-3 au consommateur, mais aurait aussi des effets positifs sur la rentabilité de l'industrie piscicole. Depuis quelques années, plusieurs recherches visent à augmenter quantité de n-3 dans la chair de poisson. Toutefois, ils existent des limites supérieures quant à la quantité maximale de n-3 que peut contenir un poisson sans affecter sa santé.

0.4 Oméga-3 et stress oxydatif – *The dark side of n-3*

Une stratégie pour augmenter le contenu en n-3 dans la chair du poisson est de simplement enrichir sa nourriture en n-3. Néanmoins, un excès de n-3 dans les aliments peut entraîner des

effets néfastes sur la santé. Un régime alimentaire riche en n-3 augmente la quantité de ces derniers dans la chair, mais provoque une diminution du taux de croissance chez l'omble chevalier (Olsen & Henderson, 1997) et la carpe (*Carassius auratus gibelio* Chen et al., 2011). Cette détérioration de la santé serait induite par une augmentation de la dégradation des lipides (Olsen et al., 1999 ; Tocher et al., 2003). Ce phénomène est lié à la structure des LC-PUFA. Les nombreuses doubles liaisons carbone-carbone fragilisent les liaisons C-H à proximité, facilitant l'arrachement des atomes d'hydrogène et les rendant extrêmement sensibles au processus d'oxydation, on parle alors de peroxydation. Par la suite, les métabolites de la peroxydation des lipides peuvent réagir avec les LC-PUFA membranaires adjacents. Une réaction en chaîne en résultera et aura des impacts sur la fluidité et la perméabilité membranaire ainsi que sur le métabolisme (Nigam & Schewe, 2000), entraînant un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire de l'organisme avec des conséquences néfastes sur la santé du poisson. En raison de la haute teneur en LC-PUFA dans la chair des poissons, ceux-ci sont extrêmement sensibles aux processus de peroxydation (Filho, 2007).

Les dommages aux lipides sont principalement induits par des molécules hautement réactives : les dérivés réactifs de l'oxygène (*DRO*, *tableau 0.1*).

Tableau 0.1 : Liste des dérivés réactifs tirée de Halliwell and Gutteridge (2015)

Free radicals	Non-radicals
Reactive oxygen species (ROS)	Reactive oxygen species (ROS)
Superoxide, $O_2^{\bullet-}$	Hydrogen peroxide, H_2O_2
Hydroxyl, OH^{\bullet}	Hypobromous acid, $HOBr^{a,b}$
Hydroperoxyl, HO_2^{\bullet}	Hypochlorous acid, $HOCl^b$
Carbonate, $CO_3^{\bullet-}$	Singlet oxygen, $O_2^1\Delta_g$
Peroxyl, RO_2^{\bullet}	Organic peroxides, $ROOH$
Alkoxy, RO^{\bullet}	Peroxynitrite, $ONOO^{-c}$
Carbon dioxide, $CO_2^{\bullet-}$	Peroxynitrate, O_2NOO^{-c}
Singlet $O_2^1\Sigma_g^+$	Peroxynitrous acid, $ONOOH^c$
	Peroxynitric acid, O_2NOOH^c
	Nitrosoperoxy carbonate, $ONOOCO_2^-$
	Peroxomonocarbonate, $HOOCO_2^-$
Reactive chlorine species (RCS)	Reactive chlorine species (RCS)
Atomic chlorine, Cl^{\bullet}	Hypochlorous acid, $HOCl^b$
	Nitryl chloride, NO_2Cl^d
	Nitrosyl chloride, $NOCl^d$
	Chloramines
	Chlorine gas, Cl_2
	Bromine chloride, $BrCl^b$
	Chlorine dioxide, ClO_2
Reactive bromine species (RBS)	Reactive bromine species (RBS)
Atomic bromine, Br^{\bullet}	Hypobromous acid, $HOBr^b$
	Bromine gas, Br_2
	Bromine chloride, $BrCl$
Reactive nitrogen species (RNS)	Reactive nitrogen species (RNS)
Nitric oxide, NO^{\bullet}	Nitrous acid, HNO_2
Nitrogen dioxide, NO_2^{\bullet}	Nitrosyl cation, NO^+
Nitrate radical, NO_3^{\bullet}	Nitroxyl anion, NO^-
	Dinitrogen tetroxide, N_2O_4
	Dinitrogen trioxide, N_2O_3
	Peroxynitrite, $ONOO^{-c}$
	Peroxynitrate, O_2NOO^{-c}
	Peroxynitrous acid, $ONOOH^c$
	Peroxynitric acid, O_2NOOH^c
	Nitronium (nitryl) cation, NO_2^+
	Alkyl peroxy nitrites, $ROONO$
	Alkyl peroxy nitrates, RO_2ONO
	Nitryl chloride, NO_2Cl
	Peroxyacetyl nitrate, $CH_3C(O)OONO^e$

'Reactive oxygen species' is a collective term for agents more reactive than O_2 itself (Section 1.9) and includes both oxygen radicals and certain non-radicals that are oxidizing agents and/or are easily converted into radicals (such as $HOCl$, $HOBr$, $ONOO^-$, H_2O_2). Peroxynitrite and H_2O_2 are frequently erroneously described in the literature as free radicals, for example. **All oxygen radicals are ROS, but not all ROS are oxygen radicals.** Remember of course that O_2 is itself a radical! (Fig. 1.14). 'Reactive nitrogen species' is a similar collective term that includes NO^{\bullet} and NO_2^{\bullet} , as well as non-radicals such as HNO_2 and N_2O_4 . 'Reactive' is not always an appropriate term: H_2O_2 , NO^{\bullet} , and $O_2^{\bullet-}$ react fast with few molecules, whereas OH^{\bullet} reacts fast with almost everything. Species such as RO_2^{\bullet} , NO_3^{\bullet} , RO^{\bullet} , $HOCl$, $HOBr$, $CO_3^{\bullet-}$, $CO_2^{\bullet-}$, NO_2^{\bullet} , $ONOO^-$, Cl^{\bullet} , Br^{\bullet} , NO_2^+ , and O_3 have intermediate reactivities.

^a $HOBr$ and $BrCl$ could also be regarded as RBS. ^b $HOCl$ and $HOBr$ are often included as ROS.

^c $ONOO^-$, O_2NOO^- , O_2NOOH , and $ONOOH$ are often included as ROS.

^d NO_2Cl and $NOCl$ can also be regarded as RNS. ^e An oxidizing species formed in polluted air.

Le tableau 1 met en évidence la grande diversité des dérivés réactifs qui existent soit les dérivées de l'oxygène, mais également ceux de l'azote, du chlore et du brome. Les DRO sont généralement séparées en deux grandes catégories : les radicaux libres et les dérivés réactifs non radicalaires. La différence majeure entre les deux est que les radicaux libres possèdent un électron non apparié. Cette caractéristique les rend beaucoup plus réactifs parce qu'ils vont chercher à arracher un électron d'autres molécules (comme les LC-PUFA) pour avoir deux électrons appariés. Ils vont ainsi oxyder les molécules auxquelles ils s'attaquent et qui deviennent à leur tour des radicaux libres. A basse concentration, plusieurs DRO sont indispensables dans de multiples processus biochimiques et sont des molécules messagères dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires, notamment l'apoptose, la croissance cellulaire, le développement (Finkel, 2011 ; Turrens, 2003) ou encore le vieillissement (Cui et al., 2012). Une surproduction de DRO et/ou une élimination insuffisante peut causer ce qu'on appelle le « stress oxydatif ». Dans ce cas, les DRO peuvent induire des dommages non seulement aux lipides, mais aussi aux protéines ou encore, au niveau de l'ADN (Halliwell & Gutteridge, 2015). Chez les poissons, le stress oxydatif peut être provoqué par une surexposition à des produits toxiques (Gabriel et al., 2013), par une diminution de la disponibilité en oxygène (Clanton, 2007) ou encore par une augmentation de la température (Vinagre et al., 2012). L'organisme possède de nombreux mécanismes de défense antioxydants endogènes et exogènes face à ce stress oxydatif. Par exemple, les agents dits « sacrificiels », comme l'alpha-tocophérol (Serbinova et al., 1991) ou les plasmalogènes (Braverman & Moser, 2012), qui vont réagir de manière préférentielle avec les DRO dans un ratio 1 :1, afin de protéger d'autres molécules telles les lipides membranaires. Une autre classe d'agents sacrificiels sont les caroténoïdes (telle l'astaxanthine) qui sont capables de physiquement capter certains radicaux libres éliminant ainsi leur toxicité (Edge & Truscott, 2018 ; Kobayashi & Sakamoto, 1999). Les protéines chaperon telles les HSP (heat shock proteins) expriment leur pouvoir antioxydant en protégeant des structures telles l'ADN, les lipides membranaires ou encore d'autres protéines contre le stress oxydatif (Kalmar & Greensmith, 2009). Une des barrières de défense antioxydantes les plus étudiées sont les enzymes antioxydants tels la catalase, la superoxyde dismutase ou encore la thiorédoxine réductase. Contrairement aux molécules comme l'alpha tocophérol dont le pouvoir antioxydant est directement proportionnel au nombre de molécules présentes, les enzymes ne sont pas affectées par l'interaction avec le

DRO. Il faut toutefois mentionner que les enzymes antioxydants nécessitent des cofacteurs impliqués dans les réactions de détoxification qui eux peuvent s'épuiser de la même façon que les antioxydants exogènes, et doivent donc être régénérés (tel le zinc ou le cuivre chez la superoxyde dismutase). Ces enzymes antioxydants sont capables d'éliminer de légères surproductions de DRO (Martínez-Álvarez et al., 2005). La modification du profil lipidique de l'aliment est reconnue pour affecter l'activité et l'expression génétique de certaines de ces enzymes tels la glutathione réductase et la catalase. (Fontagné-Dicharry et al., 2014 ; Fontagné et al., 2008). Cependant, cette première ligne de défense ne semble pas suffisante pour contrer les effets négatifs d'un aliment enrichie en n-3 (Olsen & Henderson, 1997 ; Tocher et al., 2003). Beaucoup de recherche porte sur les effets protecteurs des antioxydants exogènes (tel l'astaxanthine et le tocophérole) contre le stress oxydatif, et il est reconnu qu'une augmentation de la quantité en n-3 dans l'aliment doit nécessairement être accompagnée d'une dose adéquate d'antioxydants exogènes (Kiessling et al., 2003 ; Olsen et al., 1999 ; Tocher et al., 2002). En dépit de leur pouvoir antioxydant, ces micronutriments, même en travaillant de concert avec les enzymes antioxydantes endogènes, ne suffisent pas toujours pour inhiber les effets négatifs du stress oxydatif sur la santé des poissons (Olsen & Henderson, 1997 ; Takeuchi et al., 1992).

Ainsi, considérant le contenu élevé en LC-PUFA et la sensibilité des poissons au stress oxydant, une augmentation de la concentration de n-3 dans la chair, afin d'assurer un effet bénéfique sur la santé du consommateur, risque d'entraîner une détérioration de la santé de l'organisme. Le contenu élevé en LC-PUFA et surtout en n-3 dans les aliments commerciaux entraînent une concentration plus élevée de n-3 dans les poissons d'élevage que dans les poissons sauvages (Henriques et al., 2014). Cette concentration élevée en LC-PUFA exacerbe le risque de subir des dommages induits par le stress oxydatif (Sargent et al., 1999). Par ailleurs, l'optimisation du taux de croissance en aquaculture a poussé les poissons à leur limite physiologique. La mortalité suite à un événement stressant comme la manutention normale augmentent avec l'augmentation de la croissance. Les recherches mettent ici en lien des problèmes liés à l'obésité et l'apparition de maladies du système cardiovasculaire (Ferguson et al., 1990 ; Gamperl & Farrell, 2004 ; Poppe et al., 2003). À notre connaissance, il y a peu de recherche examinant le lien entre le contenu élevé en LC-PUFA, la susceptibilité au stress oxydatif et la réduction de la tolérance au stress des poissons en aquaculture.

Afin de comprendre les modes d'action du stress oxydatif et de son effet au sens large sur l'homéostasie interne d'un organisme et ainsi sa santé, il faut examiner l'origine et le principal lieu de production de DRO : la mitochondrie.

0.5 La mitochondrie

La mitochondrie est un organite cellulaire présent dans les cellules de la vaste majorité des eucaryotes. Elle est communément appelée « la centrale énergétique de la cellule » puisqu'elle produit la majeure partie de l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). La mitochondrie est composée d'une membrane interne et une membrane externe délimitant l'espace inter-membranaire de la matrice (Fig. 0.3). La production d'énergie est réalisée à travers un ensemble de complexes enzymatiques situés dans la membrane interne lors de la phosphorylation oxydative. Cet assemblage de complexes protéiques s'appelle le « système de transport des électrons » (ETS) (Fig. 0.3). Il a pour but principal de transporter les électrons à travers les différents complexes respiratoires jusqu'à l'accepteur final : l'oxygène.

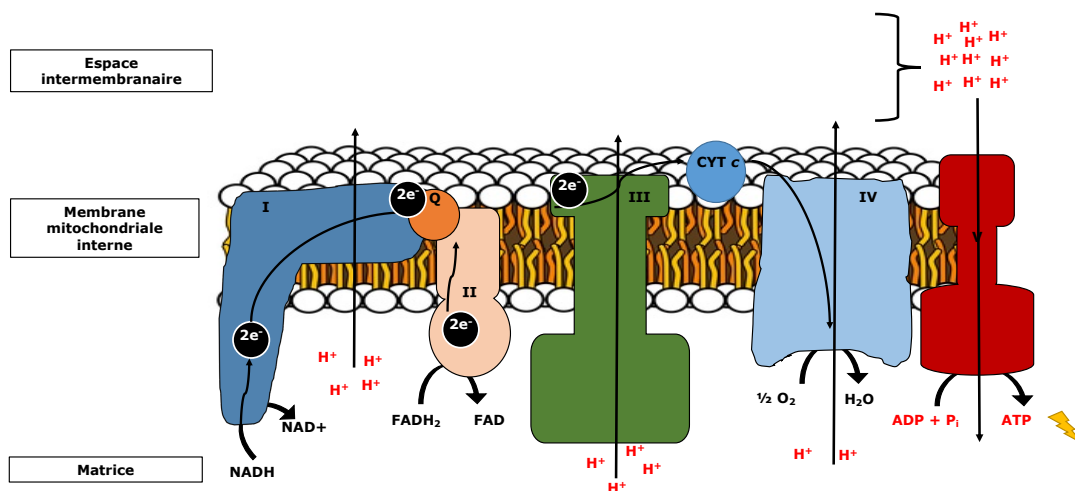


Figure 0.3 : Représentation schématique du système de transport des électrons. La figure a été mise à disposition par Enrique Rodriguez (MS).

L'entrée d'électrons se fait principalement au niveau du complexe I (NADH coenzyme-Q réductase) et du complexe II (Succinate coenzyme-Q réductase). L'apport en électrons est assuré par des équivalents réduits (NADH et FADH₂) qui proviennent de l'oxydation des sucres (cycle de Krebs) ou par la β -oxydation des acides gras. Par la suite, deux électrons par équivalent réduit sont transférés à l'ubiquinone (Q) qui est ainsi réduite en ubiquinol. L'étape suivante est le passage par le complexe III (Coenzyme-Q cytochrome c réductase). Ici, l'ubiquinol est reoxydé en ubiquinone en réduisant le cytochrome c (Cyt C). Ce dernier assure le transfert des électrons vers le complexe IV (Cytochrome c oxydase) et ensuite le passage vers l'accepteur final; l'oxygène y est réduit en eau. On parle alors de « respiration mitochondriale ». Pendant ces réactions d'oxydoréduction, quatre protons ont pu être transférés de la matrice vers l'espace intermembranaire au niveau du complexe I et III. Deux autres ont été transférés au niveau du complexe IV. Ces protons (H⁺) sont relocalisés dans l'espace intermembranaire, créant alors un gradient électrochimique. Ce gradient est à l'origine de la production d'ATP en canalisant le surplus de protons précédemment créé, à travers le complexe V (ATP synthase). Ce processus libère l'énergie nécessaire pour synthétiser l'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (P_i).

0.6 Mitochondrie et DRO

C'est ici, pendant le transfert des électrons à travers l'ETS, qu'une grande partie de ces métabolites hautement réactifs, les DRO, sont formées. Un des principaux DRO et le précurseur de la majorité des DRO, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), se forme lorsqu'une molécule d'oxygène rencontre un électron libre dans le système de transport des électrons. Les complexes I, II et III sont les principaux sites de production de DRO (Fig. 0.4). Plus

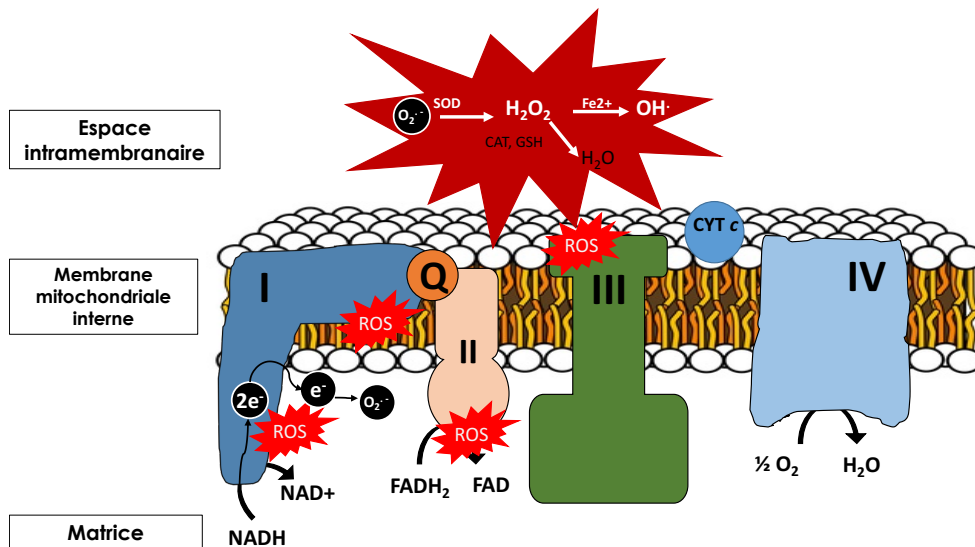


Figure 0.4 : Représentation schématique du système de transport des électrons avec les principaux sites de production de ROS. De plus, les trois principaux antioxydants sont présentés : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion (GSH). La figure a été mise à disposition par Enrique Rodriguez (MS).

spécifiquement, il existe au total dix sites de production de DRO sur ces trois complexes, variant selon leur capacité de générer les DRO (Goncalves et al., 2015). Il est possible d'induire une augmentation de la production d'anions superoxydes en utilisant des inhibiteurs spécifiques des complexes I et III (roténone et antimycine A respectivement). Lors d'une inhibition d'un des complexes, le passage des électrons est bloqué, ce qui crée une accumulation de ces derniers. Par conséquent, le risque de rencontrer une molécule d'oxygène est multiplié, ce qui entraîne une augmentation de la production de DRO. En condition naturelle, la vitesse de formation de DRO dépend de l'activité de l'ATPase, du ratio $NADH/NAD^+$, de l'intensité du gradient électrochimique et de la concentration en oxygène

dans le milieu cellulaire (Murphy, 2009). En plus de la possible dismutation spontanée, l'anion superoxyde peut être dismuté par la superoxyde dismutase mitochondrial (MnSOD) à l'intérieur de la matrice, ou par une autre forme de superoxyde dismutase (CuZnSOD) dans l'espace intramembranaire (Fukai & Ushio-Fukai, 2011). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ainsi formé sera transformé en eau par la catalase ou le glutathion peroxydase (Fig. 0.4, Apel and Hirt, 2004). En présence de Fe^{2+} , des radicaux d'hydroxyle ($OH\cdot$) peuvent être formés par les réactions de Haber-Weiss et Fenton (Kehrer, 2000). Les dommages aux lipides sont causés majoritairement par les radicaux peroxydes et l' $OH\cdot$ par l'intermédiaire du processus de la peroxydation (Catalá, 2010). La mitochondrie est par ailleurs capable de réguler la production et la consommation de DRO en fonction de l'état physiologique dans lequel elle se trouve (Munro & Treberg, 2017).

Pour ces raisons, les mitochondries jouent un rôle central dans l'homéostasie des espèces réactives de l'oxygène et du métabolisme énergétique tant au niveau cellulaire, tissulaire qu'à celui de l'organisme entier (Cheng & Ristow, 2013 ; Dunn et al., 2015 ; Ježek & Hlavatá, 2005 ; Shadel & Horvath, 2015). Un déséquilibre de l'homéostasie des DRO provoqué par un stress biotique ou abiotique, par exemple des contaminants dans l'eau (Farombi et al., 2007 ; Risso-De Faverney et al., 2004 ; Slaninová et al., 2009), la température (Banh et al., 2016), ou encore une altération du régime alimentaire (Kjær et al., 2008), peut affecter les fonctions mitochondriales. Une augmentation de la température du milieu a des impacts majeurs sur les organismes ectothermes comme les poissons (Pörtner & Knust, 2007), et les mitochondries semblent jouer un rôle pivot dans la capacité des poissons d'y faire face. Cette capacité a récemment été avancée comme un bon indicateur de l'intégrité fonctionnelle et ainsi de leur santé (Claireaux et al., 2013 ; Roze et al., 2013). Nous proposons donc d'utiliser un test de résistance au stress thermique comme indicateur de la perte d'intégrité fonctionnelle ou de l'état de santé général des poissons. Cette approche méthodologique permettra d'explorer les liens potentiels entre le métabolisme mitochondrial, la gestion de l'homéostasie des DRO et la résistance au stress des poissons. Ce test de résistance au stress thermique permet de déterminer la limite supérieure de tolérance thermique (CT_{max}) d'un individu.

$0.7 CT_{max}$

Le CT_{max} représente la température à laquelle le poisson perd ses capacités de locomotion et sa capacité de maintenir l'équilibre, indiquant ainsi une atteinte à l'intégrité de l'homéostasie pendant une augmentation aigüe de la température (Becker & Genoway, 1979 ; Cowles & Bogert, 1944). La détermination du CT_{max} des poissons est une méthode couramment utilisée dans les études de physiologie comparative (Anttila et al., 2013 ; Penney et al., 2014), afin d'évaluer le potentiel d'acclimatation aux changements climatiques (Ekström et al., 2016 ; Farrell et al., 2009a) ou encore l'impact d'un polluant sur les performances d'un organisme

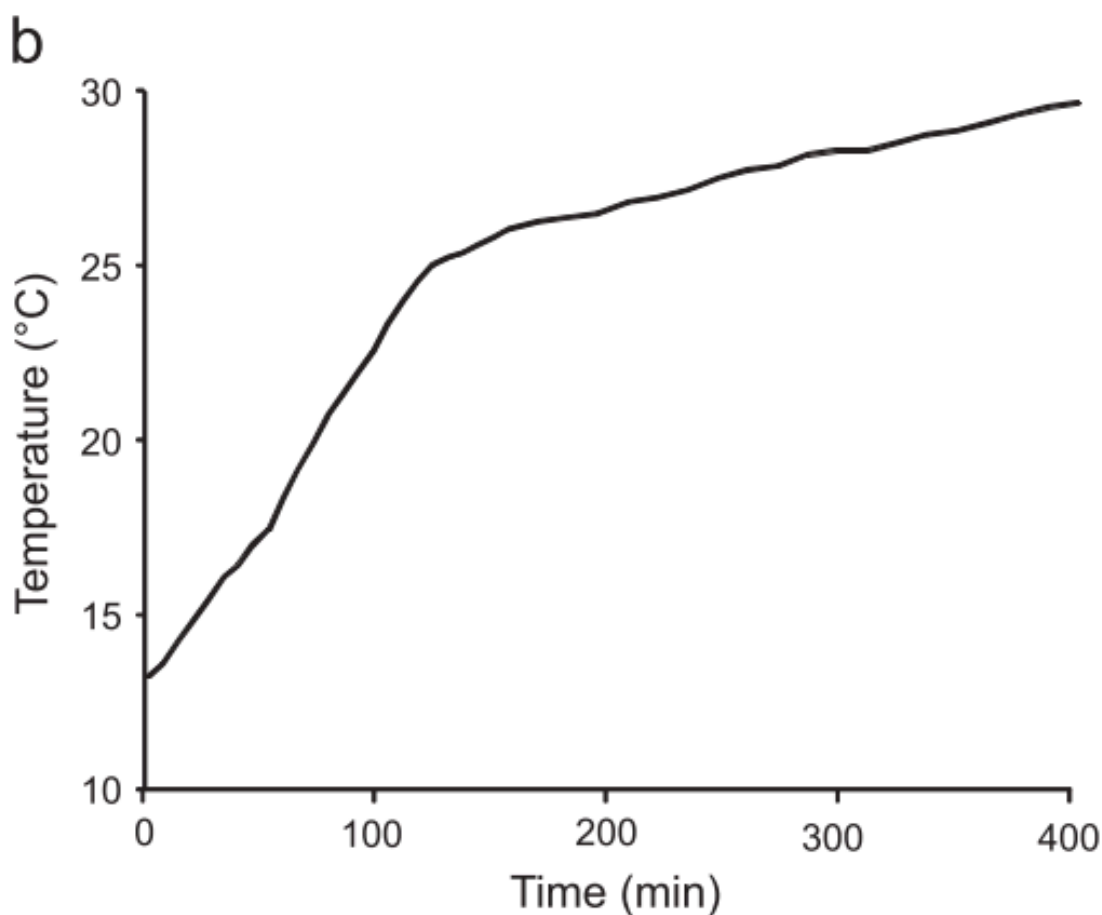


Figure 0.5 : Augmentation de la température de l'eau d'un bassin expérimental. Tirée de Roze et al., 2013.

(Anttila et al., 2017 ; Claireaux et al., 2013 ; Patra et al., 2007). L'évaluation de la répétabilité de la mesure de ce trait a récemment été utilisée afin de souligner la pertinence du CT_{max} en tant qu'indicateur de la tolérance thermique des poissons et marqueur de l'état physiologique général (Morgan et al., 2018). Selon le protocole d'augmentation de la température utilisé pour déterminer le CT_{max} , le résultat final a toutefois tendance à varier (Galbreath et al., 2004). Pour cette raison il est primordial d'utiliser sensiblement le même protocole d'une expérience afin d'évaluer l'impact d'un polluant par exemple ou alors pour comparer ses résultats avec la littérature. Le protocole utilisé pour déterminer le CT_{max} dans cette thèse est tiré de Roze et al., 2013 (Fig. 0.5). Il débute avec une augmentation rapide de la température d'acclimatation jusqu'à approximativement 20°C. Par la suite la température augmente d'environ 2°C par heure, jusqu'au moment que le dernier poisson aie atteint son CT_{max} . Afin corrélérer la performance dans ce test à la gestion du stress oxydatif au niveau mitochondrial et la composition en acides gras des membranes, nous avons choisi de travailler sur des mitochondries cardiaques. Ce choix est inspiré des recherches récentes sur le rôle central que semble jouer le cœur dans la capacité des ectothermes de faire face à des variations de température (Eliason & Anttila, 2017).

0.8 Le rôle central du cœur

Une augmentation de la température entraîne une accélération du métabolisme et augmente les besoins énergétiques de l'organisme (Hochachka & Somero, 1968). Pour contrer l'effet direct de la température et fournir l'énergie nécessaire pour supporter l'augmentation du taux métabolique, les cœurs des poissons sont munis de multiples mécanismes d'adaptation ou d'acclimatation aux variations de la température. Par exemple, la morphologie du ventricule semble jouer un rôle primordial dans la tolérance thermique. Chez le saumon atlantique (*Salmo salar*), la masse cardiaque et la tolérance aux changements de température sont corrélées (Anttila et al., 2013). L'équipe de la docteure Anttila a mis en évidence que des individus avec une masse ventriculaire supérieure auraient un CT_{max} plus élevé que leurs congénères (Fig. 0.6). Ils concluaient qu'une masse ventriculaire plus importante par rapport à la masse totale d'un individu, accompagnée d'un débit cardiaque plus élevé, permettrait un meilleur apport en oxygène au niveau tissulaire. Contrairement à cette interprétation, Clark et al., 2008,

émettaient l'hypothèse que des individus avec un cœur plus grand auraient une moins bonne oxygénation du myocarde spongieux limitant ainsi la tolérance thermique maximale. Les moyens d'acclimatation du cœur des poissons à la température sont nombreux et se manifestent entre autres par des changements de la fréquence cardiaque, du volume d'éjection ou de la force d'éjection systolique (Keen et al., 2017).

Aujourd'hui, plusieurs hypothèses proposent que le cœur est le premier organe à faire défaillance lors d'une augmentation de la température (Farrell et al., 2009b, 1996 ; Somero,

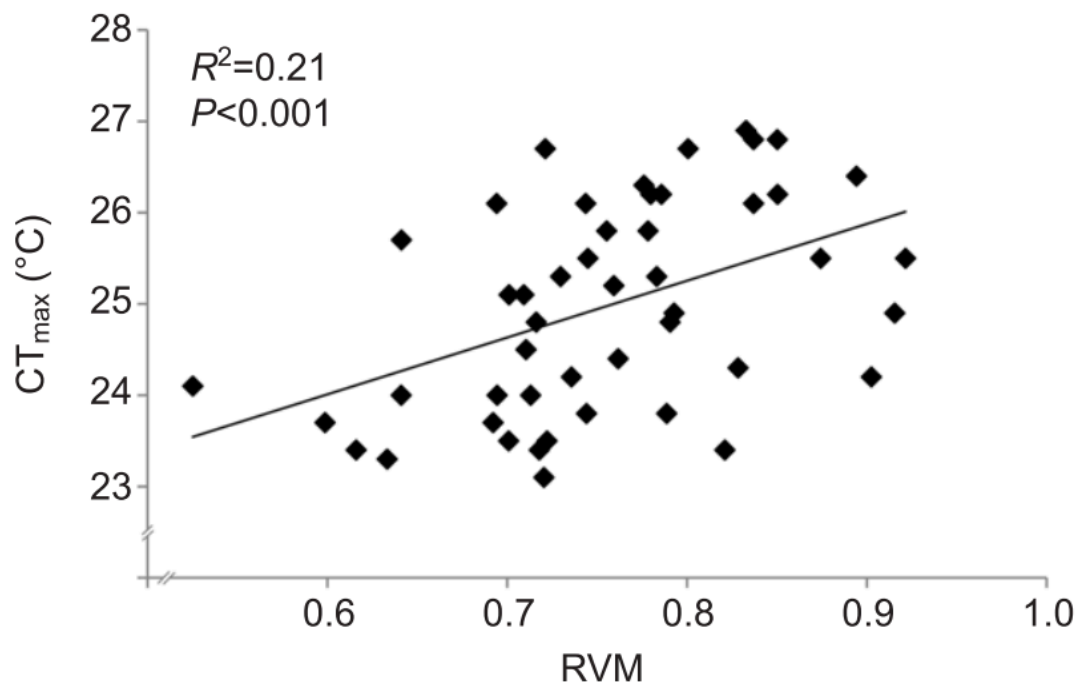


Figure 0.6 : Corrélation entre le CT_{max} et le volume ventriculaire relatif par rapport à la masse totale de l'individu. Tirée de Anttila et al., 2015.

2002). Afin de soutenir les besoins énergétiques accrus du muscle cardiaque et de l'ensemble de l'organisme à température élevée, les mitochondries doivent produire davantage d'ATP par la phosphorylation oxydative (Lemieux et al., 2010 ; Rodnick et al., 2014). À partir d'une certaine température les mitochondries cardiaques n'arriveraient plus à augmenter la phosphorylation oxydative suffisamment pour assurer l'augmentation de la puissance cardiaque requise. Il existe une autre théorie qui expliquerait la défaillance cardiaque à haute température. Une diminution de la solubilité de l'oxygène dans l'eau lors d'une augmentation

de la température associée à des demandes énergétiques accrues, entraînerait un déséquilibre entre l'offre et la demande en oxygène (Pörtner et al., 2017 ; Pörtner & Knust, 2007). Toutefois, une étude sur la perche européenne (*Perca fluviatilis*) démontre qu'une diminution expérimentale des concentrations en oxygène dissous dans le sang n'affecte pas le CT_{max} d'un individu (Brijs et al., 2015). D'autres chercheurs soulignent que l'oxygène semble être plus disponible à température élevée en raison d'une augmentation de son taux de diffusion (Verberk et al., 2011). Une autre équipe a émis l'hypothèse que l'arrêt fonctionnel des neurones moteurs serait la cause de l'arrêt cardiaque, et ceci, indépendamment de la concentration en oxygène (Ern et al., 2015). Finalement, un déséquilibre de la balance ionique des myocytes cardiaques pourrait aussi être à l'origine de la limite de tolérance supérieure du cœur, du moins chez *Salmo trutta fario* (Vornanen et al., 2014). Cependant, qu'ils soient induits par un manque d'oxygène ou non, les mécanismes impliqués dans la limitation des capacités d'acclimatation des poissons à une augmentation de température ne sont pas encore clairement identifiés (Clark et al., 2013).

0.9 Mitochondries et température

Les mitochondries des cellules cardiaques semblent jouer un rôle déterminant dans l'étendue des températures qu'un organisme est capable de supporter. Le maintien de l'intégrité et l'efficacité des mitochondries cardiaques se détériorent lors d'une augmentation aiguë de la température. Cette perte de fonctionnalité des mitochondries induirait alors une défaillance du cœur au CT_{max} . En utilisant *Notolabrus celidotus*, Iftikar et al., 2014, ont pu observer ce lien. Premièrement, en observant le maintien de la saturation de l'hémoglobine en oxygène, ils ont

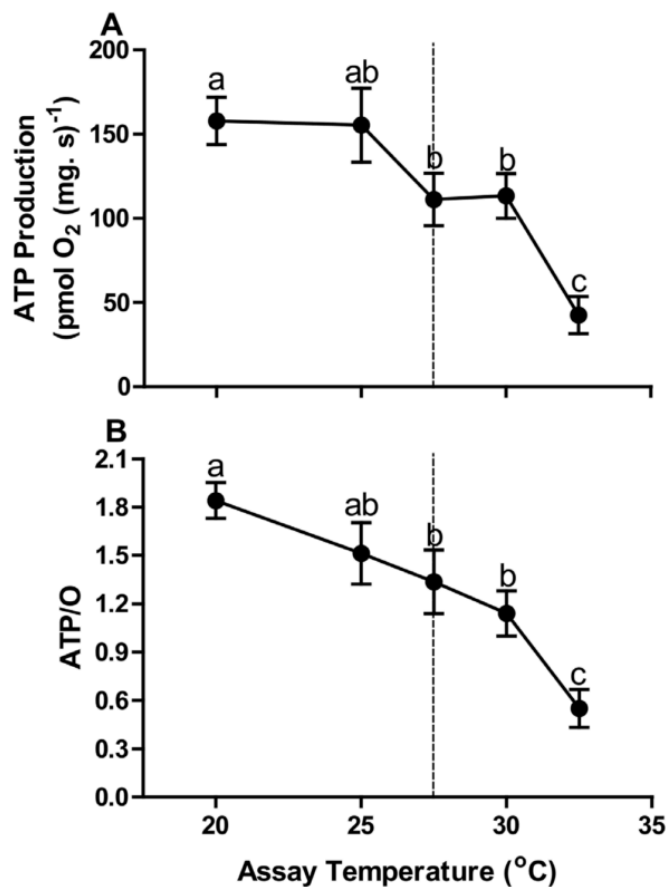


Figure 0.7 : Taux de production d'ATP et ratio ATP/respiration de mitochondries cardiaques en fonction de la température. La ligne verticale en pointillé représente le CT_{max} de *Notolabrus celidotus* (27,5° C). Tirée de Iftikar and Hickey, 2014.

conclu que l'apport en oxygène au tissu cardiaque n'était pas limité au CT_{max} (qui était à 27,5 °C). Deuxièmement, en suivant la production d'ATP lors d'une augmentation de la

température, ils ont observé que la production mitochondriale d'ATP diminuait avant même l'atteinte de la limite maximale de l'organisme (Fig. 0.7). Ceci entraînerait une déficience énergétique au niveau cardiaque et pourrait, en conséquence, affecter son fonctionnement.

Plusieurs mécanismes sont potentiellement à l'origine de cette diminution d'efficacité mitochondriale. D'une part, lorsque seuls les substrats du complexe I ou II sont fournis (ici malate, pyruvate et glutamate), la respiration mitochondriale augmente significativement à température élevée, indiquant alors une augmentation de la perméabilité membranaire (Iftikar & Hickey, 2013). Lorsque cette membrane est perméable, les protons peuvent la traverser sans synthèse d'ATP (Brand & Nicholls, 2011). La diminution de l'efficacité mitochondriale peut aussi s'expliquer par une diminution de RCR et une augmentation du relâchement de cytochrome à travers la membrane à l'approche du CT_{max} . Le RCR (*respiratory control ratio*) est une mesure de la qualité mitochondriale qui se calcule en divisant le taux de consommation d'oxygène des mitochondries en OXPHOS (avec des substrats pour les complexes I et II et de l'ADP) par la valeur du LEAK (avec les mêmes substrats sans ADP). Cela dit, une diminution de RCR est interprétée comme une perte d'efficacité de l'ETS puisque celui-ci n'utilise pas l'entièreté des électrons mis à sa disposition afin de produire de l'ATP (Chance & Williams, 1955). Une augmentation de la libération de cytochrome signifie que la membrane mitochondriale externe devient de plus en plus perméable affectant ainsi le gradient électrochimique et ultimement, la production d'ATP. Tout cela suggère que la capacité mitochondriale (consommation d'oxygène et production ATP) plafonne bien avant l'atteinte de la limite maximale de température de l'animal dans cette étude. Ceci arrive lors d'une accélération des processus métaboliques qui engendrent une amplification des besoins énergétiques due à l'augmentation de la température. Les auteurs concluent que cette défaillance pourrait ultimement conduire à l'arrêt cardiaque et à la mort de l'animal. D'autres études semblent confirmer ces résultats. Chez la morue atlantique (*Gadus morhua*) le métabolisme énergétique cardiaque semble aussi être affecté à des températures près de la limite de tolérance supérieure. La respiration mitochondriale en stade OXPHOS en présence des substrats du complexe I (ici pyruvate et malate), plafonne à 20 °C, deux degrés en dessous du CT_{max} (22 °C) de la morue atlantique (Rodnick et al., 2014). D'autres études démontrent des tendances similaires, avec un plafonnement du métabolisme mitochondrial à

des températures près du CT_{max} , chez l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) et le saumon atlantique (Penney et al., 2014) ou le loup atlantique (*Anarhichas lupus*, Lemieux et al., 2010). À cet égard, chez trois autres espèces, *Thalassoma lunare*, *Notalabrus fucicola* (Iftikar et al., 2014) et le *Forsterygion lapillum* (Khan et al., 2014), l'efficacité et l'intégrité sont détériorées à des températures inférieures aux CT_{max} respectifs de ces espèces.

Enfin, certaines enzymes dans le cœur de la perche européenne, impliqués dans le cycle de Krebs, ont démontré une baisse d'activité à l'approche de la température maximale (Ekström et al., 2017). La citrate synthase et la pyruvate déshydrogénase diminuent fortement leurs activités à l'approche du CT_{max} . Ce sont deux enzymes impliquées dans la catalyse des réactions conduisant à la production d'équivalents réduits (NADH et FADH₂). Une diminution de la disponibilité de ces derniers abaisserait le flux d'électrons dans le ETS et ainsi la production d'ATP.

Toutefois, chez les poissons, les études sur la production de DRO en présence de combinaison de substrats mitochondrial semblables aux conditions *in vivo* sont rares. Des fibres perméabilisées de tissu cardiaque de *N. celidotus* ne semblent pas produire plus de DRO lors de stress thermique (Iftikar & Hickey, 2013). En revanche, chez des mitochondries cardiaques isolées de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), la carpe commune (*Cyprinus carpio*) et l'esturgeon (*Acipenser fulvescens*), la quantité de DRO produite augmente avec la température (Banh et al., 2015). Néanmoins, à notre connaissance, aucune étude existante ne relie la production de DRO au CT_{max} d'un animal. De plus, des recherches sur le lien entre contenus en n-3 du cœur et la résistance à un stress tel que la température sont à ma connaissance inexistantes.

0.10 Le modèle animal

Pour ce projet de doctorat, nous avons choisi deux espèces présentes au Québec, soit l'omble chevalier (AC, de *arctic char*) et l'omble de fontaine (BC, de *brook char*) ainsi que leurs hybrides respectifs AC ♀ x BC ♂ (HA) et AC ♂ x BC ♀ (HB). Les deux espèces d'ombles choisies font partie intégrante de la production aquacole au Québec. Le BC vise principalement le marché de l'ensemencement pour la pêche sportive, alors que l'AC est produit pour le marché

de la consommation humaine. Ces deux espèces ont des patrons de distribution géographiques différents avec une plage de tolérance thermique plus ou moins restreinte. L'AC a une distribution holarctique et une plage de température de 0 à 16 °C (Fishbase.org) tandis que le BC a une distribution plus australe, et une tolérance thermique entre 0 et 25 °C (Fishbase.org). Ces caractéristiques font de ces deux espèces un modèle biologique idéal afin d'étudier l'impact de la température sur la gestion du stress oxydatif. De plus, considérant l'importance économique de ces espèces et les efforts investis pour développer des souches commerciales rentables, l'étude de l'impact du contenu des n-3 dans leur aliment sur les performances de croissance et la tolérance au stress est tout-à-fait appropriée.

L'utilisation des hybrides de ces deux espèces augmente la valeur du modèle. Premièrement, de façon générale, les hybrides sont intéressants pour les aquacultures considérant leur taux de croissance pouvant être plus élevé que leur espèce parentale grâce entre autre à leur maturation sexuelle tardive. Elles remédient également au problème de consanguinité des cheptels de poissons présent en aquaculture (Bartley et al., 2000 ; Blackie et al., 2011). Finalement, les deux espèces parentales sont évolutivement et génétiquement proches et leur hybridation a déjà été observée en milieu naturel (Bernatchez et al., 1995 ; Hammar et al., 1991).

0.11 Les hybrides

Le fonctionnement de la mitochondrie et ses réactions à la suite de changements dans son milieu (p. ex., température, composition du milieu cellulaire) sont orchestrés par l'interaction et la synchronisation de son propre génome (ADN mitochondriale) avec le génome nucléaire. Le phénotype mitochondrial dépend du recrutement de plusieurs centaines de protéines codées dans le noyau vers l'intérieur de la mitochondrie (Lotz et al., 2014). Une fois intégré à la mitochondrie, une partie de ces protéines sert de sous-unité aux complexes respiratoires. La production d'énergie chimique au niveau de la mitochondrie est basée sur le travail de ces complexes respiratoires hautement sensibles à la température. Les différentes protéines qui les composent sont donc codées en partie par le génome mitochondrial et majoritairement par le génome nucléaire (Figure 0.8, Blier et al., 2001; Ellison and Burton, 2006).

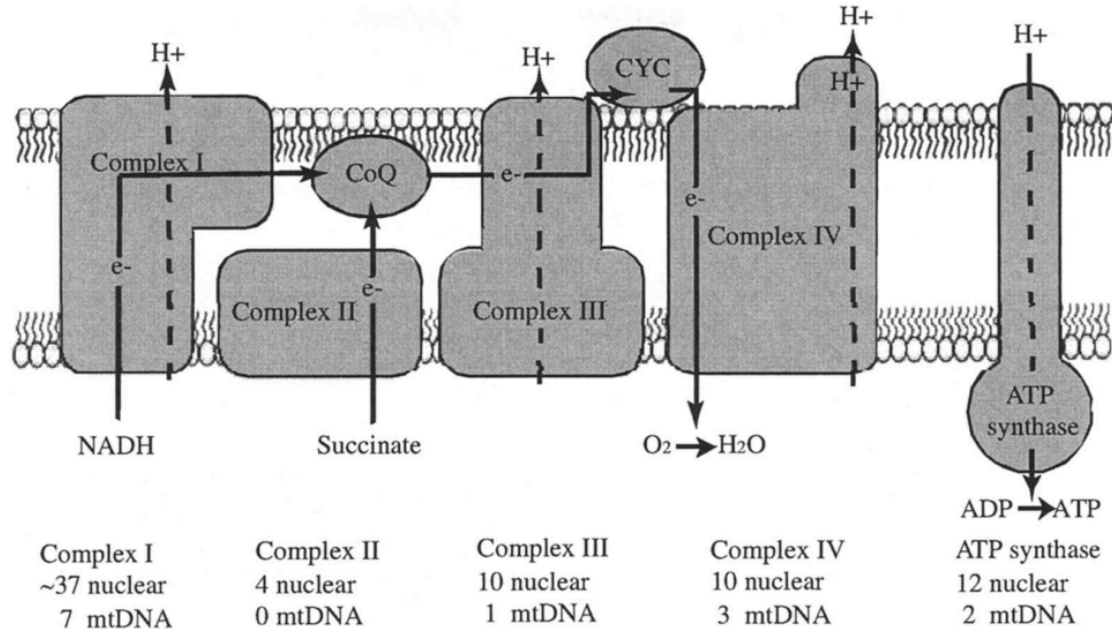


Figure 0.8 : Participation du génome nucléaire et mitochondrial dans l'expression de sous-unités formant les complexes respiratoires. Figure tirée de Ellison et Burton, 2006.

Cette synchronisation a été façonnée tout au long de l'évolution à l'intérieur de chaque espèce, de façon à assurer la coadaptation des sous-unités. Cette interaction mito-nucléaire est donc primordiale pour assurer le fonctionnement du métabolisme énergétique et devrait être soumise à une forte pression sélective. La sélection assure l'agencement de gènes nucléaires et mitochondriaux de façon à optimiser l'efficacité métabolique (Dowling et al., 2008). Puisque le génome mitochondrial est transmis exclusivement de façon maternelle, alors que le génome nucléaire provient des deux taxons parentaux l'hybridation peut entraîner un bris de coadaptation des complexes. Pour cette raison, nous observons souvent une grande asymétrie de la réponse à l'hybridation suite à des croisements réciproques (mâle A x femelle B, mâle B x femelle A), comme dans le cas du mulet. Un croisement entre l'âne femelle et un étalon ne donne pas un résultat aussi performant que l'inverse. En général, une accumulation de bris des complexes coadaptés cause un dysfonctionnement mitochondrial et conduit à une dépression hybride. Considérant que l'hybridation peut générer des dysfonctions mitochondriales, les

hybrides restent alors un modèle très pertinent afin d'établir le lien entre la température, le métabolisme mitochondrial et la gestion du stress oxydatif.

0.12 Objectifs du projet

L'augmentation du contenu en n-3 de la chair des poissons d'élevage constitue un moyen d'augmenter la valeur du produit final. Plus de n-3 améliorerait la qualité nutritionnelle de la chair et sa consommation aurait potentiellement davantage d'effets bénéfiques sur la santé humaine. Les pratiques de sélection et l'utilisation d'aliments à haute valeur énergétique et très riche en LC-PUFA ont cependant poussé les poissons à une certaine limite physiologique qui les rend particulièrement sensibles aux manipulations ainsi qu'aux maladies infectieuses, ce qui augmente les taux de mortalité et affecte grandement la rentabilité des entreprises. Dans ce contexte, le but de cette thèse est d'évaluer l'impact du contenu élevé en n-3 sur deux marqueurs de la santé : la croissance et la résistance au stress thermique. Elle tente notamment de combler les lacunes dans la compréhension des conséquences du contenu élevé en LC-PUFA des poissons en aquaculture au niveau de la biochimie mitochondriale, de la gestion du stress oxydatif et de l'homéostasie des poissons. Dans l'ensemble, ce travail vise entre autres à utiliser une approche intégrative. En utilisant un test de tolérance thermique, elle explore les possibles liens entre le contenu en acide gras, la production de DRO mitochondriales et la résistance aux stress des poissons.

Le premier objectif était d'évaluer l'impact d'un régime riche en n-3 sur les performances de croissance, le profil d'acides gras de la chair, certains marqueurs du stress oxydatif et l'activité antioxydante dans les quatre groupes de salmonidés. Ces quatre groupes ont reçu un régime alimentaire riche en n-3 (WW) et un régime témoin (W) pour une période de croissance de 140 jours. Par la suite, nous avons évalué le taux de croissance spécifique (SGR), le profil en acides gras du filet, les dommages oxydatifs aux lipides (TBARS) et protéines (*protein carbonyls*) et deux enzymes antioxydantes : la catalase et la superoxyde dismutase. Ici, la première hypothèse était la suivante : à la lumière de ce qui a été dit plus haut, l'augmentation du contenu en n-3 dans l'aliment devrait se manifester par un taux de croissance réduit. Cette détérioration du taux de croissance serait induit par un enrichissement en n-3 de la chair des poissons et une accentuation de la susceptibilité au stress oxydatif (indice de peroxydation).

Cette augmentation de la susceptibilité au stress oxydatif se traduira par une augmentation des dommages oxydatifs quantifiés par l'intermédiaire des TBARS et des protéines carbonylées. En même temps, nous voulions confirmer l'hypothèse que certains groupes ou individus possédant une activité antioxydante plus élevée présenteraient une meilleure protection contre le stress oxydatif et auraient un contenu plus élevé en n-3. Les profils d'acides gras de ces individus devraient se démarquer par une concentration élevée en AEP ou ADH, accompagné d'une forte activité de la catalase ou superoxyde dismutase, résultant en une diminution des dommages oxydatifs exprimée en TBARS et protéines carbonylées. Notre prédiction était qu'une meilleure défense antioxydante contre le stress oxydatif identifierait des poissons mieux « équipés » face au stress imposé par la présence d'oméga-3. Un tel groupe ou individu serait en meilleure santé et pourrait constituer une base solide pour les programmes de sélection basés sur la santé. Finalement, nous avons également émis l'hypothèse que les hybrides surpasseraient les espèces parentales sur au moins un des paramètres testés. Ainsi, ces résultats pourraient nous informer sur le potentiel de ces hybrides pour les programmes de sélection dans l'industrie l'aquacole.

Le deuxième objectif était de déterminer s'il existe une corrélation entre la résistance au stress (la température), la teneur en acides gras du cœur et les taux de production de DRO dans nos quatre groupes de salmonidés. Autrement dit, est-ce que la perte d'homéostasie à température élevée est causée par un dérèglement de la gestion du stress oxydatif de la mitochondrie et est-ce que certains acides gras jouent un rôle majeur dans la détermination de la limite thermique supérieure ? Pour ce faire, nous avons réalisé un test de tolérance thermique pour déterminer le CT_{max} de ces quatre groupes, donc nous avons pu établir un classement en fonction de leur capacité à résister au stress. Par la suite, nous avons mesuré le taux de production de DRO global à des températures extrêmes dans les fibres perméabilisées cardiaques. Les fibres sont considérées comme les plus représentatives de la vraie physiologie de l'animal. Notre première hypothèse ici était que les patrons de distribution des espèces parentales seraient observés dans la performance lors du test de tolérance thermique, où BC dépasserait AC et que les hybrides auraient une performance supérieure, inférieure ou intermédiaire. Nous avons également émis l'hypothèse que le stress oxydatif serait plus élevé pour les individus ayant une résistance au stress thermique plus faible. C'est-à-dire que la production de DRO des fibres serait à son

maximum proche de la température à laquelle l'animal montrerait de signes de perte de l'homéostasie. De plus, nous avons supposé que les hybrides afficheraient un flux de production de DRO plus élevé puisque l'augmentation du stress oxydatif par l'hybridation a été déjà démontrée (Barreto & Burton, 2013). Enfin, nous avons proposé que les individus ou groupes ayant un cœur avec une forte teneur en n-3, et donc une grande susceptibilité au stress oxydant, présenteraient une résistance au stress thermique moindre. Cette réduction dans la performance face à un stress serait induite par une augmentation de la production de DRO. Ces dernières oxydèrent davantage les membranes cellulaires riches en oméga-3 causant ainsi des dommages qui seraient à l'origine de la défaillance du cœur à température élevée. Cette dernière hypothèse provient d'abord d'observations chez la perche européenne dont le profil lipidique cardiaque change en fonction de la température d'acclimatation (Ekström et al., 2017). Elle provient également de différents constats d'études sur la corrélation entre la teneur en acides gras spécifiques et certains traits des individus, comme la croissance et la vitesse de nage maximale (Chatelier et al., 2006 ; McKenzie et al., 1998 ; Wagner et al., 2004). Dans l'ensemble, ces résultats nous aideront à mettre davantage de lumière sur les conséquences possibles d'un contenu élevé en n-3 et leur impact sur la santé des poissons ici définie par la résistance au stress thermique. De plus, ils nous permettront de conclure sur l'implication de la production de DRO dans la défaillance cardiaque et dans la résistance au stress thermique.

Le troisième objectif était de déterminer l'effet de l'augmentation de la température sur des mitochondries cardiaques isolées d'AC. Les mitochondries isolées nous permettent de mesurer la production de DRO, comme dans la précédente étude. Ceci augmente la probabilité ou la possibilité d'établir les liens entre le stress oxydatif, l'intégrité mitochondriale et la perte d'homéostasie à température élevée. Selon l'hypothèse principale, l'efficacité mitochondriale et la production de DRO devraient être affectées à des températures proches du CT_{max} de cette espèce. Pour ce faire, nous avons premièrement réalisé un test de tolérance thermique maximale chez l'AC en utilisant un protocole adapté de Roze et al., 2013. Nous avons par la suite mesuré la respiration mitochondriale et la production de H_2O_2 . La production du peroxyde d'hydrogène est un estimateur indirect de la production d'anions superoxyde au niveau mitochondrial. Dans cette expérience le taux d'apparition de molécules de H_2O_2 est mesuré en présence d'une quantité saturante de superoxydes dismutase afin de garantir que tous les anions superoxydes

soient convertis en peroxyde d'hydrogène. Dans le cas de la présente étude la respiration et production de DRO ont été réalisées en présence des substrats pour les complexes I, II et de l'ADP, que nous considérons comme le plus proche des conditions physiologiques. Ces expériences ont été réalisées à quatre températures : 10, 15, 20 et 25 °C. La production de DRO devrait atteindre son maximum à la température la plus élevée et la respiration mitochondriale devrait chuter ou plafonner. Nous avons choisi de travailler encore sur le cœur considérant son rôle primordial dans les réponses et les adaptations observés à la température. Si les corrélations entre CT_{max} et la production de DRO existent, cela soulignerait le rôle primordial que joue la mitochondrie dans la limitation des gammes de température qu'un organisme peut tolérer. Si tel est le cas, la gestion du stress oxydatif mitochondrial et les dommages qui peuvent en découler constitueront un élément central de la santé et la résistance au stress, et ce, chez des animaux qui sont constamment soumis à un risque élevé d'oxydation en raison de la forte quantité de LC-PUFA dans leur chair.

Dans l'ensemble, cette thèse contribuera à une meilleure appréhension des conséquences du taux élevé en n-3 dans les poissons d'aquaculture sur leur santé. De plus, elle tentera d'établir la mitochondrie, la production de DRO et les dommages oxydatifs comme points élément clé dans la gestion de l'homéostasie des poissons. Les marqueurs du stress oxydatif pourraient être ainsi considérés comme de bons marqueurs de l'état de santé général d'un poisson. Dans le meilleur des cas, cela attirera l'attention de l'industrie de la formulation des aliments et de tout le secteur piscicole sur les problématiques liées aux fortes concentrations en oméga-3 des poissons d'élevage. Par la suite, avec une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques et biochimiques sous-jacents, un programme de recherche et de développement pourra être mis sur pied pour proposer de nouvelles stratégies nutritionnelles et de sélection. Évidemment, il restera à corrélérer le stress oxydatif avec d'autres indicateurs de la santé et la résistance aux stress des poissons en aquaculture afin de conclure à l'importance du stress oxydatif et ses conséquences dans la gestion de l'homéostasie cellulaire.

CHAPITRE 1
OXIDATIVE STRESS AND GROWTH PERFORMANCE IN SALMONIDS

Felix Christen¹, Bernard A. Dupont-Cyr¹, Grant W. Vandenberg², Nathalie R. Le François³,
Jean-Claude Tardif⁴, France Dufresne¹, Emilie Proulx² and Pierre U. Blier^{1*}

¹Université du Québec à Rimouski, Département de biologie, Rimouski, Québec, G5L3A1

²Université Laval, Département de sciences animales, Québec, Québec, G1V 0A6

³Biodôme de Montréal, Montréal, Québec, H1V 1B3

⁴Montréal Heart Institute, Université de Montréal, Montréal, Québec, H1T 1C8

*Corresponding author: Pierre Blier: Pierre_Blier@uqar.ca

Sera soumis à *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology*

1.0 Abstract

In fish, polyunsaturated fatty acids (PUFA) are an essential structural element for cellular membranes, an important resource for energy production and needed for optimum growth performance. Omega-3 fatty acids are known to have beneficial effects on human health, so for the aquaculture industry it is of particular interest to enhance omega-3 content in fish to increase their value. However, there are limits to increase omega-3 content in fish as they may increase susceptibility to peroxidation and thus potential oxidative damages. To evaluate the impact of an omega-3 rich diet (compared to a control diet) on growth performance, fatty acid composition, oxidative stress parameters and antioxidant activity, we used four salmonid groups. Arctic char (*Salvelinus alpinus*), brook char (*S. fontinalis*) and their respective hybrids. We found that growth performance of the four groups was negatively affected by dietary fatty acid content. Moreover, the four groups varied slightly in their respective proportions of various omega-3 fatty acids. TBARS content increased for arctic char but not for the three other groups when fed the omega-3 rich diet, although tendencies to increased oxidative stress were present in all groups. Antioxidant activity was not affected by dietary treatment. In addition, individuals with high omega-6 and low DHA content had higher TBARS content. Consequently, high omega-3/omega-6 ratios were accompanied by low oxidative stress levels. In other words, some individuals seem to be more efficient at depositing omega-3s in tissue without the possible negative effects of dietary induced increased oxidative stress, on their health status.

1.1 Introduction

In fish, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are an essential structural element for cellular membranes, an important resource for energy production and are needed for optimum growth performance (Tocher, 2010). Deficiencies in PUFA through inadequate feeding are responsible for decreases in growth performance, perturbations of reproductive processes, numerous pathologies and may ultimately cause the death of an individual (Das, 2006). As for fish, PUFAs, and especially omega-3 (n-3) fatty acids, are an essential nutritional requirement for humans and are beneficial to their health (Calder, 2014). Humans rely on fish and other marine products as their principal source of omega-3 fatty acids (Calder & Yaqoob, 2009). The first accounts of the beneficial effects of n-3 on human health come from observations in indigenous people from Greenland where despite a high-fat diet, incidence of cardiovascular diseases were extremely low due to increased dietary n-3 intake (Bang et al., 1971). Since then, n-3 have been associated with positive effects on Alzheimer's disease and depression (Hallahan et al., 2016 ; Song et al., 2016), cardiovascular (Kris-Etherton, 2002) and chronic disease (Lordan et al., 2011), or anti-inflammatory activities of their metabolites (Wall et al., 2010c). Therefore, there is a growing interest in the aquaculture industry for developing n-3-rich diets and fish species with high levels of these fatty acids. Dietary fatty acid composition is readily reflected in fish muscle and diets can be altered to enhance n-3 deposition in fish (Bell et al., 2001 ; Jobling, 2004). However, there are limits to increasing omega-3 content in the flesh of aquaculture fish. Due to their chemical structure, PUFAs (as n-3) are extremely sensitive to oxidative processes. As a result, oxidative stress in the form of damage to DNA, proteins and membrane lipids may occur (Halliwell & Gutteridge, 2015). Increased dietary n-3 content has been shown to increase susceptibility to peroxidation and oxidative damage of tissue lipids in *Scophthalmus maximus* (Stéphan et al., 1995). Therefore, despite their essential role, n-3 may be detrimental to fish health due to an increased risk of peroxidation (Hsieh & Kinsella, 1989). For instance, in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) and the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), an n-3 rich diet induced significant decreases in growth performance of the two species (Chen et al., 2011 ; Olsen & Henderson, 1997).

In this context, the goal of the present study was to evaluate the impact of an n-3 rich diet on growth performance, fatty acid content, oxidative stress parameters and antioxidant activity in

four groups of salmonids. As fish species vary greatly in their fatty acid content and utilization capacities (Glennocross et al., 2014 ; Murray et al., 2014), we chose two species of salmonids that are well represented in the aquaculture industry: Arctic char (AC, *S. alpinus*) and brook char (BC, *S. fontinalis*). Additionally, we used their respective hybrids AC ♀ x BC ♂ (HA) and AC ♂ x BC ♀ (HB). Hybrids in general have a great potential to positively influence productivity in the aquaculture industry by reducing inbreeding problems and increasing growth performance (Bartley et al., 2000 ; Blackie et al., 2011). Furthermore, hybridization of these species has been observed in the wild (Bernatchez et al., 1995 ; Hammar et al., 1991). The four groups were fed a n-3 rich (WW) and a control diet (W) for a 140-day growth period. Following the growth trial, fatty acid profiles of muscle tissue, TBARS, protein carbonyls, catalase and superoxide dismutase activities were determined.

We hypothesised that growth performance would be negatively affected in all four groups fed the WW diet. Furthermore, this would come with an increase in oxidative stress markers due to a higher peroxidation index induced by the increased n-3 PUFA content. Endogenous antioxidant activity is known to be influenced by dietary lipid sources in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; Fontagné-Dicharry et al., 2014). Therefore, we wanted to test if groups or individuals with higher antioxidant activity offered better protection against oxidative stress and thus increased n-3 content. Subsequently, breeding programs selecting such a group or individual could improve fish health through diminished oxidative stress and increased n-3 content. Moreover, we hypothesized that hybrid groups would outperform parental species in relation to at least some of the parameters tested in the present study. Thereby, results could inform on the potential of these hybrids for breeding programs in the aquaculture industry.

1.2 Material and methods

1.2.1 Fish

Arctic char (*Salvelinus alpinus*, AC, Fraser strain), brook char (*S. fontinalis*, BC, Baldwin strain) and two hybrids AC ♀ x BC ♂ (HA) and AC ♂ x BC ♀ (HB), were provided by Pisciculture des Monts de Bellechase Inc. (St-Damien-de-Buckland, QC, Canada) and Aquaculture Gaspésie Inc. (Gaspé, QC, Canada). Mean fish weight was 421.51 ± 55.25 g (AC), 489.73 ± 38.52 g (BC), 301.76 ± 50.8 g (HA) and 271.87 ± 40.11 g (HB). Growth experiments

were conducted at the Laboratoire Régional des Sciences Aquatiques (LARSA; Université Laval, Québec, QC, Canada). Fish were randomly distributed in 30 0.175 m³ tanks supplied with 99% recirculating water at 10.5 °C under natural photoperiod. After a four weeks acclimation period, all individuals were weighted and identified subcutaneously using passive integrated transponders (PIT-Tag, Biomark, ID, USA). All experiments were authorized by the local animal ethics committee.

1.2.2 Feeding and diets

Weekly feeding schedule for a 140-day growth period was as follows: fish were hand-fed to apparent satiety twice a day for two days, fed 80% of satiety twice daily for the following 4 days and starved for 24h. Fish were fed two different diets, one with a fatty acid composition close to commercial feeds (W) and one with increased omega-3 fatty acid content (WW). For each dietary treatment, 15 tanks with fish were used. Diets were mixed, steam pelleted using a California Pellet Mill (Model CPM CL-5, Crawfordsville, IN, USA), dried overnight in a forced-air oven set at 22 °C and stored at 4 °C. Pellet size was adjusted throughout the experiment to fit fish size. Diet formulation is presented in table 1.1. Fatty acid profiles and proximate composition of both diets are presented in (Table 1.2).

Table 1.1 : Diet formulation

Ingredients	(g/kg)
Herring meal ^a	114
Sardine meal ^a	86
Fish oil ^{a*}	170
HP300 Soybean protein ^b	110
Pea protein ^c	130
Corn meal ^d	180
Whole wheat meal ^e	80
Blood meal ^f	100
CaHPO ₄ ^b	20
Vitamins and minerals ^g	9.8
Astaxanthin ^h	0.05

^a Swimco Canada, Toronto, ON, Canada

^b Jefe, St-Hyacinthe, QC, Canada

^c Parrheim Foods, Saskatoon, SK, Canada

^d Meunerie de St-Frédéric Inc. Saint-Frédéric, QC, Canada

^e La Seigneurie des Aulnaies inc., Saint-Roch-des-Aulnaies, QC, Canada

^f AP301 spray dried, APC nutrition inc., Calgary, AB, Canada

^g Corey Nutrition Company, Fredericton, NB, Canada

^h Carophyll pink, DSM nutritional products AG, Kaiseraugst, Switzerland

*oil type changed for the two treatments, commercial oil (W) and omega-3 enriched oil (WW)

Table 1.2 : Lipid and proximate composition of the two experimental diets

	W (low n-3 content)	WW (high n-3 content)
C16_0	14.80 ± 0.05	16.76 ± 0.04
C18_0	2.02 ± 0.02*	4.48 ± 0.02
SFA	24.58 ± 0.12	26.12 ± 0.09
C16_1	6.91 ± 0.07	7.20 ± 0.07
C18_1	13.42 ± 0.06	15.98 ± 0.08
MUFA	33.91 ± 0.19*	29.33 ± 0.19
C18_2n6	8.77 ± 0.20	8.75 ± 0.20
C20_4n6 (ARA)	0.40 ± 0.00*	0.87 ± 0.01
N6	9.63 ± 0.21	10.61 ± 0.22
C18_3n3	1.76 ± 0.04	1.80 ± 0.02
C20_5n3 (EPA)	5.86 ± 0.04*	11.11 ± 0.09
C22_5n3 (DPA)	0.77 ± 0.01*	1.50 ± 0.01
C22_6n3 (DHA)	5.94 ± 0.08*	9.92 ± 0.08
n-3	14.83 ± 0.10*	25.40 ± 0.15
n-3N6	1.55 ± 0.03*	2.41 ± 0.05
PI	117.18 ± 0.88*	185.20 ± 1.11
UI	147.56 ± 0.74*	186.12 ± 0.80
Moisture (%)	5.54 ± 0.58	6.01 ± 0.89
Lipid (%)	19.28 ± 0.99	20.56 ± 0.85
Protein (%)	44.52 ± 0.19	46.12 ± 0.25
Ash (%)	9.80 ± 0.56	10.50 ± 0.74

Values are means ± SEM. SFA. Saturated Fatty acids; MUFA. Monounsaturated fatty acids; ARA. arachidonic acid; DPA. Docosapentaenoic acid; EPA. Eicosapentaenoic; DHA. Docosahexaenoic acid; n-3N6. omega-3/omega-6 ratio; PUFA. Polyunsaturated fatty acids; PI. Peroxidation Index; UI. Unsaturation Index. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$)

1.2.3 Fish sampling

At the end of the growth trial, fish were starved for 3 days, killed with a blow to the head, weighed and dissected. Individual organ mass (heart, intestine, liver, pyloric caeca and gonads)

and carcass mass were determined. One fish per species and tank was kept for proximate analysis, while a second fish was filleted and one filet was kept for proximate analysis, while the red muscle of the other filet was extracted. The red muscle was homogenized in ice cold phosphate buffer (100mM, 20mM EDTA, pH=8.0), nitrogen flushed, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent analysis.

1.2.4 Proximate analysis

Whole fish, filets and diet were homogenized at 4°C, aliquoted and stored at -80°C for proximate analysis. Proximate analysis was done using standard methods of AOAC (2012). Ash content was determined by incinerating samples in a furnace at 550°C overnight. Nitrogen was determined on lyophilized samples using an elemental analyzer (Nx6.25). Moisture content was determined by drying the samples at 105°C for 24h. Lipid content was determined by Soxhlet extraction (Soxhlet, 1879).

1.2.5 Fatty acid profiles of filets and experimental diets

A protocol adapted from (Lepage & Roy, 1984) already applied in (Ekström et al., 2017) was used in the current experiment. At least 100 mg of tissue (N=15) was 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 by adding 3ml of 3% sulfuric acid methanol solution and heating 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 0.32mm 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 were purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise mentioned.

1.2.6 Oxidative stress parameters and antioxidant activity

Red muscle was homogenized in 100mM phosphate buffer at pH 7.0 (N= 120, 60 for each diet and 15 per group). Subsequently it was centrifuged (4°C) at 1600 g for 15 min, 1500 g for 10 min or 13000 g for 1 min, for TBARS, protein carbonyls, SOD and CAT respectively. The supernatant was the used for subsequent analysis.

1.2.7 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS content was measured by following the controlled reaction of malondialdehyde (MDA) with thiobarbituric acid using an adapted protocol (Ohkawa et al., 1979 ; Said et al., 2014). Briefly, supernatants were incubated with thiobarbituric acid at 100°C for 60 minutes. Adducts formed during the reaction were then quantified using the EnVision multilable platereader (Perkin Elmer Envision, Foster City, CA, USA) at an excitation wavelength of 540 nm and an emission wavelength of 550 nm. Protein concentration was determined using the BCA method (Smith et al., 1985). Results were expressed as nmol of MDA per mg of protein.

1.2.8 Protein Carbonyls

Levels of carbonylated proteins were quantified using the protein carbonyl colorimetric assay kit from Cayman chemicals (Ann Arbor, MI, USA). Briefly, this assay is based on the reaction between 2,4-dinitrophenylhydrazine and protein carbonyls producing protein-hydrozone. The latter is then quantified spectrophotometrically at an absorbance between 360-385 nm using the EnVision multilable platereader (Perkin Elmer Envision, Foster City, CA, USA).

1.2.9 Catalase activity

Catalase (CAT) activity was determined using an adapted protocol from Orr and Sohal, 1992. In short, the supernatant was added to a reaction medium containing 60 mM of hydrogen peroxide (H₂O₂). The decomposition rate of H₂O₂ was then followed by measuring the decrease in absorbance at 240 nm for 90 seconds using a spectrophotometer Lambda 11 (Perkin Elmer,

Foster City, CA, USA). One unit of CAT is defined as the amount of enzyme needed to reduce $1\mu\text{mol}$ of H_2O_2 min^{-1} .

1.2.10 Superoxide dismutase activity (SOD)

SOD activity was determined using the superoxide dismutase assay kit from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). According to the manual, the assay follows superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine using tetrazolium salt for spectrophotometric detection at 450 nm in the supernatant. Total SOD is expressed as means of $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteins \pm SEM where one unit of SOD is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50 % dismutation of the superoxide radical.

1.2.11 Calculations and statistical analysis

Specific growth rate (SGR) was calculated as follows:

$$SGR = \left[\frac{(\ln W2 - \ln W1)}{t} \right] * 100$$

where, $W1$ and $W2$ are body mass at the beginning and the end of the experiment and t the number of days the growth trial lasted. Peroxidation index (PI) and unsaturation index (UI) were calculated according to Hulbert et al., 2007:

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

$$UI = (1 \times \% \text{ monoenoics}) + (2 \times \% \text{ dienoics}) + (3 \times \% \text{ trienoics}) + (4 \times \% \text{ tetraenoics}) + (5 \times \% \text{ pentaenoics}) + (6 \times \% \text{ hexaenoics})$$

All statistical analyses were performed using R (R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>). Data was tested for normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity of variance (Bartlett) and transformed when needed. Fatty acid profiles, oxidative stress indicators, antioxidant activities, proximate analysis and growth rates were analyzed with a linear mixed effects model with the ‘nlme’ package (Pinheiro et al., 2014), treating diet and

group as fixed effects with tank as a random effect. Multiple comparisons were then tested by pairwise comparison of Tukey adjusted least square means. Statistical significance was set at $p < 0.05$ and all values are expressed as means \pm SEM. Relationships between TBARS content and the different parameters were established using linear regression analysis. Dietary fatty acid profiles were compared using t-tests and adjusted p -values (0.05).

1.3 Results

1.3.1 Fatty acid composition and proximate analysis of diets and fish

Table 1.3 : Proximate composition (% on wet weight basis) of muscle and whole bodies of experimental fish.

Muscle	W				WW			
	AC	BC	HA	HB	AC	BC	HA	HB
Moisture (%)	65.91	68.37	67.39	66.97	65.08	66.15	67.70	66.61
Lipid (%)	7.17	5.91	5.58	7.98	6.88	5.47	5.54	5.62
Protein (%)	19.01	19.48	20.20	19.68	18.03	20.19	21.01	19.23
Ash (%)	1.56	1.49	1.59	1.50	1.62	1.44	1.48	1.52
Whole body								
Moisture (%)	64.52	61.98	64.47	64.00	61.31	60.34	65.66	63.95
Lipid (%)	10.10	10.20	9.80	10.50	10.40	10.60	10.80	10.10
Protein (%)	16.55	17.66	16.61	16.99	18.57	20.25	18.09	17.09
Ash (%)	1.94	1.83	1.78	1.75	1.92	1.92	1.78	1.86

Values are means. Arctic char (AC), Brook char (BC), Hybrid arctic (HA), and Hybrid brook (HB). No statistical differences were found between dietary treatments or groups.

Fatty acid composition of experimental diets showed significant differences in omega-3 content. More specifically, EPA, DHA and DPA content almost doubled in the WW diet whereas most of the other parameters remained unchanged (Table 1.2). As expected, the fatty acid composition of the W diet was close to commercial fish food.

Table 1.4 : Lipid composition (% of total fatty acids) of filets of the 4 experimental groups and two dietary treatments

	W				WW			
	AC	BC	HA	HB	AC	BC	HA	HB
C16_0	14,11 ± 0,29	13,92 ± 0,26	14,00 ± 0,23	14,26 ± 0,24	14,61 ± 0,22	14,53 ± 0,18	14,21 ± 0,25	14,38 ± 0,21
C18_0	1,83 ± 0,06 a	1,96 ± 0,05 a	1,95 ± 0,07 a	1,91 ± 0,04 a	2,54 ± 0,07 A	2,66 ± 0,06 A	2,55 ± 0,06 A	2,59 ± 0,08 A
SFA	26,25 ± 0,85	25,32 ± 0,87	25,23 ± 0,57	28,23 ± 0,40	27,89 ± 0,66	28,95 ± 0,71	28,10 ± 1,04	27,85 ± 0,91
C16_1	3,91 ± 0,32	4,24 ± 0,27	4,26 ± 0,36	4,14 ± 0,32	3,65 ± 0,32	4,41 ± 0,30	4,33 ± 0,28	4,21 ± 0,21
C18_1	9,87 ± 0,94	10,14 ± 0,84	10,20 ± 1,19	9,94 ± 0,92	10,50 ± 0,80	10,42 ± 0,82	10,75 ± 0,49	10,48 ± 0,72
MUFA	22,91 ± 0,94 a	22,47 ± 1,20 a	22,23 ± 1,00 a	23,63 ± 0,91 a	17,53 ± 0,92 A	17,48 ± 0,88 A	18,90 ± 1,18 A	17,93 ± 0,95 A
C18_2n6	3,08 ± 0,19 a,b	2,75 ± 0,13 a	3,25 ± 0,24 b	3,11 ± 0,21 a,b	3,10 ± 0,16 a,b	2,98 ± 0,21 a,b	3,33 ± 0,22 a,b	3,02 ± 0,16 a,b
C20_4n6 (ARA)	0,81 ± 0,04 a	0,74 ± 0,03 a	0,75 ± 0,02 a	0,78 ± 0,04 a	1,12 ± 0,03 A	1,00 ± 0,02 B	0,98 ± 0,03 B	1,03 ± 0,02 A,B
N6	4,20 ± 0,18 a,b	3,75 ± 0,15 a	4,48 ± 0,28 b	4,18 ± 0,21 a,b	4,54 ± 0,18 a,b	4,33 ± 0,24 a,b	4,58 ± 0,25 a,b	4,45 ± 0,15 a,b
C18_3n3	0,73 ± 0,05 a,b	0,65 ± 0,03 a	0,79 ± 0,06 a,b	0,76 ± 0,04 a,b	0,84 ± 0,04 a,b	0,91 ± 0,07 B	0,89 ± 0,06 a,b	0,84 ± 0,03 a,b
C20_5n3 (EPA)	7,60 ± 0,17 a	6,17 ± 0,20 b	7,15 ± 0,14 a	7,12 ± 0,19 a	8,73 ± 0,28 A	7,79 ± 0,23 B	8,38 ± 0,22 A,B	8,14 ± 0,19 A,B
C22_5n3 (DPA)	1,57 ± 0,05 a	1,79 ± 0,05 a	1,69 ± 0,08 a	1,69 ± 0,06 a	2,15 ± 0,07 A	2,41 ± 0,07 A	2,26 ± 0,09 A	2,34 ± 0,08 A
C22_6n3 (DHA)	17,88 ± 0,55 a	20,40 ± 0,72 b	18,97 ± 0,61 a,b	19,44 ± 0,82 a,b	21,95 ± 0,55 A,B	23,20 ± 0,73 A	21,33 ± 0,85 B	22,03 ± 0,63 A,B
N3	28,85 ± 0,57 a	30,12 ± 0,80 a	29,89 ± 0,53 a	29,97 ± 0,88 a	35,18 ± 0,57 A	35,96 ± 0,62 A	34,62 ± 0,82 A	34,95 ± 0,67 A
N3/N6	7,05 ± 0,34 a	8,19 ± 0,39 b	7,04 ± 0,48 a	7,50 ± 0,48 a,b	7,93 ± 0,34 a,b	8,65 ± 0,51 a,b	7,90 ± 0,48 a,b	7,98 ± 0,29 a,b
PI	216,48 ± 4,45 a	228,57 ± 6,21 a	224,47 ± 4,23 a	226,50 ± 6,80 a	261,13 ± 4,15 A	267,12 ± 5,00 A	255,72 ± 6,17 A	259,67 ± 5,11 A
UI	192,87 ± 2,94 a	200,29 ± 4,04 a	198,89 ± 2,60 a	200,69 ± 4,15 a	223,61 ± 2,70 A	228,06 ± 3,16 A	221,20 ± 3,90 A	222,88 ± 3,57 A
N	15	14	15	15	15	14	15	15

Values are means ± SEM, SFA, Saturated Fatty acids; MUFA, Monounsaturated fatty acids; ARA, arachidonic acid; DPA, Docosapentaenoic acid; EPA, Eicosapentaenoic; DHA, Docosahexaenoic acid; N3/N6, omega-3/omega-6 ratio; PUFA, Polyunsaturated fatty acids; PI, Peroxidation Index; UI, Unsaturation Index; AC, Arctic char; BC, Brook char; HA, Hybrid arctic; HB, Hybrid brook. Dissimilar letters indicate significant differences between groups, differences in upper and lower case format indicate significant difference between dietary treatments ($p < 0.05$)

It has to be noted that the two diets also varied slightly in monounsaturated fatty acids (MUFA) and octadecanoic (C18:0) content. Arachidonic acid (ARA, C20:4n6) was slightly higher in the WW diet but both values were under 1 % of total fatty acid content. There was no significant difference in proximate composition of whole fish or filet (Table 1.3). Fatty acid profiles of the dietary treatments were reflected in the lipid composition of muscle tissues (Table 1.4). The ingestion of the WW diet resulted in higher levels of EPA, DHA, DPA and total omega 3 content in fish muscle with BC showing significantly lower values of EPA in the WW treatment as opposed to the W treatment. Also, AC had a lower DHA content than BC when fed the W diet. The differences in DHA, DPA, EPA and total omega-3 content in muscle were not as extreme as between the experimental diets. All groups fed the WW diet had slightly higher total MUFA and C18:0 content than those fed the W diet. Total omega-6 content was significantly lower in BC than HA in the W treatment. Furthermore, the W diet resulted in BC having a higher N3/N6 ratio than HA. EPA, DHA and ARA ratios did not differ significantly between treatments. Finally, peroxidation index and unsaturation index were significantly increased in all four groups fed the WW diet.

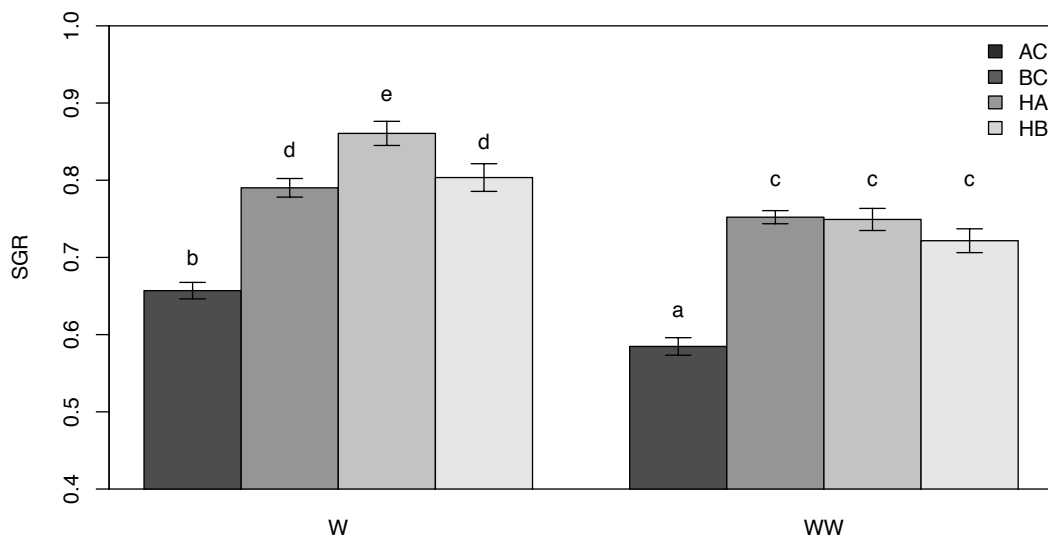


Figure 1.1 : Specific growth rates (SGR) for all four groups in the two experimental dietary treatments

1.3.2 Growth rates and oxidative stress parameters

Specific growth rates decreased significantly for all four groups when fed with the WW diet (Figure 1.1). AC had the lowest growth rates in both treatments. HA had the highest mean SGR values when fed the W diet but did not differ in growth performance compared to HB and BC in the WW treatment. As for oxidative stress, MDA content only increased significantly for AC when fed the WW diet (Figure 1.2). There were no differences in protein carbonyl content, superoxide dismutase and catalase activity between groups or treatments (data not shown). MDA content was positively correlated to total omega 6 content and catalase activity (Figure 1.3 a, d). In both cases the relationship seemed stronger for fish fed the WW diet. In contrast, TBARS were negatively correlated to DHA content and the N3/N6 ratio (Figure 1.3 b, c).

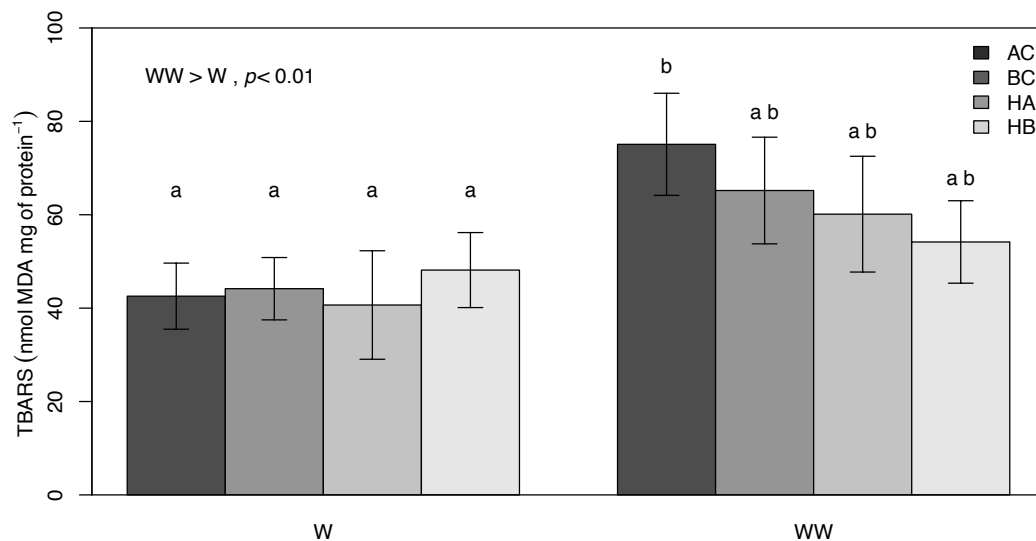


Figure 1.2 : Differences in TBARS content between dietary treatments and groups. (W. standard omega-3 content and WW. high omega-3 content). With Arctic char (AC). Brook char (BC). Hybrid Arctic (HA). and Hybrid Brook (HB). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). values are mean \pm SEM.

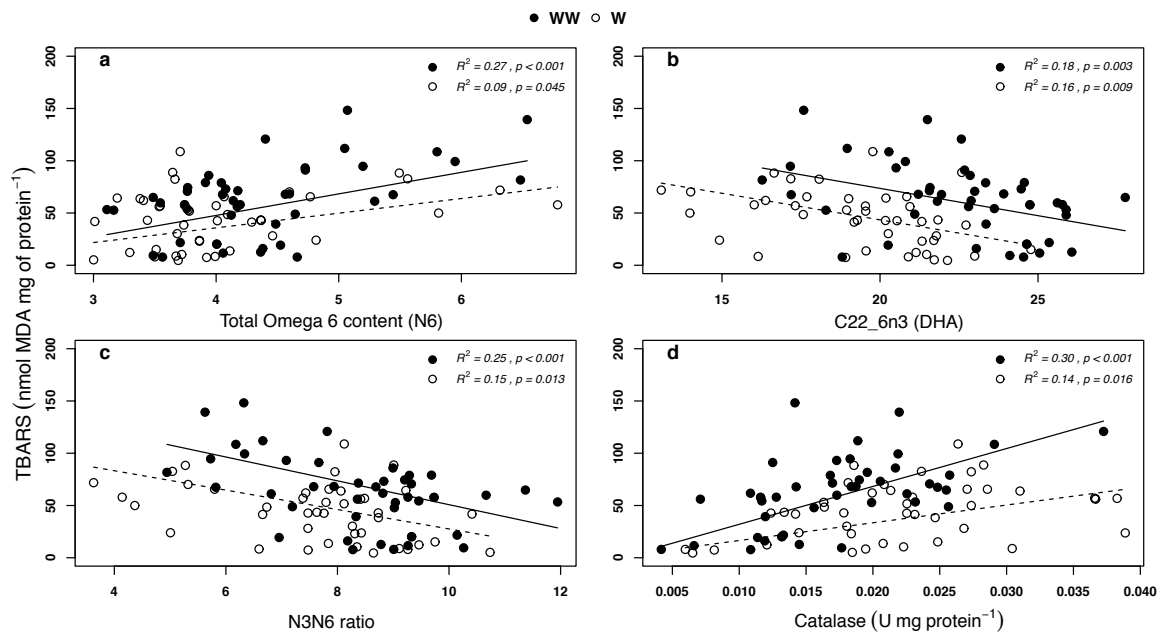


Figure 1.3 : Relationships between TBARS content, total omega 6 content (a), DHA (b), N3/N6 ratio (c) and catalase activity (d) for the two dietary treatments. With W (standard omega-3 content) in empty circles and dashed regression lines and WW (high omega-3 content) with closed circles and solid regression lines. Equation for regression lines a) solid (WW) : TBARS = 22.43x -35.5. dashed (W) : TBARS = 9.88x +4.00. b) solid (WW) : TBARS = -5.4x +184.34. dashed (W) : TBARS = -3.96x+121.06. c) solid (WW) : TBARS = -10.96x+154.42. dashed (W) : TBARS = -6.17x+ 92.36 and d) solid (WW) : TBARS = 2983.23x+11.87. dashed (W): TBARS = 1249.14x+16.91.

1.4 Discussion

Recent developments in the aquaculture industry try enhance omega-3 content in fish to increase their value. However, there are limits to omega-3 enrichment in fish as they may increase susceptibility to peroxidation and thus potential oxidative damages. This study underlines the existence of a negative effect of increased dietary omega-3 content on growth performance of four groups of salmonids. Increased oxidative stress seemed to be one of the consequences of highly omega-3 enriched diets at least for arctic char. Nevertheless, the results show extensive inter-individual variability in omega-3 content and oxidative stress management. Increased antioxidant activity was not correlated to increased n-3 content.

1.4.1 Fatty acid profiles

The fatty acid composition of experimental diets is reflected in lipid profiles of fish, which is a long-established phenomenon (Henderson & Tocher, 1987 ; Wang et al., 2010). Omega-3 fatty acid content was significantly higher for groups fed the WW diet, but the variation between the two treatments is less extreme than in the experimental diets. This is a widely occurring phenomenon in salmonids that has been demonstrated in multiple studies (Tocher, 2003 ; Yang & Dick, 1994). A probable explanation is the need to maintain distribution patterns of fatty acids in membranes, in order to stabilize cellular functions and various metabolic and catabolic processes. However, omega-3 fatty acid content in all groups was high enough to obtain significantly higher values in the WW treatment. The latter has already been demonstrated in AC (Olsen & Henderson, 1997). Here we showed for the first time that the content of EPA and DHA varied between groups (both species and hybrids) inside dietary treatments. The higher EPA and lower DHA content in AC compared to BC in both treatments may reflect dietary and metabolic adaptations to each species environment (Sargent et al., 1999). Hybrids have improved EPA content over BC when EPA supply is low, but the difference does not persist when dietary EPA levels are increased. This suggests that hybrids more readily deposit (or metabolize less) EPA than at least one of their parental species, conferring a superior nutritional value for humans. The higher total n-3 content clearly increased susceptibility to peroxidation as reflected by the PI values (Else, 2017 ; Hulbert et al., 2017). This higher susceptibility increases the risk of the occurrence of oxidative stress as demonstrated in mammalian heart mitochondria (Lemieux et al., 2011).

Curiously, hybrid arctic fish (AC ♀ x BC ♂ (HA)) outperform the other hybrid (AC ♂ x BC ♀ (HB)), as well as both parental species in terms of SGR in the W treatment. This is of particular interest, as hybrids represent a promising venue to increase growth performance and genetic variability in aquaculture broodstocks. Growth performance has repeatedly been demonstrated to be a transgressive trait in numerous hybrids, where hybrids outperform both parental species, and are widely used in the aquaculture industry (Bartley et al., 2000). The superior SGR values of HA do not persist in the WW treatment, where growth rates for all 4 groups decrease. Concomitantly, MDA content significantly increases in AC and tends to higher values in the three other groups when supplemented with the WW diet. Our results on

the negative effects of increased dietary PUFA content on growth performance are similar to trends described in the literature (Chen et al., 2011 ; Olsen & Henderson, 1997). This could result from the previously mentioned increased omega-3 content and peroxidation index in this treatment exposing them to higher risks of oxidative damage. High levels of oxidative stress markers have recently been associated with a negative impact on resistance to certain pathogens, growth and nutritional quality of the flesh (Sutton et al., 2006). When fed with high levels of PUFAs, other studies also associated increased oxidative damage to decreased overall health status and loss in growth performance (Chen et al., 2011 ; Olsen & Henderson, 1997). Variation in ratios of EPA, DHA and ARA, are known to affect fitness-related traits and every species seems to have their optimum ratio (Sargent et al., 1999). As the ratios of these three FA did not differ between treatments, deleterious effects on fish health or growth performance induced by such variations may be ruled out. As for the hybrids, we would have hypothesized to see increased levels of TBARS, as hybrids have been shown to have more elevated oxidative stress levels than their parents (Barreto & Burton, 2013). A second oxidative stress indicator, protein carbonyls, did not show any increase in the WW treatment. This suggests that oxidative damages may be more detectable by damages to lipids rather than protein, as oxidative stress was induced through increased dietary PUFA content. Superoxide dismutase also wasn't influenced by the dietary treatment nor varied between groups. This could indicate that superoxide dismutase activity or expression levels are high enough to counter possible increases in oxidative stress due to higher omega-3 content. This leads to the assumption that the relationship between increased antioxidant activity and n-3 content, as we hypothesized, didn't exist.

1.4.2 Oxidative stress related parameters

The correlation analysis of TBARS level with DHA, total N6 content, N3/N6 ratio and catalase activity revealed compelling relationships. In both treatments, individuals with high N6 content suffer greater oxidative damage, revealed through increased TBARS content. On the other hand, individuals with higher DHA content seem to suffer less oxidative stress in both treatments even if the relatively higher TBARS content for fish of the WW treatment still persists. This is counterintuitive, as the extreme sensitivity to peroxidation of PUFA should increase oxidative stress levels as mentioned before and seen in the relationship of TBARS and

N6. Also, DHA has been reported to be an essential fatty acid throughout the life cycle of arctic char (Murray et al., 2014). A lower oxidative stress levels for individuals with high DHA is in accordance with DHA's essential role. The present results are in accordance with a study reporting that increased oxidative stress levels were induced by higher omega-6 content and suppressed by omega-3 content in juvenile chinook salmon (Welker & Congleton, 2003). The metabolites of N6 fatty acids are known to have mostly pro-inflammatory effects (Ricciotti & FitzGerald, 2012) whereas the targeted degradation of omega 3 fatty acids results mostly in anti-inflammatory molecules (Tai & Ding, 2010). Increased production of pro-inflammatory components has recently been associated with increased oxidative stress and various human diseases (Byrne, 2010 ; Das, 2006). In this light, it is possible that individuals with high omega-6 and low omega-3 content are more prone to oxidative stress and have a poor general health status. These relationships are reflected in the correlation between TBARS levels and N3/N6 ratios: the higher the ratio, the lower the oxidative stress incidence. Levels of oxidative stress markers seem to be correlated with an animal's general health status and have recently been advanced as a major tool to assess fish health with easy to use and standardized procedures (Blier, 2014). For humans, a large body of research is promoting high n-3/N6 ratios to improve general health status (reviewed in Simopoulos, 2002; Simopoulos, 2008). These trends are well reflected in the present correlation between N3/N6 and TBARS, where individuals with high TBARS levels (poor overall health status) also have lower N3/N6 ratios. Certainly, future research needs to test whether or not such correlations persist with additional oxidative stress markers.

Regarding antioxidants, catalase activity was positively correlated with TBARS content. As a consequence, fish with elevated oxidative stress levels, expressed as total MDA content, had higher catalase activity. When challenged with a more pro-oxidative diet (WW), this relationship solidifies. This suggests that catalase is an important part of the antioxidant defense systems in these groups, but its upregulation is not sufficient to prevent the occurrence of oxidative stress. This again goes against our initial hypothesis, pointing in the opposite direction as increased antioxidant activity is correlated with increased oxidative stress. The relationship between increased antioxidant enzyme activity and higher oxidative stress values is largely documented in fish (Fontagné et al., 2008 ; Lesser, 2006 ; Tocher et al., 2003). Most

of these studies report results as mean values of different groups, species or dietary treatments. Results exploiting inter-individual variability patterns to elaborate correlations, as in the present paper, are however scarce. In fact, recent studies underline the importance to focus on the study of the mechanisms underlying inter-individual variability. As it has been shown that some individuals adapt well to changes in temperature for example and some don't (Calosi et al., 2013 ; Careau et al., 2014 ; Roze et al., 2013), good performers will clearly have a higher potential to adapt better to a warming planet. In a related study, we established a link between arachidonic acid (ARA) and temperature resistance when looking at inter-individual variability (Christen et al., in preparation). We also demonstrated that at a given temperature, individuals with less efficient mitochondria produce more reactive oxygen species, making them more prone to the occurrence of oxidative stress (Christen et al., 2018)

1.5 Conclusion

In summary, this study showed that growth rates of Arctic char, brook char and their respective hybrids are all negatively affected by increased dietary omega-3 content. Concomitantly, at least for one group, oxidative stress indices expressed as total amounts of TBARS increase. Additionally, extensive inter individual variability revealed a correlation between oxidative stress and specific fatty acids. Despite higher mean oxidative stress values for fish fed the omega-3 rich diet, analysis of the individual heterogeneity in omega-3 content and oxidative stress management showed that, individuals with high omega-6 and low DHA content had higher TBARS content. Consequently, high omega-3/omega-6 ratios were accompanied by low oxidative stress levels. In other words, some individuals seem to be more efficient at depositing omega-3s in tissue without the possible negative effects of dietary-induced increased oxidative stress on their health status. Additionally, this is not induced by higher antioxidant activity, at least for catalase and superoxide dismutase.

Altogether, the present results are of particular interest for the aquaculture industry. Since consumer awareness concerning fish health is increasing (Ashley, 2007 ; Grimsrud et al., 2013) and the consumption of omega-3 rich food is highly encouraged (Calder, 2013 ; Calder & Yaqoob, 2009), selecting fish that have high omega-3 content without the negative effects on

health status through increased oxidative stress would be an interesting venue for breeding programs.

CHAPITRE 2
THERMAL TOLERANCE AND FISH HEART INTEGRITY: FATTY ACIDS AS
PREDICTORS OF SPECIES RESILIENCE

Felix Christen¹, France Dufresne¹, Bernard A. Dupont-Cyr¹, Grant W. Vandenberg², Nathalie
R. Le François³, Jean-Claude Tardif⁴, Simon G. Lamarre⁵ and Pierre U. Blier^{1*}

¹Université du Québec à Rimouski, Département de biologie, Rimouski, Québec, G5L3A1

²Université Laval, Département de sciences animales, Québec, Québec, G1V 0A6

³Biodôme de Montréal, Montréal, Québec, H1V 1B3

⁴Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montréal, Québec, H1T 1C8

⁵Université de Moncton, Département de biologie, Moncton, New-Brunswick, E1A 3E9

*Corresponding author: Pierre Blier: Pierre_Blier@uqar.ca

A dernièrement été soumis à Proceedings of the Royal Society of London B.

2.0 Abstract

The heart and cardiovascular system have been singled out as major limiting systems in thermal adaptation but the physiological mechanisms underlying responses to thermal stress are still not completely understood. This study examines the relationship between individual response to a thermal challenge test (CT_{max}), fatty acid content of the heart and ROS production rates in two salmonid species (*Salvelinus alpinus*, *Salvelinus fontinalis*) and their hybrids. Peroxidation index, total omega-3, EPA and arachidonic acid content of fish hearts were negatively correlated with tolerance to an acute temperature increase. These findings underline a potential general causative relationship between specific fatty acids and thermal tolerance.

2.1 Introduction

Global temperatures are rising (Brown & Caldeira, 2017) resulting in the occurrence of periodic extreme heat waves (Diffenbaugh & Field, 2014 ; Gerald & Tebaldi, 2004) and changes in species distribution patterns (Iftikar et al., 2014 ; Sunday et al., 2012). Temperature has intense effects on biochemical reaction rates of all organisms, notably ectothermic species such as fish (Fry, 1971 ; Hochachka & Somero, 1968). Increasing evidence suggests that the heart and cardiovascular system are the major limiting systems in thermal adaptation (reviewed in Eliason and Anttila, 2017). More specifically, heat-induced heart failure seems to be correlated to the critical upper temperature limit (CT_{max}) (Farrell et al., 2009b, 1996 ; Somero, 2002) but the exact physiological mechanisms limiting fish capacity to adapt to acute temperature increases are still not completely understood (Clark et al., 2013).

It has been suggested that oxygen limits the thermal tolerance of ectotherms, as a mismatch exists between oxygen supply and demand in active tissues at high temperatures (Pörtner et al., 2017 ; Pörtner & Knust, 2007). However, oxygen might be more available at high temperatures since oxygen diffusion rates increase with increasing temperatures (Verberk et al., 2011). Mitochondria have also been put forward as causative agents of heat-induced heart failure as their efficiency and ATP production rates decline at temperatures close to an organism's thermal maximum (Blier et al., 2014 ; Ekström et al., 2017 ; Iftikar et al., 2014 ; Iftikar & Hickey, 2013). Mitochondrial functions, catalytic capacities and regulation has been associated in different animal models to its membrane structure and composition and particularly the fatty acid profile (Hulbert et al., 2007).

The diet of fish, especially salmonids is rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) which is reflected in cellular and mitochondrial membrane composition. Fatty acid profiles of the heart have been associated with traits like critical swimming speed and growth in seabass (*Dicentrarchus labrax*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Chatelier et al., 2006 ; McKenzie et al., 1998). Long-term acclimation of species to different thermal habitats is known to be reflected in fatty acid composition of the heart (Ekström et al., 2017). High PUFA content in membranes is susceptible to increase oxidative stress in heart mitochondria (Lemieux et al., 2011) and to increase susceptibility to lipid peroxidation (Else, 2017 ; Hulbert et al., 2017). A

recent study on Arctic char (AC, *Salvelinus alpinus*) showed that ROS production rates of isolated heart mitochondria significantly increase at temperatures close to CT_{max} , underlying the potential role of ROS in heat-induced heart failure (Christen et al., 2018).

Our study aimed to determine if oxidative stress management can partly explain tolerance to high temperature stress in fish. In order to maximise detectable divergence in thermal performance, ROS generation and fatty acid profiles, we chose two species with contrasting geographical distribution patterns. AC with a holarctic distribution and a small temperature range (4-16°C, Fishbase.org) and brook char (BC) with a more southern distribution and wider range of temperatures (0-25°C, Fishbase.org). We also used their respective hybrids AC ♀ x BC ♂ (HA) and AC ♂ x BC ♀ (HB). These two species are known to hybridize in the wild (Bernatchez et al., 1995 ; Hammar et al., 1991) and hybridization is known to disrupt coadapted mito-nuclear gene complexes provoking mitochondrial dysfunction (Ellison & Burton, 2006), which could help to reveal correlations between cardiac ROS metabolism and thermal tolerance.

We predict that BC will outperform AC in CT_{max} performance as it has a more southern distribution (Scott & Crossman, 1973). In a previous study, we detected a negative relationship between ROS production rates of isolated mitochondria and maximum mitochondrial respiration rates (Christen et al., 2018). Some individuals that produced less ROS had higher mitochondrial maximum capacity than others. Our second prediction is that ROS production rates will be highest for individuals with lower performance in heat challenge tests. Finally, we tested if differences in CT_{max} performance were reflected in the fatty acid profile of the heart muscle.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Fish

Arctic char (*Salvelinus alpinus*, AC), Brook char (*S. fontinalis*, BC) and their reciprocal hybrids AC ♀ x BC ♂ (HA) and AC ♂ x BC ♀ (HB), were provided by Pisciculture des Monts de Bellechase Inc. (St-Damien-de-Buckland, QC, Canada) and Aquaculture Gaspésie Inc. (Gaspé, QC, Canada). Mean fish weight was 421.51 ± 55.25 g (AC), 489.73 ± 38.52 g (BC), 301.76 ± 50.8 g (HA) and 271.87 ± 40.11 g (HB). Fish were transported to the Université du Québec à Rimouski's aquatic facilities and placed in 400 L rectangular tanks under natural photoperiod. Open circuit dechlorinated freshwater was supplied at 10°C with a renewal rate of 0.7 L/min. Prior to experiments fish were kept at the facility for at least 4 weeks. All individuals were identified subcutaneously using passive integrated transponders (PIT-Tag, Biomark, ID, USA). Fish were fed daily *ad libitum* and were starved 24h before experiments. All experiments were authorized by the local animal ethics committee in accordance with the Canadian Council on Animal Care.

2.2.2 Temperature challenge test (TCT)

The protocol for TCT was adapted from Roze et al. (2013). The test was realized in 400L rearing tanks with all species combined. The challenge started with a rapid temperature increase for 2.5 hours (10 to 20°C) followed by a steadier increase (approximately 2°C per hour) until the end of the experiment. Fish (N, AC = 18, BC = 17, HA = 16 and HB = 20) were instantly removed after loss of equilibrium and transferred to the initial tank at acclimation temperature, for recovery for at least 2 weeks prior to the subsequent analysis (zero mortality recorded). Fish were identified (PIT-tag reading), the corresponding time and temperature (CT_{max}) were recorded. Water temperature was controlled with two TECO TR15 Aquarium chillers (TECO, Ravenna, Italy) equipped with 400 W heater kits. Two EHEIM universal 300 pumps (EHEIM, Deizisau, Germany) supplied water to the heaters and ensured water homogeneity. Oxygen concentration was sustained by extensive air bubbling and kept above 80% air saturation throughout the whole experiment.

2.2.3 ROS production on permeabilized fibres

Fish (N=10 per strain) were killed by a blow to the head, weighed and the ventricle was immediately extracted and washed blood free. Subsequently, fresh heart fiber bundles were dissected for each individual and the rest was homogenized in liquid nitrogen and frozen at -80°C for anterior analysis. Fiber bundles were dissected and separated delicately and placed in a Petri dish containing 2 ml of BIOPS (2.77 mM CaK₂EGTA, 7.23 mM K₂EGTA, 5.77 mM Na₂ATP, 6.56 mM MgCl₂-6H₂O, 20 mM taurine, 20 mM imidazole, 0.5 mM dithiothreitol, 50 mM K-MES, 15 mM Na-phosphocreatine and 50 mM sucrose, pH 7.1) and 5 mg/ml of saponin and incubated for 30 min on a rotating plate at 60 rpm to permeabilize cell membranes. Samples were then washed with MiR05 (200 mM sucrose, 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM taurine, 20 mM HEPES, and 0.2% BSA, pH 7.2) 3 times and incubated for 30 min in 2.1 of MiR in the presence of two fluorescence probes (5 μM CellROX Deep Red and 400 nM of MitoTracker Green FM; both from Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Incubation was conducted at 25°C in the presence of 10 mM pyruvate, 2 mM malate, 10 mM succinate and 5 mM of ADP, kept in an opaque box and placed on a rotating plate at 60 rpm. 25°C was chosen in order to mimic maximum stress conditions, previously determined during the thermal challenge tests. Individuals were then washed twice with MiR to remove any excess dye and transferred to a 35 mm glass-bottom Petri dish (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) and the dish was set on the microscope stage (LSM 700, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Zen 2009 software captured the fluorescence in two channels, 488 (CelloX Deep Red) and 640 (Mitotracker Green) (±10 nm), at ×40 magnification. Two random sections of bundles were imaged per sample, with images taken at 1.5 μm intervals using the Z-stack function. Analysis was conducted in ImageJ using the Z-project command. Fluorescence at 488 nm was divided by that captured at 640 nm to standardize ROS to mitochondrial density.

2.2.4 Fatty acid profiles of ventricular muscle

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) was 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.

2.2.5 Calculations and Statistical Analysis

Peroxidation index (PI) and unsaturation index (UI) were calculated according to Hulbert et al., 2007 , these values are commonly presented without units :

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

$$UI = (1 \times \% \text{ monoenoics}) + (2 \times \% \text{ dienoics}) + (3 \times \% \text{ trienoics}) + (4 \times \% \text{ tetraenoics}) + (5 \times \% \text{ pentaenoics}) + (6 \times \% \text{ hexaenoics})$$

In order to generate mass independent data of time to CT_{max}, PI, eicosapentaenoic acid (EPA), arachidonic acid (ARA) and total n-3-content, residuals were calculated from least linear regression analysis on body mass. Relationships between time to CT_{max} the various variables were established using linear regression analysis. Differences in mean values of fatty acid profiles, ROS, and morphological parameters were calculated using a one-way analysis of variance (*p-value* < 0.05) followed by a Tukey HSD test. TCT duration and CT_{max} differences among groups were tested using Welch's anova for unequal variances. All values are reported as mean ±SEM. All statistical tests have been performed using R (R Core Team (2013). R: A

language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>)

2.3 Results

2.3.1 Temperature challenge test (TCT) mass effect and ROS production

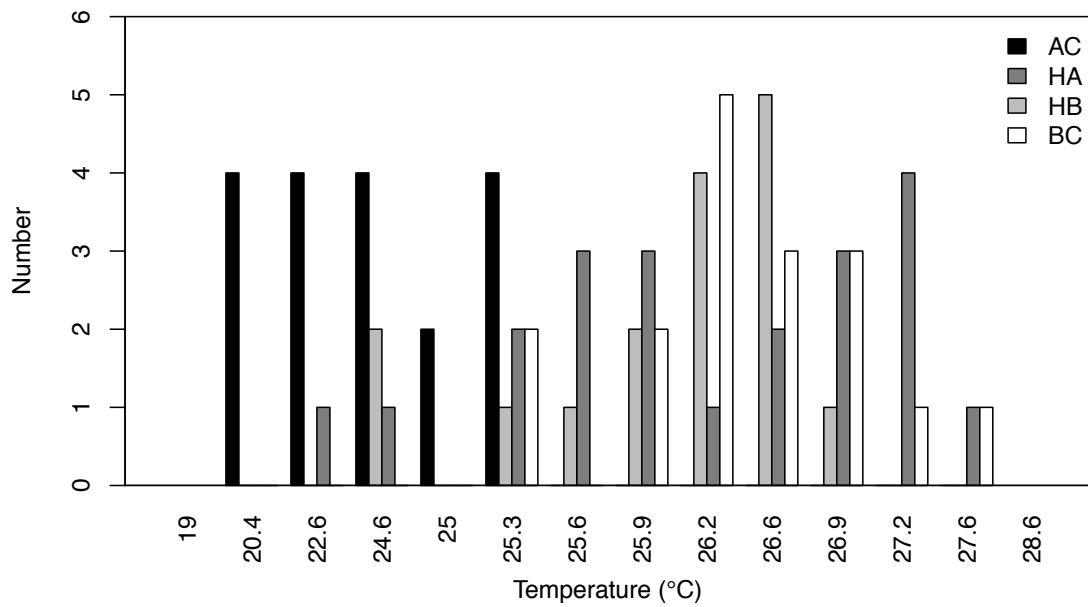


Figure 2.1 : Frequency distribution of CT_{max} (Temperature at which fish lose equilibrium) of the 4 experimental groups. Arctic char (AC, black bars), Hybrid arctic (HA, dark grey bars), Hybrid brook (HB, light grey bars) and Brook char (BC, white bars), N = 18, 21, 16 and 17 respectively.

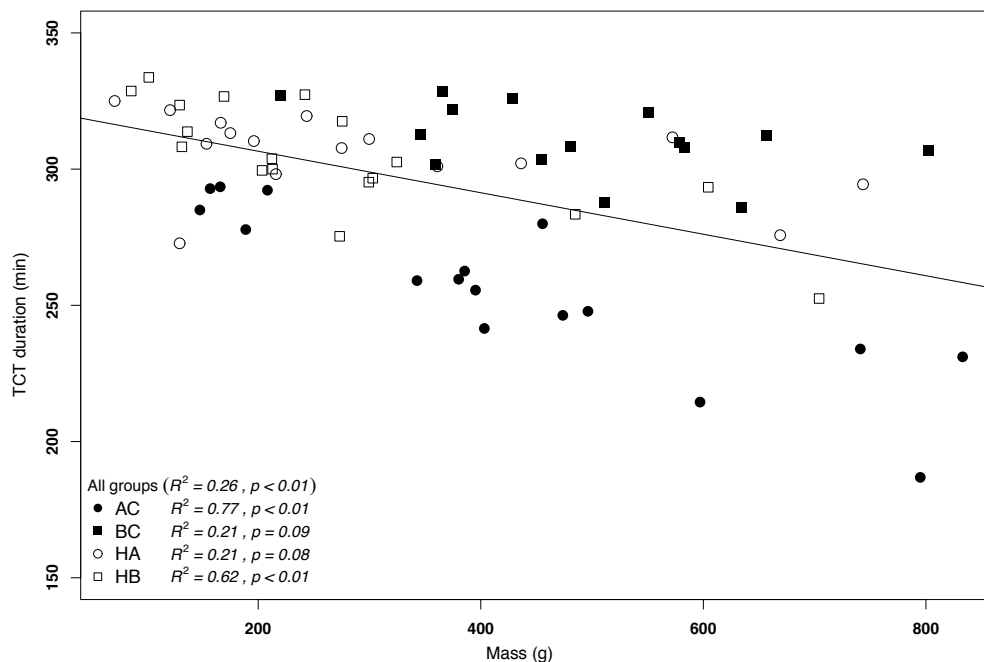


Figure 2.2 : Relationship between body mass (g) and TCT challenge duration (min). Arctic char (AC, full circles), Brook char (BC, full squares), Hybrid arctic (HA, empty circles) and Hybrid brook (HB, empty squares). Equation for all groups; TCT duration (min) = $-0.08x+321.8$, for AC: TCT duration (min) = $-0.12x+306.28$, BC: TCT duration (min) = $-0.04x+330.27$, HA: TCT duration (min) = $-0.03x+315.65$, HB: TCT duration (min) = $-0.1x+330.78$.

BC had a significantly higher mean body mass than HB and HA but not than AC (Table 2.1). Heart mass did not differ among the two species and their hybrids (Table 2.1). AC was the least heat tolerant group with the lowest mean CT_{max} value ranging between 20°C and 25.3°C compared to the three other groups which had higher mean CT_{max} and values ranged between 22°C and 27.6°C (Fig 2.1, table 2.1). CT_{max} values did not differ among BC and the hybrids. Duration time in the thermal challenge showed similar responses. Body mass was negatively correlated with time to CT_{max} in AC and HB (Fig 2.2, linear regression, $p < 0.01$ for both strains) but not in BC and HA. This negative relationship between TCT and body mass prevailed when all four groups were included (Fig 2.2, $p < 0.01$). Mean ROS levels were not significantly different among the four groups (Table 2.1) nor were they correlated to any other variable (data not shown).

Table 2.1: Mean values of morphologic, temperature related and ROS variables

Parameter	Group			
	Arctic Char	Brook Char	Hybrid Arctic	Hybrid Brook
CT _{max} (°C)	23,58 ± 0,34 ^a	26,19 ± 0,16 ^b	25,91 ± 0,19 ^b	25,88 ± 0,23 ^b
TCT duration (min)	256,48 ± 7,18 ^a	310,70 ± 3,35 ^b	305,26 ± 3,94 ^b	304,54 ± 4,92 ^b
Mass (g)	421,51 ± 53,25 ^{a,b}	489,73 ± 38,53 ^b	283,73 ± 50,78 ^a	271,87 ± 40,11 ^a
Heart mass (g)	0,59 ± 0,07 ^a	0,54 ± 0,05 ^a	0,38 ± 0,07 ^a	0,38 ± 0,05 ^a
Heart/mass ratio	1,48 ± 0,07 ^{a,b}	1,09 ± 0,05 ^b	1,31 ± 0,06 ^{a,b}	1,45 ± 0,06 ^a
ROS (arb. U.)	0,86 ± 0,13 ^a	1,02 ± 0,20 ^a	1,09 ± 0,32 ^a	0,93 ± 0,27 ^a
N (NROS)	17(8)	15(9)	16(9)	18(8)

Values are mean ± SEM.

CT_{max}, Critical maximum temperature; TCT, Temperature challenge test; NROS, the numbers in brackets represent the number of individuals used in the oxidative stress experiments, ROS (arb. U.) values are expressed in arbitrary units

Dissimilar letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups

2.3.2 Fatty acid profiles and correlations with time to CT_{max}

Table 2.2 : Lipid composition (% of total fatty acids) of cardiac muscle of the four groups, Arctic char, Brook char, Hybrid arctic and hybrid brook.

Fatty Acids	Group							
	Arctic char		Brook Char		Hybrid Arctic		Hybrid Brook	
C16_0	19,35	± 0,62 ^a	16,67	± 0,82 ^a	16,83	± 0,69 ^a	17,85	± 0,72 ^a
C18_0	3,78	± 0,11 ^a	3,19	± 0,19 ^a	3,30	± 0,15 ^a	3,30	± 0,21 ^a
∑ SFA	26,33	± 0,65 ^a	25,09	± 1,00 ^a	24,95	± 0,73 ^a	25,83	± 0,68 ^a
C16_1	4,96	± 0,62 ^a	8,93	± 1,16 ^b	7,75	± 0,82 ^{a,b}	6,50	± 0,82 ^{a,b}
C18_1	13,95	± 0,94 ^a	19,06	± 1,69 ^{a,b}	18,24	± 1,86 ^{a,b}	20,76	± 1,47 ^b
∑ MUFA	20,13	± 0,84 ^a	29,68	± 1,23 ^b	26,99	± 1,18 ^b	26,02	± 1,37 ^b
C18_2n6	3,20	± 0,18 ^a	4,36	± 0,29 ^b	4,61	± 0,24 ^b	3,93	± 0,27 ^{a,b}
C20_4n6 (ARA)	2,46	± 0,09 ^a	1,56	± 0,11 ^b	1,63	± 0,11 ^b	1,76	± 0,11 ^b
∑ Omega-6	6,16	± 0,21 ^a	6,46	± 0,27 ^a	6,82	± 0,19 ^a	6,07	± 0,25 ^a
C18_3n3	0,72	± 0,11 ^a	0,92	± 0,13 ^a	0,80	± 0,15 ^a	0,60	± 0,14 ^a
C22_5n3 (DPA)	2,49	± 0,12 ^a	2,41	± 0,24 ^a	2,60	± 0,11 ^a	2,40	± 0,21 ^a
C20_5n3 (EPA)	9,30	± 0,18 ^a	8,25	± 0,22 ^b	8,87	± 0,17 ^b	8,87	± 0,21 ^b
C22_6n3 (DHA)	32,77	± 1,13 ^a	24,19	± 1,36 ^b	25,43	± 1,50 ^b	27,30	± 1,53 ^b
∑ Omega-3	47,18	± 0,98 ^a	38,36	± 1,23 ^b	40,76	± 1,33 ^b	41,65	± 1,30 ^b
n-3/n-6	7,80	± 0,32 ^a	6,15	± 0,42 ^b	6,10	± 0,33 ^b	7,11	± 0,41 ^{a,b}
∑ PUFA	53,55	± 0,97 ^a	45,23	± 1,11 ^b	48,05	± 1,21 ^b	48,16	± 1,17 ^b
PI	360,57	± 8,44 ^a	288,40	± 10,2 ^b	304,34	± 11,0 ^b	314,88	± 11,0 ^b
UI	303,18	± 5,59 ^a	258,09	± 6,58 ^b	269,19	± 7,09 ^b	274,24	± 6,79 ^b
N	17		15		16		18	

Values are means ± SEM.

SFA, Saturated Fatty acids; MUFA, Monounsaturated fatty acids; ARA, arachidonic acid; DPA, Docosapentaenoic acid; EPA, Eicosapentaenoic; DHA, Docosahexaenoic acid; n-3/n-6, omega-3/omega-6 ratio; PUFA, Polyunsaturated fatty acids, Peroxidation Index; UI, Unsaturation Index

Dissimilar letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups.

The four fish groups differed significantly in their heart lipid profiles (Table 2.2). Hexadecanoic acid (C16_0), Octadecanoic acid (C18_0), saturated fatty acids (SFA), Omega-6 content, α -linolenic acid (C18_3n3) and docosapentaenoic acid (C22_5n3, DPA) did not show significant differences among groups. Monounsaturated fatty acid content was lower in AC than the three other groups. This was mainly due to relatively lower palmitoleic (C16_1)

and vaccenic acids (C18_1) content in AC. Arachidonic acid (ARA, C20_4n6), eicosapentaenoic acid (EPA, C20_5n3), docosahexaenoic acid (DHA, C22_6n3), omega-3, total PUFA, peroxidation and unsaturation index (PI, UI) were significantly higher in AC compared to the three other groups. AC had higher N3/N6 ratios than BC and HA but had similar ratios to HB.

PI, total n-3 content, EPA and ARA were negatively correlated with temperature tolerance (Fig 2.3 a-d, $p < 0.01$). The relationship was most significant for EPA. AC and BC individuals had the most extreme values in the four regression plots, with hybrid groups having values intermediate to the parental groups and a slightly closer to BC than to AC.

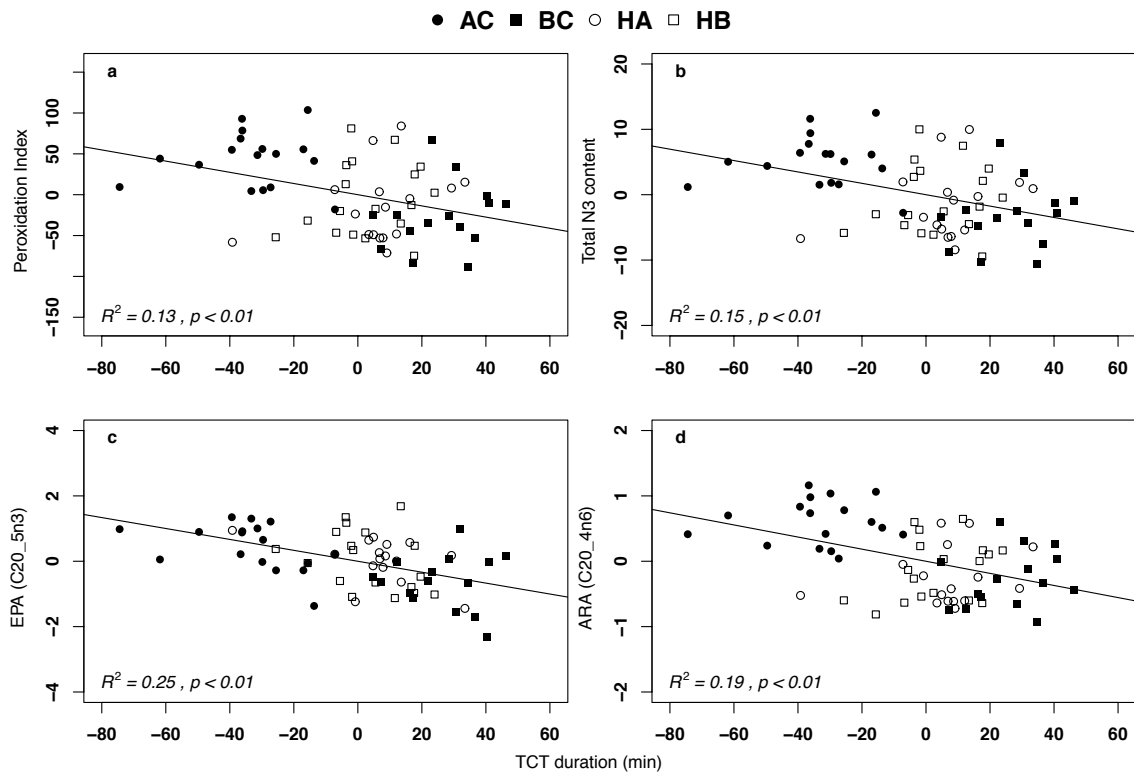


Figure 2.3 : Relationships between Peroxidation Index (a), total omega-3 content (b), EPA (c), ARA (d) and temperature challenge test (TCT) duration in min. All values are expressed as residuals calculated from least linear regressions on body mass. Arctic char (AC, full circles), Brook char (BC, full squares), Hybrid arctic (HA, empty circles) and Hybrid brook (HB, empty squares). Equation a) Peroxidation index = $-0.69x + 8.74 \cdot 10^{-15}$, b) Total n-3 content = $-0.087x + 3.32 \cdot 10^{-16}$, c) EPA = $-0.017x + 8.6 \cdot 10^{-17}$ and d) ARA = $-0.009x + 3.93 \cdot 10^{-17}$.

2.4 Discussion

The mechanisms underlying critical heart failure in ectotherms at high temperatures have received extensive attention in recent years. Mitochondria are thought to play an essential role in thermal tolerance as their efficiency and integrity seem to be impaired at temperature close to the thermal maximum (Ekström et al., 2017 ; Hilton et al., 2010 ; Iftikar & Hickey, 2013 ; Rodnick et al., 2014). Mitochondria are not merely ATP producing facilities, they also contribute to the production of reactive oxygen species (ROS) which play a key role in mitochondrial quality control, inducing apoptosis or de novo synthesis of mitochondria (Lane, 2011). On the downside, these molecules, may cause damage to proteins, DNA and especially membrane lipids resulting in what is called oxidative stress. The implications of oxidative stress in setting thermal tolerance limits have yet to be elucidated. This study provides evidence that membrane susceptibility to oxidative stress in the heart muscle limits an organism's capacity to face increasing temperatures. In addition to that, individuals and species with high omega-3 content in the heart, are less tolerant to an acute increase in environmental temperature.

2.4.1 Thermal tolerance and body mass

CT_{max} values were within the range of previously reported values for BC and AC (Galbreath et al., 2006 ; Penney et al., 2014). The lower CT_{max} of AC can partly be explained by their more northerly distribution and adaptation to lower temperature environment (Madeira et al., 2012). Interestingly both hybrid groups performed as well as BC in TCT. To our knowledge, these are the first CT_{max} values reported for char hybrids. Hybridization between closely related species or divergent populations can lead to increased heat tolerance (Edmands & Deimler, 2004 ; Pereira et al., 2014 ; Willett, 2010). It is possible that genes coming from BC have an over-dominant effect, causing the superior performance of both hybrids groups over AC. Our results are not surprising as hybrid breakdown resulting from a disruption of mitochondrial and nuclear genome interactions are only seen in F2 hybrids, not in F1 (Ellison et al., 2008; Barreto and Burton, 2013).

Our results suggest there is an interaction between growth rates and environmental adaptation performance. Even if the negative relationship between mass and time to CT_{max} was only

significant for AC and HB (Fig. 2.1) we decided to correct mass independent data for all groups, especially because a significant relationship between mass and CT_{max} was found when all groups were combined. Multiple studies have shown decreased performance in heat tolerance for individuals or groups with higher body mass or growth rates (Daufresne et al., 2009 ; Pörtner & Knust, 2007 ; Roze et al., 2013). Clark et al. (2008) suggest that poorer oxygenation of the spongy myocardium in bigger fish induce decreased heat tolerance. (Clark et al., 2008). Further research is needed to delineate whether these differences in performances are induced by constraints in heart morphology and oxygenation or mitochondrial functions.

2.4.2 Fatty acid profiles, oxidative stress and thermal tolerance

Our study is the first, to our knowledge, to report a negative correlation between peroxidation index and thermal tolerance. This is of particular importance, because increased temperature has been associated with increased mitochondrial ROS production, in mice (Qian et al., 2004) and more recently in Arctic char (Christen et al., 2018). Low PI values have been associated with increased resistance to oxidative stress in isolated mitochondria of marine mollusks (Munro & Blier, 2012). We recently showed that dramatic increase in ROS production at temperature close to CT_{max} in heart mitochondria of AC could possibly lead to heat induced heart failure (Christen et al., 2018). Such elevated ROS generation rates at high temperatures would be more perilous for individuals with high PI values, amplifying the impacts of oxidative stress and ultimately resulting in heart failure. The similar negative relationship between total omega-3 content and thermal tolerance supports this hypothesis. Because omega-3 are very prone to peroxydation, high omega-3 content would further amplify oxidative stress and potential damage to mitochondrial and cellular membranes. Consequently, higher total omega-3 content should be associated with a higher antioxidant capacity to alleviate the possible negative effects of increased susceptibility to oxidative stress (Eritsland, 2000 ; Tsuduki et al., 2011). Total omega-3 content and PI correlations with time to CT_{max} , display a comparable pattern since long chain polyunsaturated fatty acids such as omega-3s have a strong impact on overall PI.

EPA (and DHA, data not shown $R^2=0.09$, $p=0.02$) was also negatively correlated to thermal resistance. The relationship here is strong and does not appear to be dictated by differences among the four experimental groups. Such a negative association between EPA content and

related physiological traits has already been shown in seabass (Chatelier et al., 2006 ; McKenzie et al., 1998). These two studies detected decreased critical swimming speed for individuals with higher EPA content in cardiac tissue. This negative relationship of higher omega-3 content with such traits seems counterintuitive as omega-3 and their metabolites are known to have beneficial effects on health in humans and fish (Calder, 2013 ; Martinez-Rubio et al., 2012). The metabolization of omega-3s into anti-inflammatory metabolites like resolvins depends on specific enzymes and possibly selenium (Berr et al., 2009) whereas oxidative stress induced fatty acid degradation is a random process. Consequently, in individuals with high omega-3 content, particularly in their membranes, the negative repercussions of the oxidation of LC-PUFA through oxidative stress induction might prevail over the beneficial effects of n-3 metabolites during strenuous solicitations of aerobic metabolism. This is particularly true for species with an extremely high omega-3 content like salmonids. As an example, McKenzie et al. (1998) failed to detect a positive relationship between the concentration of cardio protective metabolites of PUFA, like thromboxane A₂ and prostacyclin and critical swimming speed performance in seabass (McKenzie et al., 1998). At least for these two metabolites of n-3 degradation, no correlations with critical swimming speed have been detected. Further work on specific metabolites will help to pinpoint mechanisms involved in heat-induced heart failure. A recent study on ARA's metabolites (Moon et al., 2017) showed that during heart failure, the activity of enzymes catalyzing the degradation of ARA into proapoptotic metabolites increases whereas the pathway for the cytoprotective metabolites decreases. It would be interesting to test whether this mechanism is involved in heat-induced heart failure in fish.

Total MUFA content was lowest in the less heat tolerant AC, which is in line with previous results on fatty acid metabolism and carnitine palmitoyl transferase activity (CPT). Mono-unsaturated fatty acids seem to be preferable fuels for CPT and subsequently energy metabolism in various fish species (Sidell et al., 1995). If the lipid profile of the ventricular muscle is similar to those in lipid reserves, the following hypothesis might apply. As energy demands increase with temperature and as fatty acids are important fuels for ATP production in mitochondria, a lower MUFA content could impose limitations on energy supply at elevated temperatures.

No significant relationship was found between ROS levels and temperature tolerance or fatty acid profiles in any of the four groups. This is in contrast to the increased susceptibility to peroxidation in less heat tolerant fish and increased ROS production at high temperature in AC mitochondria (Christen et al., 2018). As we measured ROS levels in permeabilized fibers, it is possible that increased efflux of ROS at higher temperatures is sufficiently buffered by the endogenous antioxidant system, to impede the sensitivity of the method and limit the capacity to detect any differences of mitochondrial ROS efflux (Banh et al., 2015). The technique used does not allow to discriminate which specific ROS were marked, reducing the scope of sensitivity of the method. Considering the strong correlation of PI or PUFA content and CT_{max} as well as the putative link between fatty acids susceptibility to peroxidation and ROS induced mitochondrial dysfunctions, additional experiments on the rate of mitochondrial peroxide production are needed.

2.5 Conclusion

Our study revealed that peroxidation index, omega-3, EPA and ARA content of the fish heart are all negatively correlated with tolerance to an acute temperature increase. Future work should focus on metabolites of specific fatty acids and their implications in thermal tolerance in order to pinpoint the underlying molecular mechanisms responsible for heart failure during heat stress. Furthermore, quantification of oxidative damage in cardiac tissues of heat tolerant and less tolerant individuals could help to better understand the role of oxidative stress in setting thermal limits.

CHAPITRE 3
THERMAL TOLERANCE AND THERMAL SENSITIVITY OF HEART
MITOCHONDRIA: MITOCHONDRIAL INTEGRITY AND ROS PRODUCTION

Felix Christen¹, Véronique Desrosiers¹, Bernard A. Dupont-Cyr¹, Grant W. Vandenberg²,
Nathalie R. Le François³, Jean-Claude Tardif⁴, France Dufresne¹, Simon G. Lamarre⁵ and
Pierre U. Blier^{1*}

¹Université du Québec à Rimouski, Département de biologie, Rimouski, Québec, G5L3A1

²Université Laval, Département de sciences animales, Québec, Québec, G1V 0A6

³Biodôme de Montréal, Montréal, Québec, H1V 1B3

⁴Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montréal, Québec, H1T 1C8

⁵Université de Moncton, Département de biologie, Moncton, New-Brunswick, E1A 3E9

*Corresponding author: Pierre Blier: Pierre_Blier@uqar.ca

Paru en 2018 dans *Free Radical Biology and Medicine*

3.0 Abstract

Cardiac mitochondrial metabolism provides 90% of the ATP necessary for the contractile exertion of the heart muscle. Mitochondria are therefore assumed to play a pivotal role in heart failure (HF), cardiovascular disease and ageing. Heat stress increases energy metabolism and oxygen demand in tissues throughout the body and imposes a major challenge on the heart, which is suspected of being the first organ to fail during heat stress. The underlying mechanisms inducing heart failure are still unclear. To pinpoint the processes implicated in HF during heat stress, we measured mitochondrial respiration rates and hydrogen peroxide production of isolated Arctic char (*Salvelinus alpinus*) heart mitochondria at 4 temperatures: 10 °C (acclimation), 15 °C, 20 °C and 25 °C (just over critical maximum). We found that at temperature ranges causing the loss of an organism's general homeostasis (between 20 °C and 25 °C) and with a substrate combination close to physiological conditions, the heat-induced increase in mitochondrial oxygen consumption levels off. More importantly, at the same state, hydrogen peroxide efflux increased by almost 50%. In addition, we found that individuals with low mitochondrial respiration rates produced more hydrogen peroxide at 10 °C, 15 °C and 20 °C. This could indicate that individuals with cardiac mitochondria having a low respiratory capacity, have a more fragile heart and will be more prone to oxidative stress and HF, and less tolerant to temperature changes and other stressors. Our results show that, at temperatures close to the thermal limit, mitochondrial capacity is compromised and reactive oxygen species production rates increase. This could potentially alter the performance of the cardiac muscle and lead to heat-induced HF underlining the important role that mitochondria play in setting thermal tolerance limits.

Keywords: mitochondria, heart failure, CTmax, hydrogen peroxide, ROS, temperature, complex I, fish

3.1 Introduction

The heart is a muscle that supplies oxygenated blood to the rest of the body and its contractile exertion requires large amounts of energy in the form of adenosine triphosphate (ATP). Mitochondria provide 90% of the ATP needed for muscle work and cellular homeostasis (Harris & Das, 1991 ; Ingwall, 2002). They therefore play a pivotal role in heart failure (L. Chen & Knowlton, 2010 ; Marín-García et al., 2013), various cardiovascular diseases (Ballinger, 2005) and the ageing heart (Martín-Fernández & Gredilla, 2016). Among major impacts of mitochondrial impairment during HF are, losses in cellular calcium equilibrium (Santulli et al., 2015), decline of energy metabolism (Lesnefsky et al., 2016), supercomplex disassembly (Rosca et al., 2008), reactive oxygen species (ROS) production (Hafstad et al., 2013) and apoptosis induction (Wu et al., 2009). The dysfunctional mitochondria will cease to provide a sufficient energy supply to fuel the heart (Neubauer, 2007) ultimately leading to HF. The prevalence of mitochondrial dysfunction associated with HF has made them a major therapeutic target (Ajith, 2014 ; Brown et al., 2017). Fueling the heart with adequate amounts of energy substrates becomes of particular importance when biochemical reaction rates accelerate due to an increase in temperature (Hochachka & Somero, 1968). The cardiovascular system, and especially the heart, are central to an organism's capacity to face heat stress (Blier et al., 2014 ; Cui & Sinoway, 2012). In mammals, heart mitochondria are extremely sensitive to minor temperature shifts above 37°C and integrity becomes rapidly affected (Lemieux et al., 2017b, 2011). In ectotherms such as fish, the heart is of paramount importance in temperature adaptation. It is suspected of being the first organ to fail during heat stress (Farrell, 2002 ; Farrell, 1996 ; Somero, 2002), and more and more research is pointing towards cardiac mitochondria playing an important role in temperature adaptation (Baris et al., 2017, 2016 ; Chung et al., 2017 ; Pichaud et al., 2017). Despite the important role of mitochondria, we still lack a full understanding of the relationship between mitochondria, heart metabolism and temperature. Two studies have confirmed that despite saturating oxygen supply, permeabilized cardiac fibers are showing impaired metabolic integrity prior to heat stress induced HF (Iftikar et al., 2014 ; Iftikar & Hickey, 2013). More precisely, mitochondria failed to generate ATP at temperatures close to HF, which would clearly undermine the normal function of the cardiac muscle. Other than mitochondrial respiration rates, ROS production also seems to be affected by temperature increase in ectotherms (Abele, 2002 ; Blier et al., 2014 ; Iftikar & Hickey, 2013)

and ROS are known to be implicated in HF (Hafstad et al., 2013 ; Marín-García et al., 2013). Long being treated as a mere by-product of energy metabolism, it is now clear that mitochondrial-generated ROS play an essential role in cell-signaling. For instance, they act as signaling molecules in mitochondrial quality control, inducing apoptosis or *de novo* synthesis of mitochondria (Lane, 2011). Qian and coworkers (2004) came to the conclusion that an impairment of mitochondrial function in the rat heart due to heat stress, provoked cellular injury caused by oxidative stress and even cell death in cardiomyocytes (Qian et al., 2004). Whether induced through temperature, diseases or increased ROS production, altogether these results leave little doubt on the critical role that mitochondria are playing in the failing heart.

Studies addressing the temperature effect on mitochondrial respiration and ROS production close to lethal temperatures are scarce. Moreover, the substrate combinations used in numerous studies do not approach typical physiological conditions. Even fewer studies examined isolated heart mitochondria. When tested in cells, tissues or whole organisms, mitochondrial function and ROS production can be influenced by different factors such as cytosolic antioxidants as well as the plasma membrane (Munro & Treberg, 2017). Thus, we suggest that isolated mitochondria provide a powerful tool to test the effect of changes in the environment on mitochondrial physiology and we will attempt to extrapolate these results to the level of the whole organism.

In this context, our study determined the effect of increased temperature on isolated heart mitochondria from Artic char (*Salvelinus alpinus*). The main focus was based on the hypothesis that mitochondrial efficiency and ROS production rates are affected at temperatures close to the thermal maximum of a given individual. We first determined the species critical temperature limit (CT_{max}) using a modified temperature challenge test from Roze *et al.* 2013 (Roze et al., 2013). We then evaluated thermal sensitivity of respiration in isolated heart mitochondria as well as hydrogen peroxide (H_2O_2) production for the same individuals. Mitochondrial function was evaluated by assessing the different components of the electron transport system, while H_2O_2 production was only measured for the state we considered the closest to the physiological conditions. This allowed us to measure both, ROS production and oxygen consumption, in the same mitochondrial preparations close to *in vivo* conditions.

Additionally, this allowed us to carry out a correlation analysis between ROS production and mitochondrial catalytic efficiency (respiration rates).

3.2 Materials and methods

3.2.1 Fish

Arctic char (*Salvelinus alpinus*, Fraser strain) with a mean mass of 286.91 ± 11.64 g were obtained from Aquaculture Gaspésie Inc. (Gaspé, Québec, Canada). Fish were 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 0.7 L/min. Fish were acclimated for at least one month, during that period they were fed twice a week *ad libitum* with a commercial feed (Corey Aquafeeds, New Brunswick, Canada). Fish were starved 24h prior to analysis. All experiments were authorized by the local animal ethics committee in accordance with the Canadian Council on Animal Care. All chemicals have been purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise mentioned.

3.2.2 Temperature challenge test (TCT)

The protocol for TCT was adapted from Roze et al. (Roze et al., 2013). The challenge started with a rapid temperature increase for 2.5 hours (10 to 20°C) followed by a steadier increase (approximately 2°C per hour) until the end of the experiment. Fish were instantly removed after loss of equilibrium and transferred to the initial tank at acclimation temperature, for recovery (zero mortality recorded). The corresponding time and temperature (CT_{max}) were recorded for each fish. Water temperature was controlled with two TECO TR15 Aquarium chillers (TECO, Ravenna, Italy) equipped with 400 W heater kits. Two EHEIM universal 300 pumps (EHEIM, Deizisau, Germany) supplied water to the heaters and ensured water homogeneity. Oxygen concentration was sustained by extensive air bubbling and kept above 80% air saturation throughout the whole experiment.

3.2.3 Isolation of heart mitochondria

Heart mitochondria were prepared following an adapted version of the protocol from Gnaiger and Kuznetsov (2002) (Gnaiger & Kuznetsov, 2002). Fish were killed with a blow to the head, the ventricle was quickly removed, weighed, washed blood free and stored in ice-cold isolation medium (300 mM Sucrose, 0.2 mM EDTA, 10 mM HEPES and 0.1% fatty acid free bovine serum albumin (BSA), pH 7.2). The ventricle was ground with a razor blade and transferred to

a tight-fitting Teflon/glass homogenizer in 5 ml of isolation medium for homogenizing. The resulting solution was then centrifuged for 10 min at 600 g (4°C). Subsequently the supernatant was centrifuged at 8000 g for 10 min (4°C). After the second centrifugation the pellet was rinsed, resuspended in 5 ml of isolation medium and centrifuged at 8000 g for 10 min (4°C). The previous step was repeated once. The final pellet was resuspended in mitochondrial respiration medium (MiR05: 200 mM Sucrose, 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM Taurine, 20 mM HEPES, and 0.2% BSA, pH7.2) and processed immediately. The volume of MiR05 used for the final suspension was calculated for each individual as a function of the ventricle mass. The protein concentration in the mitochondrial suspension was between 2.8 and 4.1 mg of protein/ml, determined by the Bradford method. As MiR05 contains BSA, the protein due to the medium was deducted from the mitochondrial protein content.

3.2.4 High resolution respirometry.

Oxygen consumption of isolated mitochondria was measured using two Oroboros Oxygraph-2K and DatLab 6 software (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Experiments were performed at 4 different assay temperatures 10°C (N=5), 15°C (N=7), 20°C (N=7) and 25°C (N=6). Oxygen sensors were calibrated in air-saturated MiR05 prior to each assay. The oxygen solubility coefficient was adjusted for each experimental temperature as stated in Rasmussen and Rasmussen (2003) (Rasmussen & Rasmussen, 2003). Values were corrected for instrumental and chemical background as well as residual oxygen consumption according to Gnaiger (2009) (Gnaiger, 2009). Two distinct titration protocols were carried out in duplicate in two separate oxygraphs for the same mitochondrial preparation at each temperature. Nomenclature of different respiratory states has been adopted from Lemieux *et al.*, 2017 (Lemieux *et al.*, 2017b). Sequence one was triggered by adding the mitochondrial suspension to the respiration chambers containing 2 ml of MiR05 and Complex I (CI) substrates (10 mM pyruvate, 2 mM malate). This represents CI LEAK (L) respiration in the absence of ADP denoted as PM_L . Excess ADP (5 mM) was added to initiate OXPHOS (P) supported by CI substrates (PM_P). Subsequently succinate (10 mM) was added to measure OXPHOS with CI and II substrates (PMS_P). This was followed by the addition of cytochrome *c* (10 μM) to test for outer mitochondrial membrane integrity (Kuznetsov *et al.*, 2004). FCCP (Carbonyl cyanide p-trifluoro-methoxyphenyl hydrazine, a mitochondrial uncoupler) was then

added sequentially (0.5 μM until no further increase was detected) to stimulate maximum mitochondrial respiration in the uncoupled state (PMS_E). Finally, inhibitors for CI (Rotenone, 0.5 μM), CII (Malonate 5mM) and CIII (Antimycin A, 2.5 μM) were injected to determine residual oxygen consumption. Sequence two was initiated in the presence of succinate (10 mM) and rotenone (0.5 μM) to determine S_L . Again, excess ADP (5 mM) was added, to allow OXPHOS in the presence of succinate (S_P). Residual oxygen consumption was assessed through the addition of antimycin A (2.5 μM) and malonate (5 mM). To determine CIV activity, we added cytochrome *c* (10 μM), ascorbate (2 mM) and TMPD (0.5 mM, N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride) followed by sodium azide (100mM, SAZ). SAZ is an inhibitor of CIV and its addition allows to assay chemical background and accounts for the auto-oxidation of TMPD.

3.2.5 Detection of H_2O_2 production

Hydrogen peroxide production was quantified using the Amplex Red H_2O_2 /Peroxidase Assay Kit (Eugene, OR, USA). In the presence of horseradish peroxidase Amplex Red reacts with H_2O_2 to form Resorufin which has an absorbance at 560 nm (Zhou et al., 1997). Mitochondrial preparations used were the same as for mitochondrial respiration, both assays were performed simultaneously. Mitochondria were incubated in MiR05 containing 10 μM of AmplexRed, 2 U/ml of horseradish peroxidase and 50 U/ml of superoxide dismutase (for conversion of superoxide to H_2O_2). The rate of H_2O_2 production was measured during OXPHOS in the presence of pyruvate (10mM), malate (2mM), succinate (10mM) and ADP (5mM) at the 4 experimental temperatures (10, 15, 20 and 25°C). The increase in fluorescent Resorufin was monitored using a thermoregulated fluorometer (Hitachi, Tokyo, Japan).

3.2.6 Statistical analysis

Normality and homogeneity of variances were tested using a Shapiro-Wilk and Bartlett's test respectively. The effect of temperature on respiration rates and ROS production during PMS_P as well as CI and CII ratios was tested using a one-way analysis of variance (*p-value* < 0.05) followed by Tukey HSD test. Relationships between individual respiration and ROS production rates during PMS_P were established using linear regression analysis. Differences between PMS_P and PM_P+S_P were tested using a pairwise student's t-test (*p-value* < 0.05). All

values are reported as mean \pm SEM. All statistical tests have been performed using R (R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>)

3.3 Results

3.3.1 CT_{max} , PMS_p and H_2O_2 production

At the end of the heat challenge test, fish lost equilibrium at temperatures between 20 °C and 25 °C (Fig. 3.1) with a mean (\pm SEM) CT_{max} of 23.16 ± 0.31 °C.

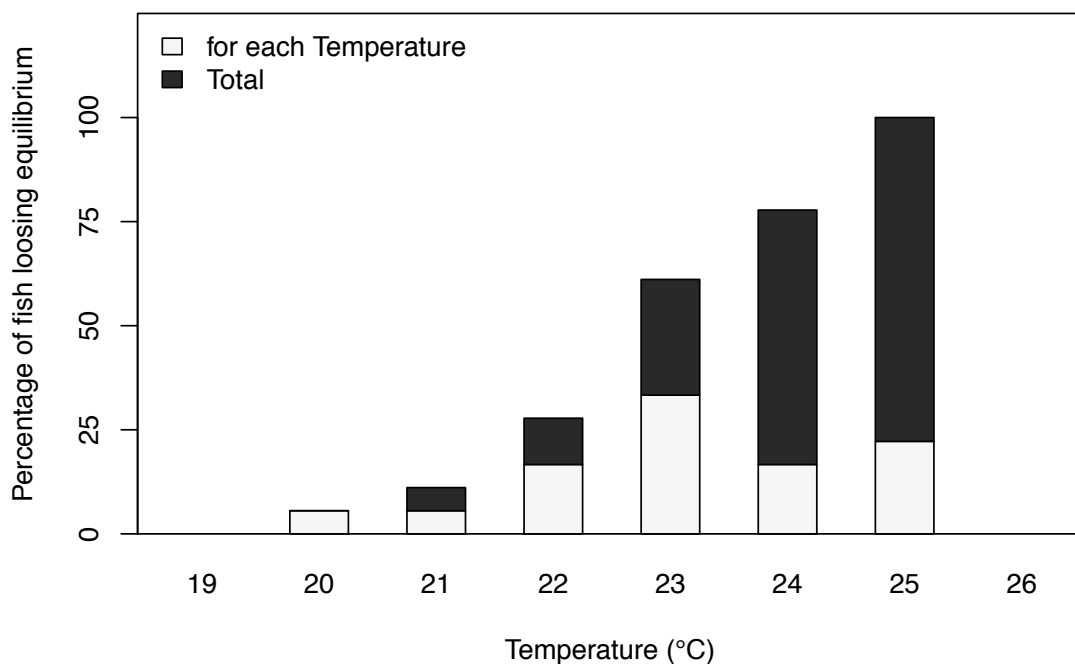


Figure 3.1 : Frequency distribution of CT_{max} (Temperature at which fish lose equilibrium) of experimental fish (n=18).

We measured state 3 respiration (supplemented with pyruvate, malate and succinate, PMS_p) and H_2O_2 production fueled with substrates for CI (pyruvate and malate) and complex II (succinate) to test the effect of temperature at conditions close to *in vivo* conditions. PMS_p significantly increased from 10 °C to 15 °C, to 20 °C and 25 °C (*p-values* = 0.017, < 0.01 and < 0.01 respectively, Fig. 3.2) starting at 1.08 ± 0.07 nmol of O_2 s^{-1} mg of protein $^{-1}$ and followed by 2.05 ± 0.22 , 2.61 ± 0.2 and 2.34 ± 0.23 . At 25 °C mitochondria produced more ROS than at 10 °C, 15 °C or 20 °C ($P = < 0.001$, 0.02 and 0.001). Hydrogen peroxide generation almost doubled from 0.042 ± 0.003 nmol of H_2O_2 min^{-1} mg of protein $^{-1}$ at 10 °C and 0.049 ± 0.009 at 20 °C to 0.096 ± 0.006 at 25 °C (Fig. 3.2).

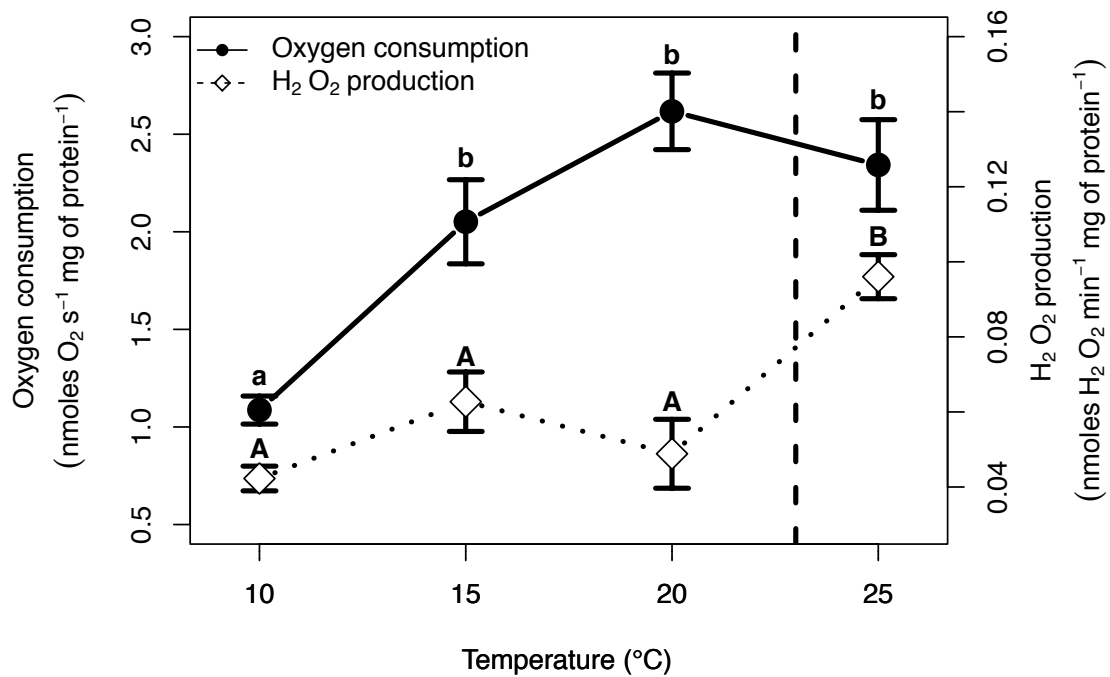


Figure 3.2 : Effect of temperature on mitochondrial oxygen consumption (closed black circles) and hydrogen peroxide production (open white diamonds) during PMS_P fuelled with pyruvate, malate, succinate and ADP (10°C; n = 5, 15°C; n = 7, 20°C; n = 7, 25°C; n = 6). The vertical dashed line represents mean CT_{max} (23.16 ± 0.31°C). Different letters indicate a significant difference, lowercase letters for oxygen consumption and uppercase letters for H₂O₂ production (P < 0.05). Values are mean ± SEM.

Mitochondrial respiration rates plateaued between 20 °C and 25 °C whereas ROS production increased significantly. These changes in mitochondrial functions happen at the same temperature range where fish lost their equilibrium during the heat challenge test. Adding cytochrome c to test outer mitochondrial membrane integrity did not stimulate respiration above 15% (data not shown) and as a result did not reveal any damage (Kuznetsov et al., 2002) across all temperatures (mean increase was 9.01% ± 0.38). Respiratory control ratio (S_P/S_L) decreased from 8.27 ± 0.5 at 15 °C to 6.08 ± 0.14 at 25 °C ($p=0,003$) and remained unchanged at other temperatures (10 °C = 7.85 ± 1.29, 20 °C = 6.79 ± 0.22). PMS_P and PMS_E did not show any significant differences.

3.3.2 Loss of ROS management

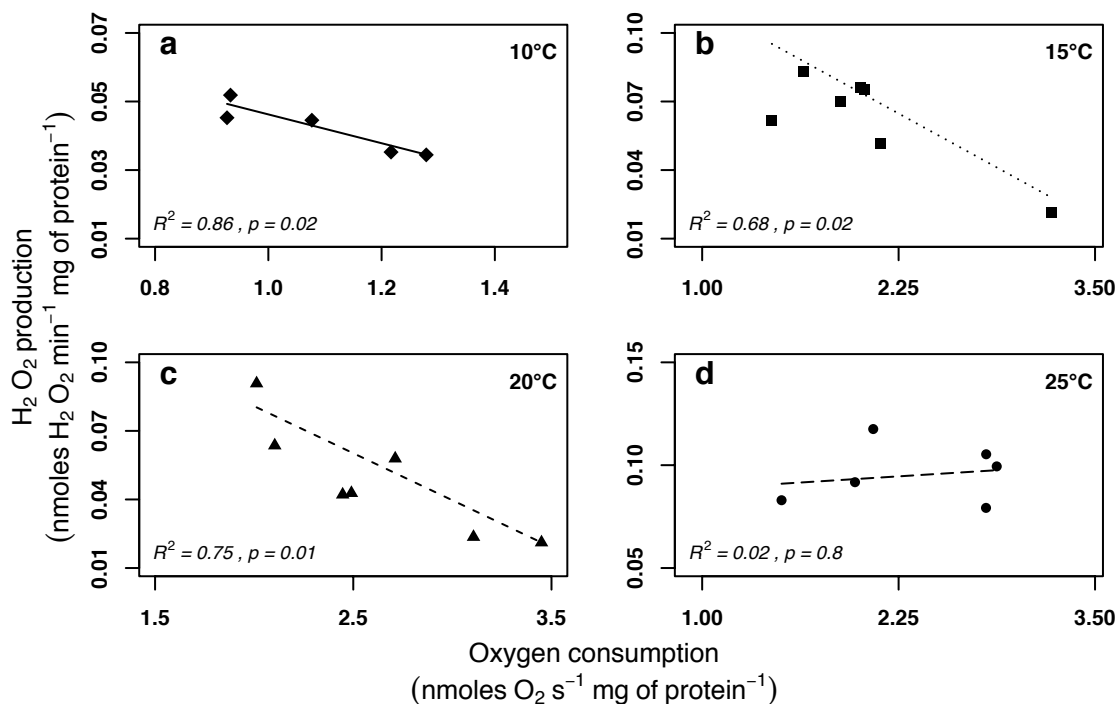


Figure 3.3 : Relationship between individual H_2O_2 production and mitochondrial respiration rates during OXPHOS fueled with pyruvate, malate, succinate and ADP at a) 10°C, b) 15°C, c) 20°C and d) 25°C. R^2 and probability values are from least squares linear regression analysis with the following equations a) $y=0.043x-0.089$, b) $y=0.125x-0.030$, c) $y=0.155x-0.041$, and d) $y=0.003+0.089x$.

We measured OXPHOS and ROS production while supplying pyruvate, malate and succinate to the mitochondria from the same fish. Consequently, we carried out a correlation analysis between both parameters. At 10 °C, 15 °C and 20 °C linear regression analysis demonstrates a negative relationship (Fig.3.3 a, b, c respectively). The higher the respiration rates the lower the ROS production. This significant relationship vanishes at 25 °C (Fig 3.3. d).

3.3.3 Complex I and II

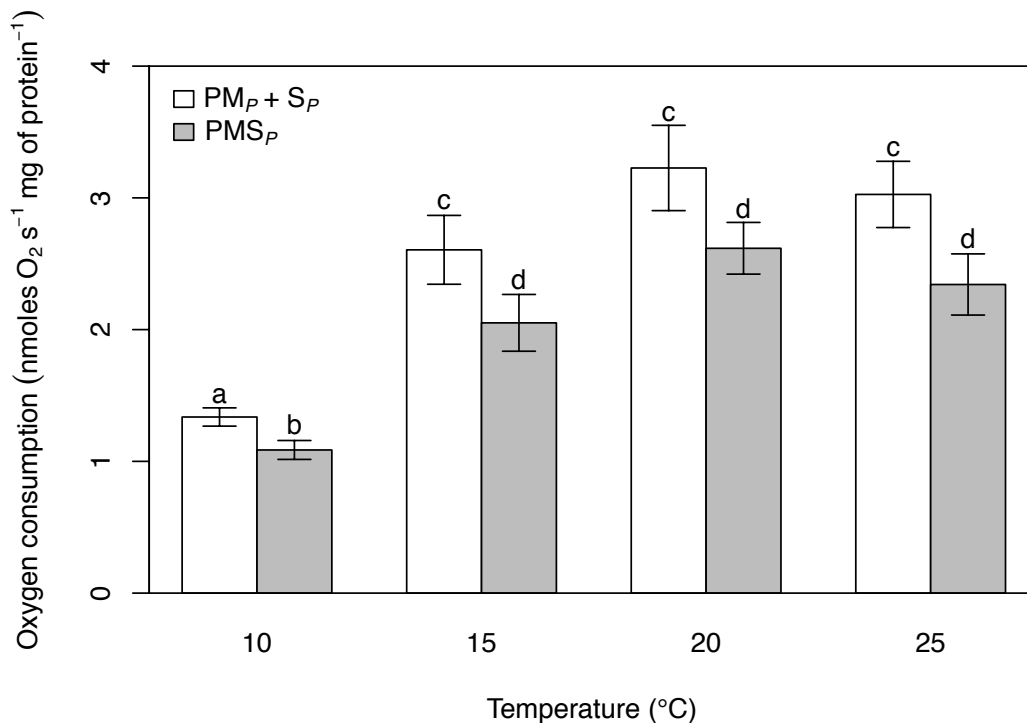


Figure 3.4 : Maximum mitochondrial respiration rates for complex I (CI) and complex II (CII) working concomitantly and the sum of the two working separately. White bars represent the sum of PM_P (pyruvate, malate, ADP) and S_P (succinate, rotenone, ADP). Grey bars show PMS_P (pyruvate, malate, succinate, ADP). Different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$). Values are mean \pm SEM.

Respiration experiments were designed to determine OXPHOS fueled either with CI substrates pyruvate and malate (PM_P) or succinate and rotenone for CII (S_P). Furthermore, we determined state 3 respiration fueled with substrates for both complexes (PMS_P). Figure 3.4 compares PMS_P (i.e. when both complexes work simultaneously) with the sum of PM_P and S_P working separately, denoted as PM_P+S_P. At all temperatures, PMS_P is significantly lower than PM_P+S_P. The mean difference is approximately 19 % across all temperatures. Statistical differences between temperatures follow the same trends as in figure 3.2. To investigate the contribution of CI and II to total respiratory capacity we calculated ratios as follows: CIratio = PM_P / PMS_P, CIIratio = S_P / PMS_P. CIratio increased across temperatures and was significantly higher at 25 °C than at 10 °C, 15 °C or 20 °C (p-values = < 0.01, < 0.01 and 0.012 respectively, Fig. 3.5). The ratio increased from 10 °C to 20 °C (p-value = 0.014) but not from 10 °C to 15 °C

and it remained unchanged from 15 °C to 20 °C and 25 °C. CIIratio remained unchanged over all temperatures. CII contribution was considerably lower than CI contribution.

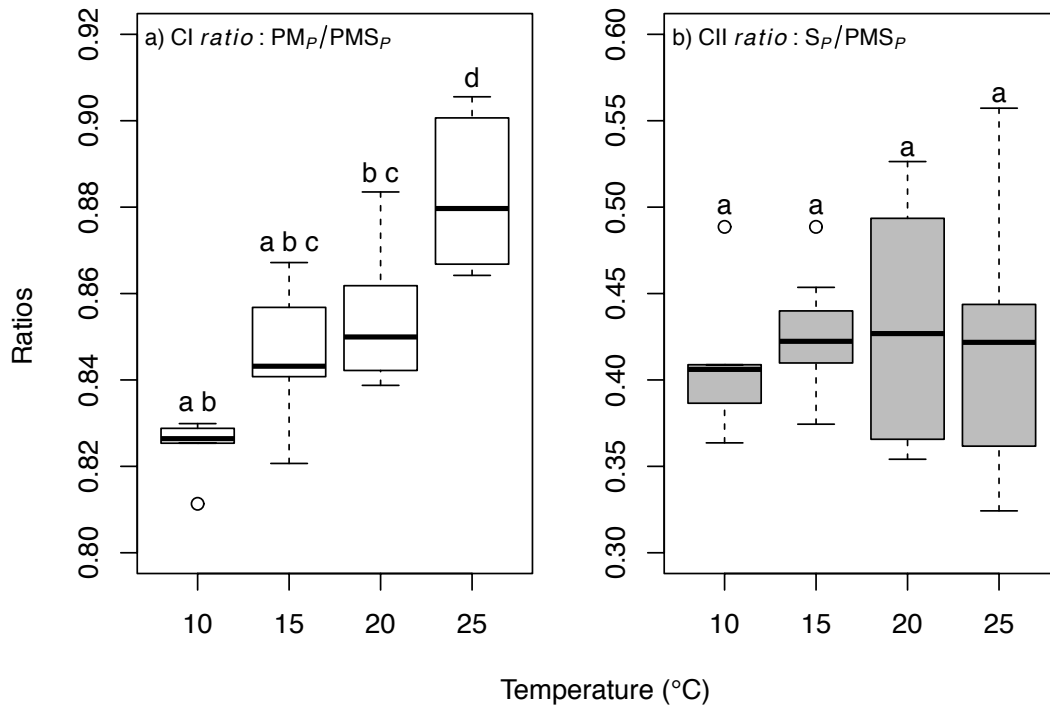


Figure 3.5 : Temperature influence on the relative contribution of complex I (CI) and complex II (CII) to OXPHOS with pyruvate, malate and succinate. a) box plot of the relative contribution of complex I to total respiratory flux. b) box plot of the relative contribution of complex II to total respiratory flux. Box plots show maximum, 75th quartile, median, 25 percentile and minimum. Outliers are represented individually as points. Different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$). Values are mean \pm SEM.

3.4 Discussion

Results from this study clearly show that, high temperature impairs energy metabolism of cardiac mitochondria and increases ROS production drastically at temperature ranges causing the loss of general homeostasis.

3.4.1 Respiration rates at extreme temperatures

Respiration rates in our study are in agreement with published data on isolated heart mitochondria from the spotted wolffish *Anarhichas minor* (Lemieux et al., 2010), Arctic char

(Blier & Lemieux, 2001) and Atlantic cod (Rodnick et al., 2014), isolated liver mitochondria from the killifish *Fundulus heteroclitus* (Du et al., 2016) or isolated heart mitochondria from C57BL6 mice (Hamilton et al., 2016). Others also found a plateau for OXPHOS at temperatures slightly over the thermal maximum of *Notolabrus celidotus* permeabilized heart fibers (Iftikar & Hickey, 2013). Iftikar *et al.*, (2014) found that heart mitochondria PMS_P (with glutamate as additional substrate for CI) continued to increase beyond heart failure temperatures after reaching a plateau for temperatures close to heart failure (HF) in permeabilized fibers of *N. lunare* and *N. celidotus* (Iftikar et al., 2014). In the present study, we did not measure respiration rates at these high temperatures but since respiration rates plateaued at temperature below 25°C, it is quite unlikely that we could have measured any increase at higher temperature. Several studies found patterns comparable to our results, with OXPHOS rates of permeabilized heart, brain and skeletal muscle fibers plateauing or declining at temperatures close to the thermal maximum of the whole organism (Chung et al., 2017 ; Hilton et al., 2010 ; Khan et al., 2014). It has to be noted that some of the above studies worked on permeabilized fibers and not on isolated mitochondria. The latter have been criticized, because the isolation method is thought to affect mitochondrial structure and select for specific subpopulations of mitochondria (Picard et al., 2011). In contrast, a recent study demonstrated that in some models, permeabilization processes may introduce biases which can easily be avoided by isolating mitochondria (Mathers & Staples, 2015). In their example metabolic suppression during torpor of hibernating mammals, was reflected in isolated mitochondria but not permeabilized tissue, indicating that the suppression processes may have been reversed by permeabilization.

3.4.2 Hydrogen peroxide production rates

Concerning H₂O₂ production rates, there is little data available on isolated mitochondria using the same substrate combinations used in our study. Figure 3.2 clearly shows a substantial increase in ROS production at 25 °C during PMS_P for isolated fish heart mitochondria. In isolated mitochondria from rat skeletal muscle, ROS production decreased and respiration increased when temperature was increased from 35 to 42°C (Jarmuszkiewicz et al., 2015) which is the thermal maximum for humans (Bynum et al., 1978). However, with a substrate combination being far from physiological conditions (S_P) it is difficult to compare these to our

results. Another team showed that isolated mitochondria from rat hearts had H₂O₂ production rates that peak at 40°C and then decrease at 42 and 45°C (Zukiene et al., 2010). They also showed that ATP production and membrane potential were completely abolished between 42 and 45°C. Since ROS production and malondialdehyde formation did not increase beyond 40°C, they were unable to correlate oxidative stress to the breakdown in ATP synthesis or decreased membrane potential. Once again, the substrate combinations used here (PM_L) are unlikely to represent *in vivo* conditions. In contrast to our results, ROS production rates did not increase at temperatures close to HF during PMS_P (with added glutamate) in *N.celidotus* permeabilized heart fibers (Iftikar & Hickey, 2013). It is possible that, since they have been working with permeabilized fibres, the thermal sensitivity of ROS production measured did not parallel with sensitivity measured in isolated mitochondria. Mitochondrial ROS production measurements in permeabilized fibers can be tricky since cellular antioxidant defenses can buffer mitochondrial ROS production and fluorescent dye or ROS diffusion patterns across membranes and through cytosol may also significantly bias measurements. One of the reasons we did not detect any increase in mitochondrial hydrogen peroxide production at 15 °C or 20 °C could be that at these temperatures the mitochondria are able to consume a part, if not all, of the ROS produced (Munro & Treberg, 2017). Recent work highlighted the role of mitochondria in ROS consumption and estimated that 43 to 84% of ROS remain within mitochondria (Munro et al., 2016). The dramatic increase in H₂O₂ production at 25 °C shown in our study could therefore result from a delayed response of the antioxidant defense system in response to acute heat stress. ROS production rates of isolated fish mitochondria in response to acute heat stress increase faster than their antioxidant activity (Banh et al., 2015) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*) and lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). Nevertheless, in their study Banh *et al.*, did not measure reactive oxygen species production rates during OXPHOS fueled with substrates for Complex I and II. We could then suspect that the excess of production over buffering capacity could even be higher. Another explanation for high ROS production could be an impairment of the electron transport system at 25 °C, leading to high reduction level of ROS producing sites CI and CIII.

3.4.3 Possible sources of increased ROS production

In addition to a delayed antioxidant response or ETS impairment, membrane composition could also affect ROS production. Diet is known to influence membrane composition and polyunsaturated fatty acid (PUFA) rich diets are susceptible to increase oxidative stress in heart mitochondria (Lemieux et al., 2011) and boost susceptibility to peroxidation (Else, 2017 ; Hulbert et al., 2017). The fish used in this experiment were sourced from a fish farm and had access to a PUFA enriched diet throughout their life, which is likely to be reflected in the membrane composition. The increased ROS production rates at high temperatures observed in our study could have amplified oxidative stress inside the membranes and lead to the generation of reactive products of lipid peroxidation which may cause damage to proteins and DNA (Halliwell & Gutteridge, 2015). This could contribute to the energetic deficiency of mitochondria, the cell and finally the heart. Furthermore, membrane composition and temperature will impact membrane fluidity which is known to influence the functioning of proteins bound to the membrane like ETS complexes (Brand, 2011 ; Hulbert & Else, 2000 ; Martin et al., 2013 ; Seebacher et al., 2010 ; Stubbs & Smith, 1984) and also oxidative stress resistance (Clement et al., 2010). Recently membrane viscosity has also been associated with supercomplex activity (Kuter et al., 2016). The dissociation of supercomplexes has been shown to increase ROS production and cause energetic breakdown in bovine heart mitochondria (Maranzana et al., 2013). Similarly, Jang and coworkers used isolated mitochondria from rat hearts and revealed a disintegration of mitochondrial supercomplexes due to increased ROS production during an event of ischemia-reperfusion (Jang et al., 2017). At extreme temperatures, we believe that it is possible for supercomplexes to dissociate causing increases in ROS production and decreases in OXPHOS as seen in the present study, ultimately leading to heart failure. Nevertheless, we were unable to find data on the possible effect of temperature on the cohesion of supercomplexes.

3.4.4 Higher respiration rates decrease ROS production

The interindividual variability observed in our data, indicate a clear negative relationship between ROS production and mitochondrial oxygen consumption at 10 °C, 15 °C and 20 °C (Fig. 3.3 a, b, c). Individuals with lower mitochondrial respiration rates (PMS_p) generate more hydrogen peroxide. This could suggest, at equal substrate intake, that electrons are more

efficiently channeled up until CIV and molecular oxygen in mitochondria expressing higher respiratory capacities. This higher electron channeling capacity could result in a lower reduction level of ETS and therefore lower ROS production. We could suspect that individuals with higher OXPHOS and lower ROS are more efficient in ATP production at equal electron intake, enabling them to supply more energy to the heart muscle. The rate or efficiency to produce ATP seem to be among the principal characters involved in HF. At high temperatures, the ATP demand could be higher than ATP production rates. For example, Iftikar and Hickey showed that at temperatures close to heart failure, ATP production rates of cardiac heart fibers of fish decrease dramatically (Iftikar & Hickey, 2013). Furthermore, in humans and other mammals, impaired ATP production has been linked to defective contractile exertion, ultimately leading to HF (Neubauer, 2007 ; Ventura-Clapier et al., 2004). Future work should focus on whether or not individuals with high ROS production and low PMS_p perform the poorest in heat challenge tests and ultimately demonstrate lower overall performance. For instance, in mitochondria isolated from the heart of diabetic mice, disease-induced cardiac failure is preceded by a decrease in mitochondrial OXPHOS and an increase in hydrogen peroxide production (Bombicino et al., 2016). This could indicate that individuals with cardiac mitochondria with a low respiratory capacity have a more fragile heart and will be more prone to oxidative stress, HF and less tolerant to temperature changes and other stressors. At 25 °C, the absence of a significant relationship between oxygen consumption and ROS production (Fig. 3.3 d), shows that individuals seem to lose their capacity to cope with higher ROS generation. This is possibly due to the concomitant drastic increase in ROS production and the off-leveling of OXPHOS at 25 °C. This in turn might be caused by CI continuing to supply electrons into the transport system (Fig. 3.5) while OXPHOS capacity appears to be limited (Fig. 3.2).

3.4.5 Roles of complex I and II

In some supercomplex assembly models, electrons are tightly channeled inside the supercomplex and cannot freely access the cytochrome *c* and ubiquinone pools (Blanchi et al., 2004 ; Boekema & Braun, 2007). If electrons cannot freely access these pools, the activation of an additional pathway should have a complete additive effect. In 2013, a group of researchers revealed this additive effect on fibroblasts in CD1 but not C57BL/6J mice (Lapuate-Brun et

al., 2013). The additive activity of NADH and succinate linked pathways were equal to the activity when substrates for CI and CII were present simultaneously. Our results do not show the same trend, with the sum of the activity for CI and CII working separately (PM_{P+S_P}) being significantly higher than the combined capacity (PMS_P) at all temperatures (Fig. 3.4). This is in accordance with results from Lemieux et al. (2017b) who demonstrated similar trends using permeabilized heart fibers from C57 BL/6N mice (Lemieux et al., 2017b). In addition to that, recent studies on the structure of supercomplexes show evidence that there are no completely isolated Q pools inside supercomplexes (Baradaran et al., 2013 ; Letts et al., 2016 ; Vinothkumar et al., 2014) preventing additive effect of the summation of pathways.

Our results show that the relative contribution to total PMS_P does increase with temperature for CI but not for CII (Fig. 3.5). Taking into account that relative CI contribution to total flux is significantly lower at low temperature whereas respiration plateaued at high temperature, electron entry at low temperatures could be a limiting step in energy production while maximal capacity could be set by reactions downstream like the phosphorylation at higher temperature (Blier et al., 2014 ; Lemieux et al., 2017b). Considering that CI is an important site of superoxide generation (Brand, 2011 ; Goncalves et al., 2015) the increase in its proportional activity as well as reverse electron flow (Guarás et al., 2016 ; Scialò et al., 2017) could partly explain the surge in ROS generation at 25 °C. Increased ROS production has been shown to be correlated to CI disassembly (Diaz et al., 2012) which could explain the decreased oxygen consumption observed when both CI and CII are working simultaneously at 25 °C. Our findings attribute to CI a pivotal role in temperature sensitivity and ultimately in HF. Other studies already focused on the role of Complex I in heart pathogenesis (Hickey et al., 2009 ; Ide et al., 1999 ; Karamanlidis et al., 2014).

3.5 Conclusion

Some of the examples cited above do not allow an estimation of maximal respiratory activity or ROS production under physiological condition. By using only CI or CII substrates the electron transport system is broken into isolated electron transport cascades. In order to establish a link between mitochondrial capacity or ROS generation and the whole organism

performance, Goncalves et al. (2015) recommend that substrate combinations and concentrations close to physiological conditions should be used (Goncalves et al., 2015).

All these studies, including ours, show that mitochondrial functions are compromised at temperatures close to or at the thermal maximum of a given species. This coincides with drastic increases in cardiac energy demand potentially impairing cardiac performance and leading to heat induced HF, underlining the important role of mitochondria in setting thermal tolerance.

4. DISCUSSION GENERALE

Les oméga-3 ont joué un rôle primordial dans l'évolution de l'espèce humaine. Ils semblent notamment avoir permis une croissance exponentielle du cerveau (Crawford, 1992 ; Crawford et al., 1999) qui est à la base de la conception d'outils élaborés, d'interactions sociales plus profondes (Crawford et al., 2001) et d'un meilleur taux de survie infantile (Cunnane & Crawford, 2003). L'omniprésence des oméga-3 dans les études cliniques d'aujourd'hui témoigne de son rôle essentiel sur la santé humaine; que ce soit au niveau des maladies cardiovasculaires (Laidlaw et al., 2014), des maladies inflammatoires (Wall et al., 2010b), du diabète (Bombicino et al., 2016 ; Cadario et al., 2017), dans la lutte contre la dépression (Deacon et al., 2015), pour leurs effets bénéfiques sur les maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer (Devassy et al., 2016), dans le développement des enfants (Parletta et al., 2016), dans la diminution des comportements violents de prisonniers (Meyer et al., 2015) ou encore dans la réduction de la violence conjugale lorsque les enfants sont supplémentés en oméga-3 (Portnoy et al., 2018). De ces fait, les besoins nutritionnels en n-3 des humains sont flagrants et l'approvisionnement passe majoritairement par le secteur piscicole. Cependant, l'optimisation de la quantité en n-3 dans la chair des poissons induit des risques face au stress oxydatif, et les recherches sur l'implication du stress oxydatif dans l'état de santé général des populations d'aquaculture sont rares. Dans ce contexte, le but de cette thèse était d'évaluer l'impact des n-3 sur deux marqueurs de l'intégrité fonctionnelle de l'organisme : la croissance et la résistance au stress. Cette thèse tentait surtout de comprendre le rôle du stress oxydatif dans l'homéostasie des poissons, et ce, en passant de la production des ROS au niveau mitochondrial à la susceptibilité des membranes cellulaires à être oxydées, jusqu'aux dommages qui en résultent au niveau de l'organisme entier.

4.1 Oméga-3, stress oxydatif et croissance

La première étape consistait à évaluer les performances de croissance de nos quatre groupes de salmonidés en fonction de la quantité de n-3 présents dans leur aliment.

La composition en acides gras des aliments était largement reflétée dans la composition de la chair. Ce constat contraste avec des recherches qui prétendent qu'une augmentation en n-3 dans l'aliment ne conduit pas forcément à un dépôt de n-3 accru (Stubhaug et al., 2007 ; Tocher, 2015). Leur explication réside dans le fait que le surplus d'oméga-3 serait plutôt oxydé pour servir à la production d'énergie au niveau de la β -oxydation. De toute évidence, ce n'est pas le cas pour nos quatre groupes expérimentaux, qui ont présenté des quantités de ADH et AEP plus élevées avec le régime WW. Néanmoins, les nettes différences dans la quantité en oméga-3 entre les deux aliments étaient moins visibles au niveau de la chair, un phénomène couramment présent dans les études alimentaire en aquaculture (Tocher, 2003). Il serait intéressant d'inclure des estimations de l'intensité de la β -oxydation ainsi qu'une évaluation du contenu en acides gras des fèces pour déterminer si une partie des n-3 a servi comme ressource énergétique ou n'a pas été absorbée.

Parallèlement au dépôt plus élevé en n-3 chez les poissons nourris avec le régime WW, nous avons pu observer une nette diminution du taux de croissance (SGR) et ceci pour les quatre groupes expérimentaux. Des résultats similaires ont déjà été obtenus dans une étude chez l'AC où une augmentation de la quantité en LC-PUFA dans l'aliment diminuait le taux de croissance (Olsen & Henderson, 1997). Ici aussi, le niveau de TBARS a augmenté avec une alimentation riche en n-3. Une hypothèse que l'on peut suggérer est que la baisse de croissance serait en partie induite par une augmentation des dommages oxydatifs au niveau tissulaire. L'augmentation du contenu en LC-PUFA a probablement rendu les membranes plus susceptibles aux processus oxydatifs en augmentant l'indice de peroxydation (Else, 2017 ; Hulbert et al., 2017). L'augmentation du PI faciliterait l'induction de la peroxydation des lipides et entraînerait la libération de DRO supplémentaire sous forme de peroxyde lipidique (Catalá, 2009, 2010). Ainsi, le niveau de stress oxydatif dépasse potentiellement (de façon chronique ou à des fréquences élevées) les capacités de défense antioxydante de l'organisme résultant en une intensification des dommages oxydatifs au niveau tissulaire, affectant ainsi la santé générale et le potentiel de croissance. Plusieurs études soulignent le rôle potentiel que jouerait le stress oxydatif dans la variabilité interindividuelle au sein de traits tels que la croissance, la reproduction et la survie (Blount et al., 2016 ; Dowling & Simmons, 2009). Il est à noter que dans l'étude de Olsen et Henderson (1997), le contenu en n-3 de l'aliment était

deux fois plus élevé que celui de la WW que nous avons utilisée. Donc, d'après nos résultats, même à des niveaux en n-3 bien plus bas ces derniers semblent affecter l'état physiologique des poissons. Nos résultats remettent en perspectives certaines études démontrant que le taux de n-3 dans la chair est un trait héritable et qui proposent de cibler ce trait par les programmes de sélection afin d'en augmenter le contenu (Gjedrem, 2000 ; Leaver et al., 2011). À la lumière de nos résultats, une telle stratégie devrait nécessairement être accompagnée d'un suivi des dommages oxydatifs ainsi que des marqueurs de l'intégrité fonctionnelle (croissance et résistance au stress) afin d'éviter les impacts négatifs de l'augmentation de la quantité en n-3 sur la santé.

La corrélation positive entre les marqueurs du stress oxydatif et l'activité de la catalase laisse présumer que la catalase joue un rôle essentiel dans la défense contre le stress oxydatif chez ces quatre groupes. Néanmoins, ceci peut aussi signifier que son activité n'est pas suffisante pour amortir l'impact du stress oxydatif. Certaines études proposent que le coût métabolique associé à une augmentation des défenses antioxydantes puisse à lui seul réduire le succès reproductif des organismes (Blount et al., 2016 ; Speakman & Garratt, 2014). Nous pourrions donc émettre l'hypothèse qu'une redirection de l'énergie réservée auparavant à la croissance vers le système de défense antioxydant pourrait être à l'origine d'une diminution du taux de croissance dans la présente étude. Une autre voie à explorer est le lien entre les acides gras, en particulier membranaires, et la gestion des voies de signalisation qui contrôlent la croissance, comme les voies mTOR, MAPK ou IGF (Benedito-Palos et al., 2007 ; Borges et al., 2014). Néanmoins à ce stade il est impossible pour nous de conclure sur l'existence d'un tel lien.

Par ailleurs, nous n'avons pas pu confirmer notre hypothèse qu'une activité accrue des enzymes antioxydants serait corrélée à un taux de déposition de n-3 plus élevé. La prédiction était que l'augmentation de la susceptibilité des n-3 membranaires à l'oxydation serait contrebalancée par un système de défense antioxydant plus efficace. Comme souligné ci-dessus, l'absence de ce lien pourrait s'expliquer en partie par le fait que l'amplification du stress oxydatif dans la présente étude ait atteint un niveau trop élevé pour d'établir des liens entre ces traits physiologiques. Par ailleurs, une multitude d'autres enzymes antioxydants et dont l'activité n'a pas été mesurée dans notre étude pourraient intervenir. Dans l'optique d'explorer l'importance de la capacité antioxydante de manière plus complète, nous devrions essayer dans une

expérience ultérieure d'inclure plus d'enzymes antioxydantes. De plus, une quantification de l'expression génétique de ces dernières serait hautement souhaitable, car plusieurs études démontrent que cette technique donne souvent de meilleurs résultats que les mesures d'activité (Fontagné-Dicharry et al., 2014 ; Fontagné et al., 2008).

En résumé, nous pensons que les tendances à une quantité de TBARS plus élevée dans le traitement WW résultent d'une plus grande susceptibilité à la peroxydation des lipides et d'un système de défense antioxydant endogène insuffisant. Finalement, l'augmentation du stress oxydatif induit par une plus forte concentration de n-3 aurait entraîné la diminution du taux de croissance. Nous pouvons ici constater qu'il existe des limites à partir desquelles une sursaturation en oméga-3 de l'aliment a des conséquences négatives sur l'intégrité fonctionnelle des individus d'une espèce. D'autres études ont démontré qu'une augmentation d'un marqueur de stress oxydatif peut affecter la résistance aux maladies et la qualité nutritionnelle de la chair (Jensen et al., 1998). Il s'agit donc de trouver un juste milieu afin d'avoir une quantité d'oméga-3 assez élevée pour démarquer le poisson ou l'espèce sur le marché de la nutrition humaine, sans pour autant affecter l'état de santé de l'organisme.

Un des points forts de cette étude est que nous avons déterminé tous ces marqueurs (taux de croissance, activité antioxydante, profils d'acides gras et stress oxydatif) pour chaque individu utilisé dans cette étude. À l'inverse, les études antérieures présentent souvent l'évaluation et l'analyse de résultats en comparant des moyennes entre espèces ou traitements. La documentation de la variabilité interindividuelle, naturellement présente dans des populations, a permis d'établir des corrélations solides. Il devient de plus en plus clair que l'étude de cette variabilité nous permet de distinguer de bons et mauvais performeurs et de lier la performance à certains traits. Dans le cas présent, ceci nous a permis de dégager des pistes de réflexion plus concrètes quant aux mécanismes d'action sous-jacents à la diminution du taux de croissance. Nous avons pu établir des corrélations entre le taux de TBARS, la quantité de ADH, la quantité d'oméga-6 totale, le ratio N3/N6 et l'activité de la catalase. La variabilité interindividuelle au niveau de ces cinq marqueurs était assez élevée pour nous permettre d'établir ces corrélations. Plus le contenu en oméga-6 total était élevé, plus les poissons subissaient du stress oxydatif lors des deux traitements. Cette relation allait dans le sens contraire pour le ADH. Ces résultats sont contre-intuitifs, car nous avons vu qu'une augmentation du taux d'oméga-3 était

accompagnée d'une augmentation des TBARS. Les métabolites des oméga-6 sont pour la majeure partie des molécules pro-inflammatoires alors que les métabolites des n-3 sont surtout des molécules anti-inflammatoires. De plus, une augmentation des métabolites des oméga-6 a récemment été associée à une augmentation du stress oxydatif (Byrne, 2010). Des individus avec un taux d'oméga-6 élevé accompagné d'un taux de n-3 faible seront donc plus sensibles au stress oxydatif ou auront une moins bonne capacité de gestion du stress oxydatif avec une santé générale affaiblie. Ces tendances se reflètent dans la relation du ratio N3/N6 avec les TBARS. Plus le ratio d'un individu était élevé, plus son contenu en TBARS était bas. Ici, nous pouvons tracer des parallèles avec la santé humaine. Il est généralement reconnu qu'avoir un ratio N3/N6 élevé chez l'humain diminue nettement les probabilités d'apparition de maladies inflammatoires telles que la plupart des maladies cardiovasculaires, le cancer ou encore l'athérosclérose (Simopoulos, 2008). Cette relation prend son origine du fait que la dégradation des oméga-6 produit des molécules pro-inflammatoires alors que pour les n-3, c'est l'inverse. Au cours des dernières décennies, une alimentation très riche en oméga-6 dans les pays développés a produit un déséquilibre du ratio N3/N6 et favorisé l'apparition de maladies inflammatoires, conduisant à un état de santé généralement en déclin. Ce phénomène semble se refléter chez ces quatre groupes de salmonidés au sein desquels les individus avec un ratio bas démontrent un niveau de stress plus élevé susceptible d'affecter négativement leur santé.

Comme nous l'avons mentionné antérieurement, il est impératif de valider le lien entre les n-3 et le stress oxydatif avec un autre paramètre représentatif de l'intégrité fonctionnelle que la croissance afin de pouvoir conclure à l'existence d'une réelle relation de cause à effet. C'est pour cela que nous avons déterminé la capacité de résistance au stress thermique de ces quatre groupes en fonction du profil d'acides gras et de la production de DRO.

4.2 Production de DRO, profils d'acides gras cardiaques et résistance thermique

À notre connaissance, cette étude est la première à mettre en évidence des différences de performances lors d'un test de tolérance thermique chez l'omble chevalier, l'omble de fontaine ainsi que leurs deux hybrides respectifs (Fig. 2.1). Il est difficile de comparer les valeurs de CT_{max} obtenues pour le BC et l'AC avec ceux disponibles dans la littérature, surtout parce que les protocoles d'exécution du challenge thermique sont très variables. De plus, nous savons que de légères différences dans ce protocole influencent grandement les résultats (Galbreath et

al., 2004), d'où la nécessité de refaire ces tests lorsqu'on veut comparer des groupes. Les résultats ici confirment nos prédictions avec une meilleure performance pour le BC et une réduite pour l'AC, reflétant les différences des gammes de températures auxquels ils sont adaptés. Les différences de performance pourraient être dues à une plus ou moins grande plasticité cardiaque des différentes espèces, c.-à-d. leur capacité de moduler leurs fonctions physiologiques afin de compenser une augmentation de la température. Ce mécanisme a récemment été démontré chez *Lates niloticus* (Nyboer & Chapman, 2018). De plus, dans l'étude de Morgan *et al.*, 2018, les chercheur(e)s proposent l'existence de différentes stratégies pour faire face à une augmentation de la température à l'intérieur d'une même population. Certains individus semblent avoir une grande plasticité physiologique alors que d'autres semblent avoir une tolérance thermique innée plus ou moins élevée. Cela ferait en sorte que d'un test de tolérance thermique à l'autre certains individus vont conserver leur performance alors que d'autres vont exprimer des performances très variables. En partant de ces faits, il serait intéressant dans une prochaine étude de répéter l'expérience du test de tolérance thermique plusieurs fois, d'analyser les résultats en fonction de leur capacité, ou non, de maintenir leurs réponses lors de test successif.

Les résultats concernant les deux groupes d'hybrides sont tout à fait remarquables et n'ont jamais été démontrés dans d'autres études sur les poissons. Ils confirment également une autre étude faite sur des invertébrés marins (*Tigriopus californicus*). Ici, la première génération d'hybrides avec un couple parental venant d'habitats thermiques hautement divergents performait aussi bien voire mieux que les populations parentales (Pereira *et al.*, 2014). Cependant, dans cette étude, les taxons parentaux sont des populations différentes d'une même espèce, les divergences génétiques sont probablement moindres, permettant une meilleure coopération entre génome nucléaire et génome mitochondrial. Nos deux groupes d'hybrides avaient un CT_{max} moyen supérieur à l'AC, démontrant ainsi leurs meilleures capacités d'adaptation à la température. Les recherches suggèrent que les lésions au niveau génétique des espèces vivantes dans les environnements plus nordiques détériorent leur capacité de tolérer des températures élevées (Somero, 2010). Le CT_{max} moyen supérieur des hybrides pourrait provenir des lésions réparées par l'hybridation. Les hybrides ont probablement hérité de gènes leur conférant une tolérance thermique accrue. Il reste cependant à confirmer si cette

impression d'une meilleure gestion de l'homéostasie à température élevée ne cache pas un déséquilibre au niveau de la gestion du stress oxydatif. Une étude sur des copépodes intertidaux (*Tigriopus californicus*) démontre qu'une augmentation du stress oxydatif chez des hybrides de ces animaux serait corrélée à une diminution de la résistance au stress thermique (Barreto & Burton, 2013). Ce qui pourrait expliquer pourquoi ils performant moins bien que les BC.

Par la suite, nous avons pu mettre en évidence une corrélation négative entre la résistance à la température et l'indice de peroxydation des tissus cardiaques (Fig. 2.3 a). Cet indice représente la susceptibilité des membranes cellulaires et mitochondriales au processus d'oxydation. Plus l'indice est élevé, plus les DRO peuvent facilement causer des dommages. Dans notre cas, plus il était élevé, plus le CT_{max} était bas. Il semble donc exister un lien entre la tolérance thermique et la susceptibilité des membranes à se faire oxyder. De plus, il est reconnu que des espèces avec un indice de peroxydation bas sont plus résistantes au stress oxydatif (Munro & Blier, 2012). Nous avons pu corréler la résistance au stress thermique avec un marqueur de stress oxydatif indirect. L'indice de peroxydation est directement corrélé avec le nombre de doubles liaisons dans une membrane et augmente alors avec la quantité d'oméga-3 présents. Ceci explique les relations similaires entre les quantités de n-3 total, le PI et le CT_{max} (Fig. 2.3 b, c). Dans une optique où les oméga-3 ont un effet bénéfique sur la santé et un rôle essentiel dans les fonctions vitales du poisson, ces tendances semblent contre-intuitives. La dégradation des oméga-3 en métabolites bénéfiques pour la santé (comme les resolvines anti-inflammatoires) est un processus hautement régulé par des enzymes très spécifiques tandis que le stress oxydatif est un processus qui relève de la perte de contrôle (Moro et al., 2016 ; Serhan & Petasis, 2011). Puisque les n-3 sont extrêmement sensibles au processus d'oxydation, les conséquences négatives de la dégradation non visée des LC-PUFA pourraient prévaloir contre les effets bénéfiques des métabolites issus de la dégradation contrôlée des n-3. Et ce surtout lorsque la capacité de gérer une surproduction des DRO est dépassée. Des travaux futurs devraient se focaliser sur ces métabolites et leur fonction. Ces données permettraient de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la défaillance cardiaque lors d'une augmentation de la température chez les poissons.

Comme dans l'article précédent, l'intégrité fonctionnelle de l'AC semble plus affecté par une augmentation de la température. L'AC était le groupe avec la valeur de SGR la plus basse.

Curieusement, c'est aussi l'espèce qui avait le CT_{max} le moins élevé dans la présente expérience. C'est le seul groupe qui démontre une augmentation significative au niveau des dommages causés aux lipides dans le traitement WW (Fig. 1.2). Cette espèce semble avoir une moins bonne capacité de gestion du stress oxydatif, une moins bonne croissance et une faible tolérance à une augmentation de la température, induites par un indice de peroxydation plus élevé. D'autres éléments sont en ligne avec ces résultats. Les poissons d'eau froide ont souvent des contenus en LC-PUFA, et surtout n-3, plus élevés (Dunstan et al., 1999 ; Ibarz et al., 2005). Les variations de température dans les environnements nordiques sont beaucoup moins importantes que celles dans les zones plus tempérées. Le contenu en n-3 plus élevé chez l'AC pourrait être associé à son aire de distribution habituelle à des latitudes élevées, donc plus froides. Ainsi, dans un tel environnement, les risques associés à un indice de peroxydation élevé pourraient être moindres puisque la température est moins assujettie à des fluctuations importantes. Cette espèce aurait conservé ce trait dans les populations en aquaculture dans un milieu stressant, avec des conséquences potentiellement néfastes sur leur santé.

Avoir plus d'oméga-3 ainsi qu'un indice de peroxydation au niveau du cœur plus élevé semble donc diminuer la capacité de résister au stress thermique et induire une perte d'homéostasie précoce. Malgré cela, il faut souligner une faille de l'étude. Nous aurions pu comparer les deux traitements, W et WW, par rapport à leur résistance au stress thermique. Dans le cas où les poissons ayant reçu l'aliment WW auraient moins bien performé dans le test de tolérance thermique, nous aurions pu émettre des hypothèses plus soutenues quant à l'impact d'un taux élevé en n-3 sur ce trait. Une autre critique de l'article pourrait être le fait que les tendances que nous observons semblent uniquement induites par les différences entre les groupes. Cependant, le fait d'utiliser deux espèces avec des préférences de température divergentes est la clé de la réussite de cette expérience. Elle augmente grandement la variabilité dans la réponse et nous a mis sur la piste de l'implication des n-3 et du PI dans la résistance au stress. Des expériences supplémentaires s'avèrent néanmoins nécessaires afin de valider si un PI élevé entraîne une augmentation des dommages oxydatifs à haute température.

Les résultats préliminaires d'un étudiant de maîtrise qui a travaillé sur les cœurs de ces mêmes poissons ajoutent du poids à nos résultats et appuient notre interprétation. Ces résultats montrent que les poissons avec une meilleure résistance au stress thermique possèdent une

activité plus élevée d'une enzyme antioxydante (la catalase). Ces individus posséderont alors une meilleure défense endogène contre de possibles dommages oxydatifs induits par un indice de peroxydation plus élevé.

Une étude sur *Sparus aurata* démontre les mêmes tendances, et ce pour plusieurs enzymes antioxydantes notamment la superoxyde dismutase, la glutathion transférase ainsi que la catalase (Madeira et al., 2016). Cette tendance est probablement une des raisons pour lesquelles nous n'avons pas détecté de lien entre la production de DRO des fibres cardiaques et la résistance au stress thermique.

Par contre, nous avons déterminé une corrélation positive entre la masse des individus et la production de DRO (non représentée ici). Autrement dit, les individus à croissance rapide ne sont pas seulement moins tolérants à une augmentation de la température, mais produisent aussi plus de DRO. La capacité du système antioxydant endogène d'éliminer une surproduction de DRO pourrait expliquer l'absence de lien direct entre la production de DRO et le CT_{max} . La mesure des DRO a été réalisée à 25 °C alors que cette température est inférieure au CT_{max} moyen des hybrides et de l'omble de fontaine. Il est possible que le défi ne fût pas assez important pour détecter une augmentation de la production de DRO. En outre, la technique de détection des DRO utilisée ici (microscopie confocale) manque probablement de résolution dans la détection des efflux de DRO. La sonde fluorescente utilisée (CellROX DeepRed) marque en principe tous les DRO présents dans le milieu. Il n'est donc pas possible d'obtenir des informations sur la spécificité de la sonde aux différents espèces de dérivés réactifs de l'oxygène. Finalement, il faut aussi noter l'absence de mesure de marqueur direct du stress oxydatif, ce qui a pu nous cacher des corrélations intéressantes. Alors, une quantification plus précise afin d'établir des liens de causalité avec des niveaux supérieurs d'intégration, qu'on ne peut observer chez des fibres isolées et perméabilisées, est nécessaire. Le troisième chapitre essaie donc d'évaluer si la production de DRO augmente réellement à température élevée.

4.3 L'homéostasie du stress oxydatif mitochondrial

Le troisième chapitre présenté dans cette thèse de doctorat contribue à l'avancement de la recherche dans le domaine de la thermosensibilité mitochondriale et des mécanismes sous-jacents à la défaillance cardiaque lors d'un stress thermique chez les poissons. D'après nos

connaissances, cette étude est la première mettant en évidence une augmentation accrue de la production des espèces réactives de l'oxygène ainsi qu'un plafonnement de la respiration mitochondriale maximale. Surtout, ce dérèglement mitochondrial survient entre 20 et 25 °C, ce qui est dans la gamme des températures auxquelles le poisson atteint sa limite maximale (Fig. 3.2). La respiration mitochondriale et la production de DRO ont été mesurées pendant le stade OXPHOS supplémenté en substrats des complexes I et II et en ADP, ce qui s'approche le plus des conditions physiologiques réelles. Nous avons choisi ici de travailler seulement sur une espèce, en raison de la lourdeur des manipulations qui sont nécessaires pour faire ce genre d'analyse. L'AC était l'espèce candidate avec la plus grande probabilité de fournir les résultats qui pourraient confirmer nos hypothèses. D'une part, parce qu'elle performe le moins bien dans le challenge thermique. D'autre part, car son taux très élevé de l'index de peroxydation et sa corrélation avec sa performance dans le challenge thermique en font l'espèce la plus susceptible aux dommages oxydatifs. Nous avons porté une attention particulière au protocole utilisé pour l'augmentation graduelle de la température pendant le test de tolérance thermique. Afin de ne pas introduire de biais dans la comparaison des deux tests, nous avons effectué exactement le même protocole que dans le chapitre précédent.

Une des failles majeures de la plupart des études qui s'adressent la thermosensibilité mitochondriale en lien avec celle de l'individu entier est la suivante. Souvent, la respiration mitochondriale et/ou la production de DRO est mesurée en présence de substrats du complexe I seulement, du complexe II seulement, ou en présence de certains inhibiteurs spécifiques du complexe I, II, III ou V, ce qui est loin des conditions physiologiques réelles (Jarmuszkiewicz et al., 2015 ; Zukiene et al., 2010). Bien que ces techniques soient encore valables afin de diagnostiquer des déficiences spécifiques de l'ETS (Lemieux et al., 2017a), elles ne permettent pas de mesurer la capacité mitochondriale maximale et la production de DRO en conditions physiologiquement pertinente. Il est donc difficile de corréler ces stades respiratoires spécifiques avec des niveaux d'intégration supérieurs, car ils sont très éloignés des conditions physiologiques réelles. Nous pensons que cette faille représente une des raisons principales expliquant la fréquente remise en question du lien fonctionnel entre mitochondries, production de DRO et tolérance thermique de l'animal.

Le plafonnement de la respiration mitochondriale entre 20 et 25 °C indique que la capacité maximale est atteinte, ce qui entraîne une limitation dans la capacité de fournir l'ATP alors que le besoin en ce dernier augmente en raison de l'augmentation de la température (Hochachka & Somero, 1968). La production de DRO augmente de façon drastique à 25 °C, ce qui semble être la température maximale tolérée par cette espèce. Alors qu'aux températures inférieures, le taux de production demeure stable. Ceci est soit dû à une bonne défense antioxydante à l'intérieur de la mitochondrie ou tout simplement que la production de DRO n'a pas augmenté à ces températures. Même si cette surproduction de DRO pouvait possiblement être éliminée par les antioxydants cellulaires *in vivo*, il reste que l'organisme doit mobiliser ces antioxydants, un processus coûteux en énergie. Donc, nous pouvons voir ici qu'à haute température, une atteinte de l'intégrité fonctionnelle de la mitochondrie est corrélée à une augmentation massive du stress oxydatif et apparaît en même temps que la perte d'homéostasie de l'organisme entier.

Concernant l'origine de l'élévation de la production de DRO, plusieurs raisons peuvent entrer en cause. Premièrement, l'augmentation de l'activité du complexe I alors que le métabolisme maximal stagne (Fig. 3.5) pourrait être une des raisons. Même si la mitochondrie ne semble pas consommer davantage d'oxygène entre 20 et 25 °C (car la respiration plafonne) les électrons peuvent continuer à entrer dans l'ETS par l'intermédiaire d'équivalents réduits au niveau du complexe I. Une accumulation d'électrons à l'intérieur de l'ETS, sans réduire l'oxygène en eau, augmente les probabilités de production de DRO (Quinlan et al., 2013). Deuxièmement, des résultats concernant l'activité de la citrate synthase semblent aller en ce sens. La citrate synthase est une enzyme du cycle de Krebs qui catalyse la condensation de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate en citrate. Le citrate ainsi généré peut alors être intégré au cycle de Krebs et participer à la génération d'équivalents réduits. Si l'activité de la citrate synthase augmente, la quantité d'équivalents réduits va faire de même. Dans notre cas (résultats non présentés dans les trois articles), son activité augmentait de manière significative à 25 °C et elle provoquait probablement la génération de NADH et FADH₂ supplémentaires. Cet apport complémentaire en électrons au niveau du CI et du CII devrait contribuer à l'accumulation d'électrons dans l'ETS et ainsi à l'augmentation de la génération de DRO. Malheureusement, dans le cas de la présente étude, nous n'avons pas quantifié les dommages oxydatifs. Nous ne pouvons alors pas conclure avec plus de certitudes si la surproduction de DRO a réellement

des conséquences sur l'intégrité fonctionnelle des mitochondries. Théoriquement, il est possible que les DRO aient induit un stress oxydatif aux lipides membranaires mitochondriaux, affectant ainsi le fonctionnement mitochondrial et participant au plafonnement de la respiration; d'autant plus que de nombreuses études démontrent qu'une augmentation de la température du milieu induit le stress oxydatif (Cheng et al., 2018 ; Lushchak, 2011 ; Lushchak & Bagnyukova, 2006 ; Madeira et al., 2018 ; Madeira et al., 2016 ; Vinagre et al., 2012).

Toutefois, une autre partie des résultats de cette étude renforce le possible lien entre l'augmentation de DRO et l'atteinte de l'intégrité fonctionnelle de mitochondries. En prenant en compte la variabilité interindividuelle à l'intérieur de chaque température testée, cette étude est la première à établir une corrélation linéaire entre l'intensité de la production de DRO et le taux de respiration maximal au niveau individuel. C'est-à-dire qu'à une température donnée, des individus avec un taux de respiration élevé produisent moins de DRO. Leurs mitochondries semblent mieux fonctionner avec moins d'électrons résiduels dans l'ETS et possédant donc une moindre susceptibilité de produire des DRO. Nous proposons que ces individus seraient avantagés en condition d'augmentation de la température aiguë, car ils pourraient probablement fournir de l'ATP plus longtemps que leurs congénères moins performants. Le plafonnement des fonctions cardiaques serait donc atteint plus tardivement. Ce lien persiste à 10, 15 et 25 °C, mais se dissipe par la suite. À ce stade, la quantité de DRO produite est probablement supérieure à la capacité de gestion des mitochondries cardiaques de cette espèce. Ce constat nous a mené à formuler l'hypothèse selon laquelle que les individus avec un CT_{max} plus bas auraient une production de DRO plus importante. Nous supposons, comme mis en évidence dans l'article deux, que ces individus auraient aussi un indice de peroxydation plus élevé et seraient alors plus susceptibles aux dommages induits par les DRO, ce qui pourrait mener à la perte de l'intégrité fonctionnelle de la mitochondrie. Les dommages que pourraient subir les membranes mitochondriales et cellulaires riches en n-3 s'exprimeraient par la peroxydation des lipides dont les produits finaux sont impliqués dans l'apoptose (Gaschler & Stockwell, 2017). La mort cellulaire ainsi induite pourrait causer l'arrêt cardiaque et la mort de l'animal. À ce stade-ci, nous ne pouvons pas conclure avec certitude que l'augmentation de DRO à 25 °C est directement corrélée avec le CT_{max} de cette espèce.

En conclusion, nous pensons que le plafonnement de la respiration mitochondrial accompagné d'afflux important en DRO à 25 °C pourrait causer une diminution de la capacité de fournir de l'ATP et ultimement conduire à l'arrêt cardiaque et la mort du poisson. Ceci soulèverait encore une fois le rôle central que joue le cœur dans la résistance au stress thermique et la limitation de son activité maximale par le métabolisme énergétique et la gestion de l'homéostasie des DRO des mitochondries.

4.4 Conclusion

Le but de cette étude consistait à examiner les conséquences de la haute teneur en n-3 sur la santé des poissons en aquaculture. Elle visait notamment à établir le stress oxydatif comme point central de la gestion de l'homéostasie cellulaire, de l'homéostasie tissulaire et de l'organisme entier.

Nous avons pu corrélérer un contenu élevé en n-3 dans la chair des poissons à une nette diminution de leur croissance et une tendance à l'augmentation des marqueurs du stress oxydatif. Il paraissait clair que les défenses antioxydantes endogènes étaient insuffisantes afin de prévenir l'occurrence du stress oxydatif, et que même avec une concentration de n-3 standard dans l'alimentation, ces défenses semblaient déjà à leur limite. Une approche pour remédier à cela serait d'inclure des antioxydants exogènes dans l'aliment. L'efficacité de ces antioxydants est cependant très variable, et peu d'études corréleront l'activité antioxydante à l'intégrité fonctionnelle des individus. De plus, l'intégrité fonctionnelle de l'organisme soumis à un stress (la température) était mise en péril plus rapidement chez des individus avec une concentration de n-3 et un indice de peroxydation dans les tissus cardiaques plus élevés. Les corrélations entre la résistance à la température et le contenu en oméga-3, l'indice de peroxydation et l'AEP ont été établies chez des poissons nourris avec un aliment de type commercial. Donc, de manière générale, le niveau de n-3 des poissons en aquaculture semble déjà assez élevé pour diminuer la capacité de ces poissons à résister au stress. En outre, nous avons pu tester l'hypothèse selon laquelle la perte d'homéostasie pendant un test de stress thermique serait causée par une augmentation de la production de DRO au niveau des mitochondries cardiaques, se soldant ultimement par l'arrêt du cœur.

Les résultats de cette thèse démontrent que même avec la quantité de n-3 que contiennent les aliments actuellement utilisés en aquaculture, les poissons risquent de subir des dommages oxydatifs qui détériorent leur état de santé général, ce qui se manifeste par une diminution de la croissance et une diminution de la tolérance au stress thermique. L'application d'un stress augmente la production de DRO au niveau mitochondrial, amplifiant encore une fois les

probabilités de causer des dommages oxydatifs qui mettent en péril l'homéostasie des poissons. Ceci est d'autant plus alarmant que les populations de poissons en aquaculture semblent être dans un mauvais état de santé général (Assefa, 2018). Les poissons sont extrêmement sensibles aux stress qu'implique leur manutention habituelle (Brijs et al., 2018), ils sont de moins en moins résistants aux maladies infectieuses, et les taux de mortalité spontanée ne cessent d'augmenter. D'après nos résultats, la grande susceptibilité au stress oxydatif de ces poissons riches en n-3, peut contribuer davantage à la détérioration de leur état de santé, entre autres parce que l'induction du stress oxydatif semble être plus élevée chez des individus et groupes moins tolérants au stress thermique.

À notre avis, le test de tolérance thermique pourrait être utilisé comme outil de sélection dans le secteur de l'aquaculture. La résistance au stress thermique est un bon marqueur de la santé générale des poissons. Cette proposition est appuyée par les résultats concernant le lien entre la susceptibilité au stress oxydatif, la quantité de n-3 dans le tissu cardiaque et la performance dans le challenge thermique présenté dans le chapitre 3. Elle est également appuyée par les corrélations observées dans le chapitre 4 expliquant que les individus avec un faible taux de respiration mitochondriale produisent plus de DRO, sont plus susceptibles de subir des dommages oxydatifs et performant donc moins bien lors d'un test de tolérance thermique. Ces deux études dégagent une tendance claire : plus un individu est susceptible aux dommages oxydatifs, moins il tolère une augmentation de la température. Les taux élevés en n-3 des poissons en aquaculture et leur participation dans l'augmentation de la susceptibilité au stress oxydatif amplifient davantage les possibles conséquences négatives sur la santé des poissons (Abele & Puntarulo, 2004 ; Lesser, 2006). La grande variabilité de la réponse dans chacun des trois articles discutés ci-dessus prouve qu'il y a manifestement des individus avec une meilleure capacité de gestion du stress oxydatif, et nos résultats portent à penser que ce seraient ces individus qui tolèrent le mieux une augmentation de la température. Un test de tolérance thermique pourrait alors servir à sélectionner les individus avec une bonne gestion du stress oxydatif et plus résistants aux stress en général, moins prédisposés aux maladies infectieuses et avec une santé globale supérieure. Ces individus devraient alors constituer la base génétique pour reconstruire un stock de géniteurs plus en santé afin de remédier au déclin de cette dernière dans le secteur piscicole. Ceci pourrait même être valable si on envisage d'augmenter la

quantité en n-3 dans l'aliment. Les tests de tolérance thermique permettraient de limiter les dégâts en sélectionnant ceux pour lesquels l'effet négatif des n-3 se manifeste le moins. De plus, ce test est facile à mettre en œuvre à grande échelle et sur un grand nombre de poissons et implique un taux de mortalité pratiquement nul (Claireaux et al., 2013). Il est clair qu'une telle stratégie sélectionnera probablement des poissons avec un taux de croissance moindre, car ces derniers sont plus résistants au stress thermique, comme démontré dans cette étude ainsi que dans la littérature (Morita et al., 2010 ; Norin et al., 2017 ; Roze et al., 2013). Partant de ce fait, la productivité de l'entreprise serait mise en péril pendant un certain laps de temps. Par contre, les retombées à long terme d'une population en bonne santé générale sont non négligeables pour assurer une durabilité de l'industrie, et ce, au-delà de l'horizon des 20 prochaines années.

Dans l'ensemble, cette thèse est un premier pas dans la compréhension des conséquences du taux élevé en n-3 sur la santé des poissons en aquaculture. Il devient impératif d'approfondir nos connaissances de l'impact du stress oxydatif sur l'homéostasie des poissons et d'inclure ses marqueurs dans la gestion des stocks en aquaculture. Ultiment, cela assurera une pérennité de l'industrie aquacole en proposant un produit avec une bonne qualité nutritionnelle sans autant affecter l'état de santé général des poissons. Ainsi, nous pourrions créer une base solide et durable de l'approvisionnement en n-3 des humains, sans lesquels notre espèce serait probablement encore en train de vivre dans des cavernes.

4.5 Perspectives

4.5.1 Mitochondrie et CT_{max}

Considérant le rôle primordial que jouent le métabolisme énergétique et la production de DRO au niveau mitochondrial, des études supplémentaires sont nécessaires pour tester l'hypothèse de la limitation de l'étendue de température tolérable par l'exacerbation de la production de DRO. Une approche intéressante serait d'établir une corrélation entre différents aspects supposément impliqués dans la perte d'intégrité fonctionnelle des mitochondries à haute température. Un test de tolérance thermique au niveau individuel devrait donc être corrélé aux caractères métaboliques suspectés d'intervenir dans l'établissement du seuil de tolérance. Pour ce faire, afin de garder une traçabilité des individus, les poissons expérimentaux devront être individuellement identifiés avec des *PIT tags* sous-cutanés. Ainsi, nous pourrions établir un lien direct entre CT_{max} et les marqueurs souhaités. Considérant l'effet prépondérant de la masse sur la performance dans le test de tolérance thermique, il serait important de réaliser une nouvelle expérience avec un cheptel de poissons affichant peu de variations de la masse individuelle. Ce choix aiderait probablement à trouver des liens significatifs entre les différents paramètres.

Pour mesurer l'impact de la température sur le métabolisme mitochondrial, il serait préférable de continuer à travailler sur des mitochondries cardiaques isolées et non sur des fibres perméabilisées. Dans un modèle où les mitochondries se trouvent encore dans leur milieu naturel, il est difficile de conclure sur la réelle quantité produite de DRO et son implication dans la défaillance cardiaque. La présence d'antioxydants cellulaires masquerait probablement un lien significatif entre la production de DRO et le CT_{max} .

Néanmoins, déterminer le CT_{max} , extraire les mitochondries et mesurer leur activité ou production de DRO présente un désavantage important. Les mitochondries ne se retrouveront pas dans les mêmes conditions *in vitro* qu'*in vivo*. Une des problématiques de l'approche expérimentale des mitochondries isolées est qu'elle impose que les mitochondries soient en

présence d'une saturation en oxygène du milieu de 100%. Au niveau cellulaire, la concentration en oxygène semble très hétérogène et variable d'une zone à l'autre (Kurokawa et al., 2015). Dans les conditions physiologiques réelles, les concentrations en oxygène au niveau tissulaire et cellulaire varient entre 1 et 50 % de saturation (Jones, 1985). Ainsi dans nos conditions expérimentales, les mitochondries sont dans un environnement hyperoxique. Plusieurs études démontrent que l'hyperoxie induit une augmentation de la production des DRO au niveau mitochondrial (Brueckl et al., 2006 ; Li et al., 2004 ; Turrens et al., 1982), ainsi qu'une atteinte de l'intégrité des mitochondries cardiaques chez le rat (Angelos et al., 2011). Il se pourrait donc que la mesure de production de DRO dans notre expérience soit influencée par ce biais. En revanche, l'isolation des mitochondries reste à ce jour la seule méthode qui permet d'évaluer la vitesse de production ou de consommation des DROs par la quantification du peroxyde d'hydrogène (Munro & Treberg, 2017). Afin de quantifier la production des DROs et la respiration mitochondriales à des concentrations en oxygène proches des conditions *in vivo*, de nouvelles avenues méthodologiques devront être proposées.

Une autre faille de l'approche expérimentale utilisé dans le chapitre quatre, est que les mitochondries ne seront pas exposées à une augmentation de la température graduelle, mais elles seront plutôt exposées rapidement à des températures près de la limite maximale de l'organisme en question. Il est clair que ce processus peut avoir comme conséquence que les réponses au niveau mitochondrial soient faussées ou encore bien supérieures à ce qui se passe *in vivo*.

Voilà pourquoi nous proposons une nouvelle approche, plus représentative des conditions *in vivo*. Les mitochondries isolées d'un cœur de poisson préalablement soumis à un test de résistance thermique seraient incubées dans un respiromètre à haute résolution (Oxygraph 2K, Oroboros Instruments Innsbruck, Autriche) à la température d'acclimatation de l'animal. La respiration serait mesurée en stade OXPHOS (donc pendant une production active d'ATP) en présence de tous les substrats nécessaires (pyruvate, malate glutamate, succinate, ADP) au fonctionnement maximal de la mitochondrie, en concentration saturante. De l'hexokinase et du glucose seraient également ajoutés au milieu. L'hexokinase est une enzyme qui catalyse la phosphorylation du glucose par l'ATP pour former de l'ADP et du glucose-6-phosphate. Ainsi, l'ADP consommée est régénérée continuellement, et de ce fait, ne pourrait être limitante. Selon

une recherche, cet ajout est reconnu pour ne pas affecter la respiration mitochondriale (Blier and Guderley, 1993). Par la suite, la température du respiromètre serait augmentée en suivant le même protocole qu'auront subi les poissons pendant la détermination du CT_{max} . De cette manière, il serait possible de détecter exactement à quelle température la respiration mitochondriale plafonne ou diminue, indiquant un arrêt de l'augmentation de la production d'ATP.

En parallèle, des mesures de la production de DRO et un marqueur de l'ouverture des membranes devraient être définis. Afin d'être capables d'établir un lien entre ces deux paramètres et la respiration mitochondriale, des conditions expérimentales identiques devraient être utilisées pour les quantifier. Les respiromètres à haute résolution se prêtent parfaitement à cela puisque ces derniers disposent d'une deuxième chambre respiratoire identique qui subirait les mêmes changements de température. Cette chambre servirait de réserve, dans laquelle il serait possible de prélever des mitochondries tout au long de l'expérience, quantifier les DRO et le marqueur de l'ouverture des membranes mitochondriales externes.

La quantification de ces deux marqueurs pourrait se faire par cytométrie en flux. Cette technique permet de passer des cellules ou mitochondries dans le faisceau d'un laser en les comptant et en mesurant la lumière émise en présence de sondes fluorescentes spécifiques. Les deux sondes proposées sont le *MitoSox DeepRed* et le *MitoProbe Transition pore assay kit* de *ThermoFisher scientific*. Développés pour des modèles cellulaires, ces genres de sondes ont été récemment mis au point pour l'utilisation avec des mitochondries isolées (Mattiasson, 2004 ; Medina et al., 2002). *MitoSox DeepRed* est un marqueur spécifique de l'anion superoxyde, le radical libre principalement produit au niveau mitochondrial. En marquant seulement une espèce réactive de l'oxygène, le manque de spécificité de la sonde utilisée dans le chapitre 3 (*CellRoxDeepRed*) pourrait être contourné. Le *MitoProbe Transition pore assay kit* permet de détecter l'ouverture des membranes mitochondriales traduisant une perte de l'intégrité. Normalement, cette donnée est utilisée comme premier signe de l'induction de la mort cellulaire (apoptose). Techniquement, lors de l'application de cette méthode, les mitochondries sont chargées avec l'ester acétoxyméthyle de la calcéine, une molécule fluorescente. L'ouverture des pores mitochondriaux cause la libération de la calcéine dont la fluorescence est captée par le $CoCl_2$ (chlorure de cobalt) présent dans le milieu de respiration.

Selon notre hypothèse, à des températures près du CT_{max} , la fluorescence liée au DRO s'intensifierait, et celle liée à la calcéine diminuerait. Dès lors, ceci indiquerait une ouverture des pores mitochondriaux, entraînant une perte de fonctionnalité mitochondriale. Il faut cependant noter qu'il existe des controverses quant à l'utilisation de ces sondes pour la détection de DRO, car il semble qu'aucune sonde (dont MitoSoxRed) n'est complètement sélective (Grisham, 2013 ; Kalyanaraman et al., 2012).

Finalement, un prélèvement devrait être réalisé dans les chambres respiratoires au début du plafonnement et de la diminution de l'activité des mitochondries. Cet échantillon pourrait servir pour déterminer plusieurs marqueurs de stress oxydatif afin de savoir si ce dernier augmente à des températures extrêmes. Cela nous paraît important puisqu'une simple augmentation de la production de DRO n'indique pas forcément une augmentation des dommages oxydatifs. Il existe maintenant des méthodes extrêmement précises pour quantifier une multitude de marqueurs de stress oxydatif par chromatographie en phase gazeuse (Hudson et al., 2011 ; Ye et al., 2011 ; Zelzer et al., 2013), notamment les produits de la peroxydation de lipides comme les HNE, HHE et LPO. D'ailleurs il a récemment été démontré qu'une augmentation de la température entraîne une augmentation du taux de LPO mesuré, donc plus de dommages oxydatifs (Madeira et al., 2016).

Il serait pertinent d'appliquer ce modèle sur d'autres tissus que le cœur. Le cerveau semble être un candidat intéressant; non seulement pour son rôle comme principal organe du système nerveux, mais aussi pour son métabolisme mitochondrial qui semble être impliqué dans la capacité d'adaptation des poissons aux changements de température (Chung et al., 2017). D'ailleurs la perte d'équilibre des poissons à température élevée laisse présumer une implication du système nerveux centrale et du cerveau. Car nous savons que chez les vertébrés en général, ces deux organes sont responsables de la coordination de la locomotion. Par contre, des résultats préliminaires réalisés dans notre laboratoire, attribuent aux mitochondries cérébrales de l'omble chevalier une tolérance au stress thermique supérieure à celles du cœur, et ce, au-delà du CT_{max} .

Étant donné les corrélations établies entre certains acides gras et la résistance à la température, il serait pertinent de déterminer le profil en acides gras de chacun des cœurs et des isolats

mitochondriaux. De plus, il faudrait utiliser des techniques qui permettent d'établir des profils lipidiques plus détaillés afin de quantifier la cardiolipine et ses dérivés (Bowden et al., 2014). La cardiolipine est un phospholipide qui se retrouve essentiellement au niveau de la membrane mitochondriale interne. Elle est nécessaire au bon fonctionnement de plusieurs enzymes et du métabolisme énergétique mitochondrial (Paradies et al., 2014) et semble jouer un rôle dans la capacité des poissons à s'adapter aux changements de température (Chung et al., 2018 ; Kraffe et al., 2007). De plus, la susceptibilité à l'apoptose des cellules augmente avec l'oxydation des cardiolipines (Orrenius & Zhivotovsky, 2005). Cette dernière s'amplifie en fonction de la quantité de doubles liaisons présentes dans la membrane pour lesquelles l'indice de peroxydation est un bon indicateur. Les résultats présentés dans cette thèse montrent une corrélation négative entre la résistance à la température et l'indice de peroxydation. Il est donc possible que l'oxydation des cardiolipines augmente également, menant à une augmentation du nombre de cellules en apoptose, ce qui pourrait être à l'origine de la défaillance cardiaque. Pour établir ce lien, il faudrait quantifier les cardiolipines oxydées dans les isolats mitochondriaux des poissons ayant subi un test de CT_{max} et voir s'il existe une corrélation.

4.6.2 Métabolites des acides gras

Dans le chapitre deux, nous avons souligné des possibles liens entre la quantité d'acides gras spécifiques (AEP, ARA, ADH) et la résistance et à l'augmentation de la température. Comme mentionné plus tôt dans la discussion, les métabolites des acides gras ont des rôles très variés et peuvent être bénéfiques ou non pour la santé (Serhan and Petasis, 2011). Par exemple, une étude récente a mis en évidence un lien de causalité entre des métabolites de l'acide arachidonique (ARA) et l'arrêt cardiaque chez l'humain (Moon et al., 2017). Plus précisément, il existe deux phospholipases qui dégradent l'ARA soit en acide hydroxyeicosatétraénoïque (HETE), une molécule très toxique, ou en acide époxyeicosatriénoïque (EET), une molécule protectrice. Dans les cœurs en début d'arrêt cardiaque, l'activité de la phospholipase qui catalyse la dégradation d'ARA en HETE augmente, alors que l'activité de celle responsable de l'apparition des EET diminue. Ce déséquilibre tend vers la production de molécules toxiques et serait à l'origine de l'ouverture des pores membranaires mitochondriaux induisant l'apoptose et ultimement l'arrêt cardiaque. Pour déterminer les bases moléculaires de la défaillance cardiaque chez les poissons, il serait intéressant de déterminer la quantité des deux métabolites

de l'ARA à des températures près du CT_{max} . De façon générale, nous pensons qu'il serait pertinent de s'inspirer d'études faites sur les humains et d'appliquer les techniques utilisées sur les poissons. La recherche sur les maladies du cœur est grandement financée et il existe de nombreuses hypothèses sur les liens de causalité entre l'arrêt cardiaque et les mécanismes moléculaires sous-jacents.

4.6.3 Gestion du stress oxydatif comme indicateur de la santé des animaux

Les trois études présentées ici suggèrent un lien entre les marqueurs du stress oxydatif et deux paramètres de la santé, soit la résistance à la température et la croissance. Ils semblent donc être des marqueurs intéressants pour l'évaluation de l'état de santé de populations dans leur milieu naturel (Beaulieu & Costantini, 2014 ; Blier, 2014). Que ce soit à la suite d'une exposition à un polluant, un changement dans l'aire de distribution, une vague de température plus élevée que la normale ou encore un événement hypoxique, ces marqueurs semblent souvent répondre.

Néanmoins, leur utilisation est loin d'avoir été optimisée. Le fait que la quantification des marqueurs du stress oxydatif puisse être réalisée sur des tissus congelés élargit énormément son champ d'application. Les nombreuses études d'évaluation des stocks d'organismes marins pourraient permettre de garder systématiquement des échantillons d'espèces d'intérêt en les congelant, pour ensuite quantifier certains marqueurs du stress oxydatif. L'accès à la « ressource » étant déjà assurée, ajouter de telles analyses en laboratoire serait utile pour faire le suivi de l'état de santé des populations en milieu naturel.

En raison des nombreuses corrélations avec la résistance à la température que nous avons pu mettre en évidence dans cette thèse, le test de tolérance thermique semble être une bonne approche pour calibrer les marqueurs du stress oxydatif et faire un tri afin de déterminer ceux qui semblent répondre le mieux. Il est clair que ces marqueurs réagiront probablement très différemment en fonction du stress auquel un organisme fait face. Mais les effets négatifs de la température sur les organismes aquatiques et l'augmentation rapide de la température globale due aux changements climatiques attribuent à la résistance thermique un rôle primordial dans la détermination de la survie des individus. Cependant, il s'avère nécessaire de valider les liens

établis dans la présente thèse de doctorat sur d'autres espèces avant d'en faire un concept universel.

4.6.4 Mitochondries cardiaques et sélection

Avec une augmentation de la fréquence des vagues de chaleur et de la température globale sur la planète (Luber & McGeehin, 2008), il est clair que la pression sélective induite par ces changements environnementaux va être de plus en plus forte. Dans cette thèse j'é mets l'hypothèse que la thermosensibilité mitochondriale, la gestion du stress oxydatif ainsi que la robustesse des membranes au niveau cardiaque jouent un rôle primordial dans la détermination du seuil de tolérance thermique supérieur chez les ectothermes. Si c'est le cas, il va y avoir une forte pression de sélection sur ces traits et l'étude de la variabilité et de l'héritabilité de ces derniers va nous informer davantage sur le potentiel d'adaptation de ces organismes. Il faut tout d'abord identifier les gènes clés associés à ces traits. En ce qui a trait à la modulation de la composition lipidique des membranes, les gènes codants pour les enzymes delta-5 et delta-6 désaturase sont une cible intéressante. Ces derniers sont responsables de l'ajout de doubles liaisons dans les chaînes de carbone des acides gras (Los & Murata, 1998). Chez l'humain ces enzymes sont reconnus d'influencer le taux de LC-PUFA membranaire et un dérèglement de leurs niveaux d'expression sont associés à de nombreuses pathologies tels le diabète de type 2, l'inflammation ainsi que le cancer (Tosi et al., 2014). Par ailleurs, un changement de leur activité ainsi que de leur niveau d'expression est associé à des réponses d'acclimatation à différentes températures chez certains végétaux et bactéries (Murata & Wadat, 1995 ; Upchurch, 2008). Une autre étude démontre que les gènes impliqués dans la composition lipidique membranaire ont été une cible importante de la sélection naturelle chez les espèces mammifères longévives (Jobson et al., 2010). Dans la même étude, les auteurs sont incapables d'établir un lien entre la longévité et l'expression des enzymes antioxydants (superoxide dismutase et catalase). Alors que ces derniers sont reconnus de ralentir les processus du vieillissement en atténuant l'accumulation de dommages oxydatifs induite par les DRO (Liguori et al., 2018).

A l'opposé de ce qui précède, chez les poissons, l'expression des gènes associés aux enzymes antioxydants s'est révélée être un bon marqueur de la résistance au dommages oxydatifs (Fontagné et al., 2008). De plus, l'importance des enzymes antioxydants en tant que

déterminant de la résistance au stress thermique est supportée par notre étude qui révèle une corrélation positive entre l'activité de la catalase au niveau cardiaque et la tolérance à une hausse de température. Hulbert et al., 2007 ont proposé un mécanisme expliquant ces corrélations inverses entre les enzymes antioxydants et deux processus physiologiques affectés par une surproduction de DRO tels le vieillissement et la résistance au stress thermique. D'après eux, le système de défense d'enzymes antioxydants est optimisé pour les conditions *in vivo* des organismes, c.-à-d. il peut contrer de légères augmentations de la production de DRO. Mais il ne peut offrir la protection supplémentaire nécessaire pour contrer les dommages cumulatifs du stress oxydatif qui induisent le vieillissement cellulaire. Donc, ces enzymes joueraient plutôt un rôle dans les capacités d'acclimatation des organismes au lieu de représenter une cible de la sélection naturelle. Cependant, il existe des gènes associés aux performances cardiaques et la résistance au stress thermique, qui semblent subir une forte sélection naturelle.

Une étude de Chen et al., 2018 démontre qu'en réponse à un stress thermique aiguë, des populations de *Oncorhynchus mykiss gairdneri* provenant d'habitats thermiques distincts, n'expriment pas de la même manière les gènes associés aux performances cardiaques. Le CT_{max} des populations qui vivent à température plus élevée est nettement plus élevé que celui des populations vivantes dans un climat plus tempéré. Les niveaux d'expression des gènes associés au métabolisme énergétique et à la gestion du stress divergent entre ces populations. De plus, l'intégration des marqueurs qui y ont été associés dans un modèle multivarié a permis à ces auteur(e)s de modéliser et de prédire le CT_{max} des différentes populations. Cette étude démontre la pertinence et l'utilité des marqueurs génétiques et métaboliques dans l'étude de la capacité d'adaptation face aux changements climatiques et dans l'identification des cibles de la sélection naturelle, des organismes ectothermes. Bien que ces marqueurs aient révélé des liens corrélatifs avec les seuils de tolérance au stress, ces corrélations doivent être appuyées par l'identification des mécanismes qui assurent une réponse adéquate au stress thermique. Avant de proposer des bases mécanistiques, il semble approprié d'explorer plusieurs voies métaboliques et de signalisation qui pourraient avoir une fonction de régulation dans la réponse au stress et le maintien de l'homéostasie. Avec les résultats du chapitre 3, il est clair que plusieurs de ces voies se trouvent probablement au niveau mitochondrial.

Si l'on considère que parmi les éléments clés de la tolérance à l'augmentation de la température sont la gestion de la production des ROS et la robustesse des membranes mitochondriales, on doit intégrer à nos études la gestion du métabolisme énergétique mitochondrial. Dans ce cas particulier, la sélection semble agir à la fois sur les génomes mitochondriaux et nucléaires et plus spécifiquement sur les interactions entre ces génomes. Le potentiel adaptatif du métabolisme mitochondrial d'une population ou d'une espèce dépendra ainsi de la disponibilité des différents haplotypes mitochondriaux, de la variabilité des gènes nucléaires impliqués dans le métabolisme aérobie et finalement, du bénéfice phénotypique potentiel associé à de nouvelles interactions entre ces génomes. Une étude récente met en évidence que des interactions mitonucléaires spécifiques sont ciblées par la sélection naturelle et affectent le fonctionnement mitochondrial cardiaque chez une espèce de fondules (*Fondulus heteroclitus* ; Baris et al., 2017). De plus, cette étude démontre que la température du milieu affecte les interactions mitonucléaires. Ces interactions semblent donc un élément important de la réponse adaptative des populations naturelles face à des variations de paramètres environnementaux tel que la température (Baris et al., 2016).

Dans ce contexte l'hybridation peut s'avérer un outil puissant pour étudier les contraintes métaboliques de l'adaptation à des températures élevées. Notamment parce que l'hybridation peut introduire un génome mitochondrial dans un nouvel environnement nucléaire et ainsi, « rebrasser » les interactions mitonucléaires (Barreto et al., 2015) et aider à documenter l'impact des pertes de fonctionnalités induites sur la tolérance au stress. Chez les copépodes les incompatibilités entre génomes mitochondriaux et nucléaires ont été associées à une réduction du fitness induite par une augmentation du stress oxydatif (Barreto & Burton, 2013) ainsi qu'à une diminution de la survie possiblement induite par une diminution de l'efficacité mitochondriale (Ellison & Burton, 2008). Il serait donc pertinent de conduire des études supplémentaires avec les hybrides mentionnés dans ce document. Par exemple, nous pourrions les acclimater à différentes températures proches de leur limite thermique supérieure et évaluer la respiration mitochondriale et la production de DRO. De plus nous pourrions utiliser des marqueurs SNP (single nucleotide polymorphism) afin de lier la performance des individus à la présence ou l'absence des certains allèles et ainsi identifier des loci sensibles au stress thermique et potentiellement adaptables. Nous pourrions par exemple déterminer dans quelle

mesure différents SNP associés aux protéines nucléaires recrutées par la mitochondrie en tant qu'unité fonctionnelle de l'ETS peuvent affecter la réponse au stress. Si à l'opposé, aucune ou peu de variation génétique n'est détectable au niveau des gènes codant pour certaines sous-unités des complexes respiratoires, les différences observées dans la respiration ou la production de DRO et associées au stress thermique devraient être induites par d'autres voies métaboliques et potentiellement des réactions en amont de la chaîne respiratoire (Baris et al., 2017). Une augmentation de la production des DRO à température élevée serait alors induite par une augmentation de l'activité des voies d'entrée des électrons plutôt que par une limitation de la capacité de transfert des électrons au sein de l'ETS.

D'une façon générale, le modèle utilisé dans la présente thèse me semble parfaitement adapté pour les expériences proposées dans la partie perspectives et ainsi en savoir plus sur le rôle de la mitochondrie dans la résistance à l'augmentation de la température. D'un côté, l'omble chevalier et l'omble de fontaine proviennent d'habitats thermiques différents et cela se répercute sur leurs performances dans le test de résistance au stress thermique. D'un autre côté, leur croisement produit une descendance hybride viable et observée dans la nature. Le « rebrassage » des interactions mitonucléaires qui en découle pourrait nous aider à identifier, par analyses transcriptomiques, les gènes clés impliqués dans l'adaptation à une hausse de température.

BIBLIOGRAPHIE

- Abele, D. (2002). Toxic oxygen: the radical life-giver. *Nature*, 420(6911), 27.
<https://doi.org/10.1038/420027a>
- Abele, D., & Puntarulo, S. (2004). Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 138(4), 405-415.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.05.013>
- Adarme-Vega, T. C., Thomas-Hall, S. R., & Schenk, P. M. (2014). Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 26, 14-18. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.003>
- Aiello, L. C., & Wheeler, P. (1995). The Expensive-Tissue Hypothesis: The Brain and the Digestive System in Human and Primate Evolution. *Curr. Anthropol.*, 36(2), 199-221. <https://doi.org/10.1086/204350>
- Ajith, T. A. (2014). Mitochondria-targeted agents: Future perspectives of mitochondrial pharmaceuticals in cardiovascular diseases. *World J. Cardiol.*, 6(10), 1091-1099. <https://doi.org/10.4330/wjc.v6.i10.1091>
- Ambrose, S. H. (2001). Paleolithic Technology and Human Evolution. *Science (80-.)*, 291, 1748-1753. <https://doi.org/10.1126/science.1059487>
- Angelos, M. G., Yeh, S. T., & Aune, S. E. (2011). Post-cardiac arrest hyperoxia and mitochondrial function. *Resuscitation*, 82(SUPPL. 2), S48-S51.
[https://doi.org/10.1016/S0300-9572\(11\)70151-4](https://doi.org/10.1016/S0300-9572(11)70151-4)
- Anttila, K., Dhillon, R. S., Boulding, E. G., Farrell, A. P., Glebe, B. D., Elliott, J. a K., ... Schulte, P. M. (2013). Variation in temperature tolerance among families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) is associated with hypoxia tolerance, ventricle size and myoglobin level. *J. Exp. Biol.*, 216(Pt 7), 1183-90.
<https://doi.org/10.1242/jeb.080556>
- Anttila, K., Mauduit, F., Le Floch, S., Claireaux, G., & Nikinmaa, M. (2017). Influence of crude oil exposure on cardiac function and thermal tolerance of juvenile rainbow trout and European sea bass. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24(24), 19624-19634. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9609-x>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-99.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 104(3-4), 199-235. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.001>

- Assefa, A. (2018). Maintenance of Fish Health in Aquaculture : Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. *Vet. Med. Int.*, 2018, 10.
- Ballinger, S. W. (2005). Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 38(10), 1278-1295.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.014>
- Bang, H., Dyerberg, J., & Nielsen, A. (1971). Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet*, 297, 1143-1146. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673671916588>
- Banh, S., Wiens, L., Sotiri, E., & Treberg, J. R. (2015). Mitochondrial reactive oxygen species production by fish muscle mitochondria: Potential role in acute heat-induced oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 191, 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.10.001>
- Banh, S., Wiens, L., Sotiri, E., & Treberg, J. R. (2016). Mitochondrial reactive oxygen species production by fish muscle mitochondria: Potential role in acute heat-induced oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol.*, 191, 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.10.001>
- Baradaran, R., Berrisford, J. M., Minhas, G. S., & Sazanov, L. a. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*, 494(7438), 443-8.
<https://doi.org/10.1038/nature11871>
- Barbosa, D. S., Cecchini, R., El Kadri, M. Z., Rodríguez, M. A. M., Burini, R. C., & Dichi, I. (2003). Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil ω -3 fatty acids. *Nutrition*, 19(10), 837-842.
[https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(03\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(03)00162-X)
- Baris, T. Z., Blier, P. U., Pichaud, N., Crawford, D. L., & Oleksiak, M. F. (2016). Gene by environmental interactions affecting oxidative phosphorylation and thermal sensitivity. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 311(1), R157-R165.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00008.2016>
- Baris, T. Z., Wagner, D. N., Dayan, D. I., Du, X., Blier, P. U., Pichaud, N., ... Crawford, D. L. (2017). Evolved genetic and phenotypic differences due to mitochondrial-nuclear interactions. *PLoS Genet.*, 13(3), 1-23.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006517>
- Barreto, F., & Burton, R. (2013). Elevated oxidative damage is correlated with reduced fitness in interpopulation hybrids of a marine copepod. *Proc. R. Soc.*, 280, 1767-1773. Repéré à <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/280/1767/20131521.short>
- Barreto, F. S., Pereira, R. J., & Burton, R. S. (2015). Hybrid Dysfunction and

- Physiological Compensation in Gene Expression. *Mol. Biol. Evol.*, 32(3), 613-622. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu321>
- Bartley, D., Rana, K., & Immink, A. (2000). The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 325-337. Repéré à <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1016691725361>
- Beaulieu, M., & Costantini, D. (2014). Biomarkers of oxidative status: Missing tools in conservation physiology. *Conserv. Physiol.*, 2(1), 1-16. <https://doi.org/10.1093/conphys/cou014>
- Becker, C. D., & Genoway, R. G. (1979). Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. *Env. Biol. Fish*, 4(3), 245-256. <https://doi.org/10.1007/BF00005481>
- Bell, J. G., McEvoy, J., Tocher, D. R., McGhee, F., Campbell, P. J., & Sargent, J. R. (2001). Replacement of Fish Oil with Rapeseed Oil in Diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Affects Tissue Lipid Compositions and Hepatocyte Fatty Acid Metabolism. *J. Nutr.*, 131(5), 1535-1543. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1535>
- Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J. A., Kaushik, S., & Pérez-Sánchez, J. (2007). Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture*, 267(1-4), 199-212. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.011>
- Bernatchez, L., Glémet, H., Wilson, C. C., & Danzmann, R. G. (1995). Introgression and fixation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52(1), 179-185. <https://doi.org/10.1139/f95-018>
- Berr, C., Akbaraly, T., Arnaud, J., Hininger, I., Roussel, A. M., & Gateau, P. B. (2009). Increased selenium intake in elderly high fish consumers may account for health benefits previously ascribed to omega-3 fatty acids. *J. Nutr. Heal. Aging*, 13(1), 14-18. <https://doi.org/10.1007/s12603-009-0003-3>
- Blackie, C. T., Morrissey, M. B., Danzmann, R. G., & Ferguson, M. M. (2011). Genetic divergence among broodstocks of Arctic charr *Salvelinus alpinus* in eastern Canada derived from the same founding populations. *Aquac. Res.*, 42(10), 1440-1452. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02736.x>
- Blanchi, C., Genova, M. L., Castelli, G. P., & Lenaz, G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: Kinetic evidence using flux control analysis. *J. Biol. Chem.*, 279(35), 36562-36569. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405135200>
- Blier, P. U. (2014). Fish Health: An Oxidative Stress Perspective. *Fish. Aquac. J.*, 5,

3508. <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000e105>

Blier, P. U., Dufresne, F., & Burton, R. S. (2001). Natural selection and the evolution of myDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends Genet.*, 17(7), 400-406.

Blier, P. U., & Lemieux, H. (2001). The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.*, 171, 247-253. <https://doi.org/10.1007/s003600000169>

Blier, P. U., Lemieux, H., & Pichaud, N. (2014). Holding our breath in our modern world : will mitochondria keep the pace with climate changes ? *Can. J. Zool.*, 92, 591-601. <https://doi.org/10.1139/cjz-2013-0183>

Blount, J. D., Vitikainen, E. I. K., Stott, I., & Cant, M. A. (2016). Oxidative shielding and the cost of reproduction. *Biol. Rev.*, 91(2), 483-497. <https://doi.org/10.1111/brv.12179>

Boekema, E. J., & Braun, H. P. (2007). Supramolecular Structure of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System. *J. Biol. Chem.*, 282(1), 1-4. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600031200>

Bombicino, S. S., Iglesias, D. E., Mikusic, I. A. R., D'Annunzio, V., Gelpi, R. J., Boveris, A., & Valdez, L. B. (2016). Diabetes impairs heart mitochondrial function without changes in resting cardiac performance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 81, 335-345. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.018>

Borges, P., Valente, L. M. P., Ve on, V., Dias, K., Panserat, S., & M dale, F. (2014). High dietary lipid level is associated with persistent hyperglycaemia and downregulation of muscle Aktm-TOR pathway in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *PLoS One*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102196>

Bowden, J. A., Bangma, J. T., & Kucklick, J. R. (2014). Development of an automated multi-injection shotgun lipidomics approach using a triple quadrupole mass spectrometer. *Lipids*, 49(6), 609-619. <https://doi.org/10.1007/s11745-014-3903-x>

Brand, M. D. (2011). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.*, 45(7-8), 466-472. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>

Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.*, 435(2), 297-312. <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>

Braverman, N. E., & Moser, A. B. (2012). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, 1822(9), 1442-1452.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.008>

- Brijs, J., Jutfelt, F., Clark, T. D., Grans, A., Ekstrom, A., & Sandblom, E. (2015). Experimental manipulations of tissue oxygen supply do not affect warming tolerance of European perch. *J. Exp. Biol.*, *218*(15), 2448-2454. <https://doi.org/10.1242/jeb.121889>
- Brijs, J., Sandblom, E., Axelsson, M., Sundell, K., Sundh, H., Huyben, D., ... Gräns, A. (2018). The final countdown: Continuous physiological welfare evaluation of farmed fish during common aquaculture practices before and during harvest. *Aquaculture*, *495*(January), 903-911. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.081>
- Broadhurst, C. L., Wang, Y., Crawford, M. A., Cunnane, S. C., Parkington, J. E., & Schmidt, W. F. (2002). Brain-specific lipids from marine, lacustrine, or terrestrial food resources: Potential impact on early African Homo sapiens. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.*, *131*(4), 653-673. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00002-7)
- Brown, D. A., Perry, J. B., Allen, M. E., Sabbah, H. N., Stauffer, B. L., Shaikh, S. R., ... Gheorghide, M. (2017). Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.*, *14*(4), 238-250. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.203>
- Brown, P. T., & Caldeira, K. (2017). Article Greater future global warming inferred from Earth ' s recent energy budget. *Nat. Publ. Gr.*, *552*(7683), 45-50. <https://doi.org/10.1038/nature24672>
- Brueckl, C., Kaestle, S., Kerem, A., Habazettl, H., Krombach, F., Kuppe, H., & Kuebler, W. M. (2006). Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, *34*(4), 453-463. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0223OC>
- Burr, M. L. (2000). Lessons from the story of n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr*, *71*(August), 397-398.
- Bynum, G. D., Pandolf, K. B., Schuette, W. H., Goldman, R. F., Lees, D. E., Whang-Peng, J., ... Bull, J. M. (1978). Induced hyperthermia in sedated humans and the concept of critical thermal maximum. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*, *235*(5), R228 LP-R236. Repéré à <http://ajpregu.physiology.org/content/235/5/R228.abstract>
- Byrne, C. D. (2010). Fatty liver: Role of inflammation and fatty acid nutrition. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, *82*(4-6), 265-271. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2010.02.012>
- Cadario, F., Savastio, S., Rizzo, A. M., Carrera, D., Bona, G., & Ricordi, C. (2017).

- Can Type 1 diabetes progression be halted? Possible role of high dose vitamin D and omega 3 fatty acids. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 21(7), 1604-1609. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28429367>
- Calder, P. C. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 75(3), 645-62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x>
- Calder, P. C. (2014). Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 116(10), 1280-1300. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400025>
- Calder, P. C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *J. Parenter. Enter. Nutr.*, 39, 18S-32S. <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>
- Calder, P. C., & Yaqoob, P. (2009). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *Biofactors*, 35(3), 266-72. <https://doi.org/10.1002/biof.42>
- Calosi, P., Turner, L. M., Hawkins, M., Bertolini, C., Nightingale, G., Truebano, M., & Spicer, J. I. (2013). Multiple physiological responses to multiple environmental challenges: An individual approach. *Integr. Comp. Biol.*, 53(4), 660-670. <https://doi.org/10.1093/icb/ict041>
- Careau, V., Gifford, M. E., & Biro, P. A. (2014). Individual (co)variation in thermal reaction norms of standard and maximal metabolic rates in wild-caught slimy salamanders. *Funct. Ecol.*, 28(5), 1175-1186. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12259>
- Catalá, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids*, 157(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.09.004>
- Catalá, A. (2010). A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 399(3), 318-23. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.087>
- Chance, B. & Williams, G. R. (1955). Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation. *J Biol Chem*, 217, 409-428. Repéré à <http://www.jbc.org/>
- Chatelier, A., McKenzie, D. J., Prinnet, A., Galois, R., Robin, J., Zambonino, J., & Claireaux, G. (2006). Associations between tissue fatty acid composition and physiological traits of performance and metabolism in the seabass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Exp. Biol.*, 209(Pt 17), 3429-39. <https://doi.org/10.1242/jeb.02347>

- Chen, J., Zhu, X., Han, D., Yang, Y., Lei, W., & Xie, S. (2011). Effect of dietary n-3 HUFA on growth performance and tissue fatty acid composition of gibel carp *Carassius auratus gibelio*. *Aquac. Nutr.*, *17*(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00784.x>
- Chen, L., & Knowlton, A. A. (2010). Mitochondria and heart failure: New insights into an energetic problem. *Minerva Cardioangiol.*, *58*(2), 213-229. <https://doi.org/R05102998> [pii]
- Chen, Z., Farrell, A. P., Matala, A., & Narum, S. R. (2018). Mechanisms of thermal adaptation and evolutionary potential of conspecific populations to changing environments. *Mol. Ecol.*, *27*(3), 659-674. <https://doi.org/10.1111/mec.14475>
- Cheng, C. H., Guo, Z. X., Luo, S. W., & Wang, A. L. (2018). Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, *150*(September 2017), 190-198. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.045>
- Cheng, Z., & Ristow, M. (2013). Mitochondria and Metabolic Homeostasis. *Antioxid. Redox Signal.*, *19*(3), 240-242. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5255>
- Christen, F., Desrosiers, V., Dupont-Cyr, B. A., Vandenberg, G. W., Le François, N. R., Tardif, J. C., ... Blier, P. U. (2018). Thermal tolerance and thermal sensitivity of heart mitochondria: Mitochondrial integrity and ROS production. *Free Radic. Biol. Med.*, *116*(December 2017), 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.037>
- Chung, D. J., Bryant, H. J., & Schulte, P. M. (2017). Thermal acclimation and subspecies-specific effects on heart and brain mitochondrial performance in a eurythermal teleost (*Fundulus heteroclitus*). *J. Exp. Biol.*, *220*(8), 1459-1471. <https://doi.org/10.1242/jeb.151217>
- Chung, D. J., Sparagna, G. C., Chicco, A. J., & Schulte, P. M. (2018). Patterns of mitochondrial membrane remodeling parallel functional adaptations to thermal stress. *J. Exp. Biol.*, *221*(7), jeb174458. <https://doi.org/10.1242/jeb.174458>
- Claireaux, G., Théron, M., Prineau, M., Dussauze, M., Merlin, F.-X., & Le Floch, S. (2013). Effects of oil exposure and dispersant use upon environmental adaptation performance and fitness in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.*, *130-131*, 160-70. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.004>
- Clanton, T. L. (2007). Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, *102*(6), 2379-88. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01298.2006>
- Clark, T. D., Sandblom, E., Cox, G. K., Hinch, S. G., & Farrell, A. P. (2008).

- Circulatory limits to oxygen supply during an acute temperature increase in the Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 295(5), R1631-R1639. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90461.2008>
- Clark, T. D., Sandblom, E., & Jutfelt, F. (2013). Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: respirometry, relevance and recommendations. *J. Exp. Biol.*, 216(Pt 15), 2771-82. <https://doi.org/10.1242/jeb.084251>
- Clement, A. B., Gimpl, G., & Behl, C. (2010). Oxidative stress resistance in hippocampal cells is associated with altered membrane fluidity and enhanced nonamyloidogenic cleavage of endogenous amyloid precursor protein. *Free Radic. Biol. Med.*, 48(9), 1236-1241. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.008>
- Cowles, R. B., & Bogert, C. M. (1944). A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bull. Am. Museum Nat. Hist.*, 83, 261-296. <https://doi.org/10.1007/s10329-011-0270-6>
- Crawford, M. A., Bloom, M., Cunnane, S., Holmsen, H., Ghebremeskel, K., Parkington, J., ... Broadhurst, C. L. (2001). Docosahexaenoic Acid and Cerebral Evolution. *World Rev Nutr Diet*, 88, 6-17. <https://doi.org/10.1159/000059743>
- Crawford, M. a. (1992). The role of dietary fatty acids in biology: their place in the evolution of the human brain. *Nutr. Rev.*, 50(4 (Pt 2)), 3-11. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1992.tb01283.x>
- Crawford, M. a, Bloom, M., Broadhurst, C. L., & Al., E. (1999). Evidence for the unique function of docasahexaenoic acid during the evolution of the modern human brain. *Lipids*, 34 (Suppl)(3), S39-S47. <https://doi.org/10.1007/BF02562227>
- Cui, H., Kong, Y., & Zhang, H. (2012). Oxidative Stress , Mitochondrial Dysfunction , and Aging, 2012, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2012/646354>
- Cui, J., & Sinoway, L. I. (2012). Cardiovascular responses to heat stress in chronic heart failure. *Curr. Heart Fail. Rep.*, 11, 139-145. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9767-z>.Plastid
- Cunnane, S. C., & Crawford, M. A. (2003). Survival of the fattest: Fat babies were the key to evolution of the large human brain. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, 136(1), 17-26. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00048-5)
- Cunnane, S. C., Plourde, M., Stewart, K., & Crawford, M. A. (2007). Docosahexaenoic Acid and Shore-Based Diets in Hominin Encephalization: A Rebuttal. *Am. J. Hum. Biol.*, 19, 578-581. <https://doi.org/10.1002/ajhb>

- Dan Dunn, J., Alvarez, L. A. J., Zhang, X., & Soldati, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol.*, 6, 472-485. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.005>
- Das, U. (2006). Essential Fatty Acids - A Review. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 7(6), 467-482. <https://doi.org/10.2174/138920106779116856>
- Daufresne, M., Lengfellner, K., & Sommer, U. (2009). Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106(31), 12788-12793. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902080106>
- Deacon, G., Kettle, C., Hayes, D., Dennis, C., & Tucci, J. (2015). Omega 3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Treatment of Depression. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57, 212-223. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.876959>
- Denis, I., Potier, B., Heberden, C., & Vancassel, S. (2015). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and brain aging. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 18(2), 139-146. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000141>
- Devassy, J., Leng, S., Gabbs, M., Monirujjaman, M., & Aukema, H. (2016). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Oxylipins in Neuroinflammation and Management. *Adv. Nutr.*, 7(8), 905-916. <https://doi.org/10.3945/an.116.012187>
- Diaz, F., Enríquez, J. A., & Moraes, C. T. (2012). Cells lacking Rieske iron-sulfur protein have a reactive oxygen species-associated decrease in respiratory complexes I and IV. *Mol. Cell. Biol.*, 32(2), 415-29. <https://doi.org/10.1128/MCB.06051-11>
- Diffenbaugh, N. S., & Field, C. B. (2014). Changes in Ecologically critical terrestrial climate conditions. *Science (80-.)*, 341, 486-492. <https://doi.org/10.1126/science.1237123>
- Dowling, D. K., Friberg, U., & Lindell, J. (2008). Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. *Trends Ecol. Evol.*, 23(10), 546-554. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.05.011>
- Dowling, D. K., & Simmons, L. W. (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 276(1663), 1737-1745. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1791>
- Du, S. N. N., Mahalingam, S., Borowiec, B. G., & Scott, G. R. (2016). Mitochondrial physiology and reactive oxygen species production are altered by hypoxia acclimation in killifish (*Fundulus heteroclitus*). *J. Exp. Biol.*, (February), 1130-1138. <https://doi.org/10.1242/jeb.132860>
- Dunstan, G. A., Olley, J., & Ratkowsky, D. A. (1999). Major environmental and

biological factors influencing the fatty acid composition of seafood from Indo-Pacific to Antarctic waters. *Recent Res. Dev. Lipids Res.*, 3, 63-86.

- Edge, R., & Truscott, T. (2018). Singlet Oxygen and Free Radical Reactions of Retinoids and Carotenoids—A Review. *Antioxidants*, 7(1), 5.
<https://doi.org/10.3390/antiox7010005>
- Edmands, S., & Deimler, J. K. (2004). Local adaptation, intrinsic coadaptation and the effects of environmental stress on interpopulation hybrids in the copepod *Tigriopus californicus*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 303(2), 183-196.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.11.012>
- Ekström, A., Brijs, J., Clark, T. D., Gräns, A., Jutfelt, F., & Sandblom, E. (2016). Cardiac oxygen limitation during an acute thermal challenge in the European perch: Effects of chronic environmental warming and experimental hyperoxia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, (41), ajpregu.00530.2015.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00530.2015>
- Ekström, A., Sandblom, E., Blier, P. U., Dupont-Cyr, B. A., Brijs, J., & Pichaud, N. (2017). Thermal sensitivity and phenotypic plasticity of cardiac mitochondrial metabolism in European perch, *Perca fluviatilis*. *J. Exp. Biol.*, 220.
<https://doi.org/10.1242/jeb.150698>
- Eliason, E. J., & Anttila, K. (2017). Temperature and the Cardiovascular System. Dans *Fish Physiol.* (1^{re} éd., Vol. 36, pp. 235-297). (S.I.) : Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/bs.fp.2017.09.003>
- Ellison, C., & Burton, R. (2006). Disruption of mitochondrial function in interpopulation hybrids of *Tigriopus californicus*. *Evolution (N. Y.)*, 60(7), 1382-1391. Repéré à <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01217.x/full>
- Ellison, C. K., & Burton, R. S. (2008). Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. *Evolution (N. Y.)*, 62(3), 631-638.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00305.x>
- Ellison, C. K., Niehuis, O., & Gadau, J. (2008). Hybrid breakdown and mitochondrial dysfunction in hybrids of *Nasonia* parasitoid wasps. *J. Evol. Biol.*, 21(6), 1844-1851. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01608.x>
- Else, P. L. (2017). Membrane peroxidation in vertebrates: Potential role in metabolism and growth. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 119(6).
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201600319>
- Eritsland, J. (2000). Safety considerations of polyunsaturated fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 2-6.

- Ern, R., Huong, D. T. T., Phuong, N. T., Madsen, P. T., Wang, T., & Bayley, M. (2015). Some like it hot: Thermal tolerance and oxygen supply capacity in two eurythermal crustaceans. *Sci. Rep.*, 5(JUNE), 10743. <https://doi.org/10.1038/srep10743>
- Farombi, E. O., Adelowo, O. A., & Ajimoko, Y. R. (2007). Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 4(2), 158-165. <https://doi.org/10.3390/ijerph2007040011>
- Farrell, A. (2002). Cardiorespiratory performance in salmonids during exercise at high temperature: insights into cardiovascular design limitations in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 132, 797-810. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643302000491>
- Farrell, A. P. (1996). Effects of temperature on cardiovascular performance. Dans *Glob. Warm. Implic. Freshw. Mar. fish* (pp. 135-158). (S.l.): (s.n.). Repéré à http://scholarworks.umass.edu/fishpassage_book_chapters/119
- Farrell, A. P., Eliason, E. J., Sandblom, E., & Clark, T. D. (2009a). Fish cardiorespiratory physiology in an era of climate change. *Can. J. Zool.*, 87(10), 835-851. <https://doi.org/10.1139/Z09-092>
- Farrell, A. P., Eliason, E. J., Sandblom, E., & Clark, T. D. (2009b). Fish cardiorespiratory physiology in an era of climate change. *Stroke*, 851(10), 835-851. <https://doi.org/10.1139/Z09-100>
- Farrell, A. P., Gamperl, A., Hicks, J., Shiels, H., & Jain, K. (1996). Maximum cardiac performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at temperatures approaching their upper lethal limit. *J. Exp. Biol.*, 199, 663-72. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9318401>
- Ferguson, H., Poppe, T., & Speare, D. (1990). Cardiomyopathy in farmed Norwegian salmon. *Dis. Aquat. Organ.*, 8, 225-231. Repéré à <http://www.islandscholar.ca/fedora/repository/ir:ir-batch6-4030>
- Filho, D. W. (2007). Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. *Front. Biosci.*, 12, 1229-1237. Repéré à <http://www.bioscience.org/u37153137/gaDTRQo7632rgysaGWQYT64356/2007/v12/af/2141/2141.pdf>
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.*, 194(1), 7-15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>
- Fontagné-Dicharry, S., Lataillade, E., Surget, A., Larroquet, L., Cluzeaud, M., & Kaushik, S. (2014). Antioxidant defense system is altered by dietary oxidized lipid in first-feeding rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*,

424-425, 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.009>

- Fontagné, S., Lataillade, E., Brèque, J., & Kaushik, S. (2008). Lipid peroxidative stress and antioxidant defence status during ontogeny of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.*, *100*(1), 102-11. <https://doi.org/10.1017/S0007114507876215>
- Frankish, C. J., Green, L. W., Ratner, P. A., Chomik, T., & Larsen, C. (2001). Health impact assessment as a tool for health promotion and population health. *WHO Reg. Publ. Eur. Ser.*, (92), 405-37. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11729781>
- Fry, F. E. J. (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. *Fish Physiol.*, *6*, 1-98. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60146-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60146-6)
- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid. Redox Signal.*, *15*(6), 1583-1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>
- Gabriel, D., Riffel, A. P. K., Finamor, I. a, Saccol, E. M. H., Ourique, G. M., Goulart, L. O., ... Llesuy, S. F. (2013). Effects of Subchronic Manganese Chloride Exposure on Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Tissues: Oxidative Stress and Antioxidant Defenses. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, *64*, 659-667. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9854-4>
- Galbreath, P. F., Adams, N. D., & Martin, T. H. (2004). Influence of heating rate on measurement of time to thermal maximum in trout. *Aquaculture*, *241*(1-4), 587-599. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.004>
- Galbreath, P. F., Adams, N. D., Sherrill, L. W., & Martin, T. H. (2006). Thermal tolerance of diploid versus triploid rainbow trout and brook trout assessed by time to chronic lethal maximum. *Environ. Biol. Fishes*, *75*(2), 183-193. <https://doi.org/10.1007/s10641-006-0008-2>
- Gamperl, A. K., & Farrell, A. P. (2004). Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. *J. Exp. Biol.*, *207*(Pt 15), 2539-50. <https://doi.org/10.1242/jeb.01057>
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *482*(3), 419-425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
- Gerald, M., & Tebaldi, C. (2004). More Intense , More Frequent , and Longer Lasting Heat Waves in the 21st Century. *Science (80-.)*, *305*, 994-997.
- Gjedrem, T. (2000). Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquac. Res.*, *31*(1), 25-33. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00389.x>

- Glenncross, B. D., Tocher, D. R., Mathew, C., & Bell, J. G. (2014). Interactions between dietary docosahexaenoic acid and other long-chain polyunsaturated fatty acids on performance and fatty acid retention in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, *40*, 1213-1227. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9917-8>
- Gnaiger, E. (2009). Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, *41*(10), 1837-45. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.03.013>
- Gnaiger, E., & Kuznetsov, A. V. (2002). Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c. *Biochem. Soc. Trans.*, *30*(2), 252-258.
- Goncalves, R. L. S., Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., & Brand, M. D. (2015). Sites of superoxide and hydrogen peroxide production by muscle mitochondria assessed ex vivo under conditions mimicking rest and exercise. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619072>
- Grimsrud, K. M., Nielsen, H. M., Navrud, S., & Olesen, I. (2013). Households' willingness-to-pay for improved fish welfare in breeding programs for farmed Atlantic salmon. *Aquaculture*, *372-375*, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.10.009>
- Grisham, M. B. (2013). Methods to detect hydrogen peroxide in living cells: Possibilities and pitfalls. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, *165*(4), 429-438. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.003>
- Guarás, A., Perales-Clemente, E., Calvo, E., Acín-Pérez, R., Loureiro-Lopez, M., Pujol, C., ... Enríquez, J. A. (2016). The CoQH2/CoQ Ratio Serves as a Sensor of Respiratory Chain Efficiency. *Cell Rep.*, *15*(1), 197-209. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.009>
- Hafstad, A. D., Nabeebaccus, A. A., & Shah, A. M. (2013). Novel aspects of ROS signalling in heart failure. *Basic Res. Cardiol.*, *108*(4). <https://doi.org/10.1007/s00395-013-0359-8>
- Hallahan, B., Ryan, T., Hibbeln, J. R., Murray, I. T., Glynn, S., Ramsden, C. E., ... Davis, J. M. (2016). Efficacy of omega-3 highly unsaturated fatty acids in the treatment of depression. *Br. J. Psychiatry*, *209*(3), 192-201. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.114.160242>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Univ. Press. NY (Vol. 5th). (S.I.): (s.n.). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Hamilton, D. J., Zhang, A., Li, S., Cao, T. N., Smith, J. A., Vedula, I., ... Com- G. A. A. (2016). Cardiovascular Mitochondria and Redox Control in Health

- Combination of angiotensin II and L - N G -nitroarginine methyl ester exacerbates mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cause heart failure. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, 77030, 667-680. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00746.2015>
- Hammar, J., Dempson, B., & Verspoor, E. (1991). Hybridization between Arctic Char (*Salvelinus alpinus*) and brook trout (*S. fontinalis*): Evidence from northern labrador. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48, 1437-1445.
- Harris, D. A., & Das, A. M. (1991). Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem. J.*, 280, 561-573. <https://doi.org/10.1042/bj2800561>
- Harvey, P. H., & Clutton-Brock, T. H. (1985). Life History Variation in Primates. *Evolution (N. Y.)*, 39(3), 559-581. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00395.x>
- Henderson, R. J., & Tocher, D. R. (1987). The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.*, 26(4), 281-347. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(87\)90002-6](https://doi.org/10.1016/0163-7827(87)90002-6)
- Henriques, J., Dick, J. R., Tocher, D. R., & Bell, J. G. (2014). Nutritional quality of salmon products available from major retailers in the UK: Content and composition of n-3 long-chain PUFA. *Br. J. Nutr.*, 112(6), 964-975. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001603>
- Hickey, A. J. R., Chai, C. C., Choong, S. Y., de Freitas Costa, S., Skea, G. L., Phillips, A. R. J., & Cooper, G. J. S. (2009). Impaired ATP turnover and ADP supply depress cardiac mitochondrial respiration and elevate superoxide in nonfailing spontaneously hypertensive rat hearts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 297(3), C766-74. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00111.2009>
- Hilton, Z., Clements, K. D., & Hickey, A. J. R. (2010). Temperature sensitivity of cardiac mitochondria in intertidal and subtidal triplefin fishes. *J. Comp. Physiol. B*, 180(7), 979-990. <https://doi.org/10.1007/s00360-010-0477-7>
- Hirai, A., Hamazaki, T., Terano, T., Nishikawa, T., Tamura, Y., Kumagai, A., & Sajiki, J. (1980, 22 novembre). Eicosapentaenoic acid and platelet function in Japanese. *Lancet*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)92558-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)92558-1)
- Hixson, S. M., Sharma, B., Kainz, M. J., Wacker, A., & Arts, M. T. (2015). Production, distribution, and abundance of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids: a fundamental dichotomy between freshwater and terrestrial ecosystems. *Environ. Rev.*, 23(4), 414-424. <https://doi.org/10.1139/er-2015-0029>
- Hochachka, P. W., & Somero, G. N. (1968). The adaptation of enzymes to temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, 27(3), 659-668.

[https://doi.org/10.1016/0010-406X\(68\)90605-1](https://doi.org/10.1016/0010-406X(68)90605-1)

- Hsieh, R. J., & Kinsella, J. E. (1989). Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids: Mechanisms, Products, and Inhibition with Emphasis on Fish. *Adv. Food Nutr. Res.*, 33(C), 233-341. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)60129-1](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60129-1)
- Hudert, C. a, Weylandt, K. H., Lu, Y., Wang, J., Hong, S., Dignass, A., ... Kang, J. X. (2006). Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(30), 11276-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601280103>
- Hudson, E. D., Ariya, P. A., & Ġlinas, Y. (2011). A method for the simultaneous quantification of 23 C 1C 9 trace aldehydes and ketones in seawater. *Environ. Chem.*, 8(4), 441-449. <https://doi.org/10.1071/EN10115>
- Hulbert, A. J., & Else, P. L. (2000). Mechanisms underlying the cost of living in animals. *Annu. Rev. Physiol.*, 62, 207-35. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.207>
- Hulbert, A. J., Martin, N., & Else, P. L. (2017). Lipid Peroxidation and Animal Longevity. *Lipid Peroxidation Inhib. Eff. Mech. Nov. Publ.* Repéré à https://www.researchgate.net/profile/Nicolas_Martin14/publication/313438386_Lipid_peroxidation_and_animal_longevity/links/589aabe84585158bf6f8bbab/Lipid-oxidation-and-animal-longevity.pdf
- Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R., & Buttemer, W. A. (2007). Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiol. Rev.*, 87(4), 1175-1213. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2006>
- Hunter, J. E. (2005). Dietary levels of trans-fatty acids: Basis for health concerns and industry efforts to limit use. *Nutr. Res.*, 25(5), 499-513. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2005.04.002>
- Ibarz, A., Blasco, J., Beltrán, M., Gallardo, M. A., Sánchez, J., Sala, R., & Fernández-Borràs, J. (2005). Cold-induced alterations on proximate composition and fatty acid profiles of several tissues in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 249(1-4), 477-486. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2005.02.056>
- Ide, T., Tsutsui, H., Kinugawa, S., Utsumi, H., Kang, D., Hattori, N., ... Takeshita, A. (1999). Mitochondrial Electron Transport Complex I Is a Potential Source of Oxygen Free Radicals in the Failing Myocardium. *Circ. Res.*, 85(4), 357-363. <https://doi.org/10.1161/01.RES.85.4.357>
- Iftikar, F. I., & Hickey, A. J. R. (2013). Do mitochondria limit hot fish hearts? Understanding the role of mitochondrial function with heat stress in *Notolabrus celidotus*. *PLoS One*, 8(5), e64120.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064120>

Iftikar, F. I., MacDonald, J. R., Baker, D. W., Renshaw, G. M. C., & Hickey, a. J. R. (2014). Could thermal sensitivity of mitochondria determine species distribution in a changing climate? *J. Exp. Biol.*, *217*(13), 2348-2357. <https://doi.org/10.1242/jeb.098798>

Ingwall, J. S. (2002). ATP and the Heart. Dans *Springer* (Vol. 1). (S.I.) : (s.n.). <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1093-2>

Innis, S. M. (2007). Dietary (n-3) Fatty Acids and Brain Development. *J. Nutr.*, *137*(4), 855-859. Repéré à <http://jn.nutrition.org/content/137/4/855.short>

International, A. (2012). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. Gaithersburg, MD, USA. (S.I.) : (s.n.). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20883.89125>

Jang, S., Lewis, T. S., Powers, C., Khuchua, Z., Baines, C. P., Wipf, P., & Javadov, S. (2017). Elucidating Mitochondrial Electron Transport Chain Supercomplexes in the Heart During Ischemia/Reperfusion. *Antioxid. Redox Signal.*, *27*(1), 57-69. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6635>

Jarmuszkiewicz, W., Woyda-Ploszczyca, A., Koziel, A., Majerczak, J., & Zoladz, J. A. (2015). Temperature controls oxidative phosphorylation and reactive oxygen species production through uncoupling in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, *83*, 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.012>

Jensen, C., Birk, E., Jokumsen, A., Skibsted, L. H., & Bertelsen, G. (1998). Effect of dietary levels of fat , a -tocopherol and astaxanthin on colour and lipid oxidation during storage of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and during chill storage of smoked trout. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, *207*, 189-196.

Ježek, P., & Hlavatá, L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, *37*(12), 2478-2503. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.05.013>

Jobling, M. (2004). ' Finishing ' feeds for carnivorous fish and the fatty acid dilution model. *Aquac. Res.*, (35), 706-709. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01067.x>

Jobson, R. W., Nabholz, B., & Galtier, N. (2010). An evolutionary genome scan for longevity-related natural selection in mammals. *Mol. Biol. Evol.*, *27*(4), 840-847. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp293>

Jones, D. P. (1985). The role of oxygen concentration in Oxidative stress: Hypoxic and Hyperoxic models. Dans *Oxidative Stress* (pp. 152-191). (S.I.) : (s.n.).

- Kalmar, B., & Greensmith, L. (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61(4), 310-318. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.02.003>
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K., Dennerly, P., Forman, H., Grisham, M., ... Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med.*, 52(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>. Measuring
- Karamanlidis, G., Chi Fung, L., Garcia-Menendez, L., Kolwicz, S. C., Suthammarak, W., Gong, G., ... Tian, R. (2014). Mitochondrial Complex I Deficiency Increases Protein Acetylation and Accelerates Heart Failure. *Cell Metab.*, 18(2), 239-250. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.07.002>. Mitochondrial
- Keen, A. N., Klaiman, J. M., Shiels, H. A., & Gillis, T. E. (2017). Temperature-induced cardiac remodelling in fish. *J. Exp. Biol.*, 220(2), 147-160. <https://doi.org/10.1242/jeb.128496>
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00231-6)
- Khan, J. R., Iftikar, F. I., Herbert, N. A., Gnaiger, E., & Hickey, A. J. R. (2014). Thermal plasticity of skeletal muscle mitochondrial activity and whole animal respiration in a common intertidal triplefin fish, *Forsterygion lapillum* (Family: *Tripterygiidae*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.*, 184(8), 991-1001. <https://doi.org/10.1007/s00360-014-0861-9>
- Kiessling, A., Olsen, R., & Buttle, L. (2003). Given the same dietary carotenoid inclusion, Atlantic salmon, *Salmo salar*(L.) display higher blood levels of canthaxanthin than astaxanthin. *Aquac. Nutr.*, (2001), 253-261. Repéré à <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2095.2003.00251.x/full>
- Kjær, M. A., Todorčević, M., Torstensen, B. E., Vegusdal, A., & Ruyter, B. (2008). Dietary n-3 HUFA affects mitochondrial fatty acid β -oxidation capacity and susceptibility to oxidative stress in Atlantic salmon. *Lipids*, 43(9), 813-827. <https://doi.org/10.1007/s11745-008-3208-z>
- Kobayashi, M., & Sakamoto, Y. (1999). Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.*, 21(4), 265-269. <https://doi.org/10.1023/A:1005445927433>
- Kraffe, E., Marty, Y., & Guderley, H. (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(Pt 1), 149-65. <https://doi.org/10.1242/jeb.02628>

- Kris-Etherton, P. M. (2002). Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation*, *106*(21), 2747-2757.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000038493.65177.94>
- Kurokawa, H., Ito, H., Inoue, M., Tabata, K., Sato, Y., Yamagata, K., ... Kamachi, T. (2015). High resolution imaging of intracellular oxygen concentration by phosphorescence lifetime. *Sci. Rep.*, *5*, 1-3. <https://doi.org/10.1038/srep10657>
- Kuter, K., Kratochwil, M., Berghauzen-Maciejewska, K., Głowacka, U., Sugawa, M. D., Ossowska, K., & Dencher, N. A. (2016). Adaptation within mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and membrane viscosity during degeneration of dopaminergic neurons in an animal model of early Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, *1862*(4), 741-753.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.01.022>
- Kuznetsov, A. V, Schneeberger, S., Seiler, R., Brandacher, G., Mark, W., Steurer, W., ... Gnaiger, E. (2004). Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, *286*(5), H1633-41.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00701.2003>
- Kuznetsov, A. V, Strobl, D., Ruttman, E., Königsrainer, A., Margreiter, R., & Gnaiger, E. (2002). Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Anal. Biochem.*, *305*(2), 186-94.
<https://doi.org/10.1006/abio.2002.5658>
- Laidlaw, M., Cockerline, C. a, & Rowe, W. J. (2014). A randomized clinical trial to determine the efficacy of manufacturers' recommended doses of omega-3 fatty acids from different sources in facilitating cardiovascular disease risk reduction. *Lipids Health Dis.*, *13*(1), 99. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-99>
- Lane, N. (2011). The Evolution of Oxidative Stress. *Princ. Free Radic. Biomed.*, *1*, 1-17.
- Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., ... Enriquez, J. A. (2013). Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Science (80-.)*, *340*(6140), 1567-1570.
<https://doi.org/10.1126/science.1230381>
- Lassek, W. D., & Gaulin, S. J. C. (2015). Maternal milk DHA content predicts cognitive performance in a sample of 28 nations. *Matern. Child Nutr.*, *11*(4), 773-779. <https://doi.org/10.1111/mcn.12060>
- Lauritzen, L., Brambilla, P., Mazzocchi, A., Harsløf, L., Ciappolino, V., & Agostoni, C. (2016). DHA Effects in Brain Development and Function. *Nutrients*, *8*(1), 6.
<https://doi.org/10.3390/nu8010006>

- Leaver, M. J., Taggart, J. B., Villeneuve, L., Bron, J. E., Guy, D. R., Bishop, S. C., ... Tocher, D. R. (2011). Heritability and mechanisms of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid deposition in the flesh of Atlantic salmon. *Comp. Biochem. Physiol. - Part D Genomics Proteomics*, 6(1), 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2010.04.002>
- Lemieux, H., Blier, P. U., & Gnaiger, E. (2017a). Remodeling pathway control of mitochondrial respiratory capacity by temperature in mouse heart: electron flow through the Q-junction in permeabilized fibers. *Sci. Rep.*, 7(February), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02789-8>
- Lemieux, H., Blier, P. U., & Gnaiger, E. (2017b). Remodeling Pathway Control of Oxidative Phosphorylation by Temperature in the Heart. *Sci. reports*, 1-28.
- Lemieux, H., Bulteau, A., Friguet, B., Tardif, J., & Blier, P. U. (2011). Dietary fatty acids and oxidative stress in the heart mitochondria. *Mitochondrion*, 11(1), 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.07.014>
- Lemieux, H., Tardif, J.-C., Dutil, J.-D., & Blier, P. U. (2010). Thermal sensitivity of cardiac mitochondrial metabolism in an ectothermic species from a cold environment, Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 384(1-2), 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.12.007>
- Lenihan-Geels, G., Bishop, K. S., & Ferguson, L. R. (2013). Alternative sources of omega-3 fats: Can we find a sustainable substitute for fish? *Nutrients*, 5(4), 1301-1315. <https://doi.org/10.3390/nu5041301>
- Lepage, G., & Roy, C. C. (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.*, 25(12), 1391-6. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6530596>
- Lesnefsky, E. J., Chen, Q., & Hoppel, C. L. (2016). Mitochondrial Metabolism in Aging Heart. *Circ. Res.*, 118(10), 1593-1611. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.307505>
- Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.*, 68(3), 253-78. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
- Letts, J. A., Fiedorczuk, K., & Sazanov, L. A. (2016). The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature*, 537(7622), 644-648. <https://doi.org/10.1038/nature19774>
- Li, J., Gao, X., Qian, M., & Eaton, J. W. (2004). Mitochondrial metabolism underlies hyperoxic cell damage. *Free Radic. Biol. Med.*, 36(11), 1460-1470. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.005>

- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., ... Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging*, 13, 757-772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Lordan, S., Ross, R. P., & Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar. Drugs*, 9(6), 1056-100. <https://doi.org/10.3390/md9061056>
- Los, D. A., & Murata, N. (1998). Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.*, 1394(1), 3-15. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(98\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(98)00091-5)
- Lotz, C., Lin, A. J., Black, C. M., Zhang, J., Lau, E., Deng, N., ... Ping, P. (2014). Characterization, design, and function of the mitochondrial proteome: From organs to organisms. *J. Proteome Res.*, 13(2), 433-446. <https://doi.org/10.1021/pr400539j>
- Luber, G., & McGeehin, M. (2008). Climate Change and Extreme Heat Events. *Am. J. Prev. Med.*, 35(5), 429-435. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2008.08.021>
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.*, 101(1), 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Lushchak, V. I., & Bagnyukova, T. V. (2006). Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 143(1), 30-5. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.017>
- Madeira, C., Mendonça, V., Leal, M. C., Flores, A. A. V., Cabral, H. N., Diniz, M. S., & Vinagre, C. (2018). Environmental health assessment of warming coastal ecosystems in the tropics – Application of integrative physiological indices. *Sci. Total Environ.*, 643, 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.152>
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., & Vinagre, C. (2012). Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms. *J. Sea Res.*, 70, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2012.03.002>
- Madeira, D., Vinagre, C., & Diniz, M. S. (2016). Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. *Ecol. Indic.*, 63, 324-331. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.12.008>
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2015). A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. *Neuron*, 86(4), 883-901. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.035>
- Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G., & Genova, M. L. (2013). Mitochondrial Respiratory Supercomplex Association Limits Production of

- Reactive Oxygen Species from Complex I. *Antioxid. Redox Signal.*, *19*(13), 1469-1480. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4845>
- Marín-García, J., Akhmedov, A. T., & Moe, G. W. (2013). Mitochondria in heart failure: The emerging role of mitochondrial dynamics. *Heart Fail. Rev.*, *18*(4), 439-456. <https://doi.org/10.1007/s10741-012-9330-2>
- Martín-Fernández, B., & Gredilla, R. (2016). Mitochondria and oxidative stress in heart aging. *Age (Omaha)*, *38*(4), 225-238. <https://doi.org/10.1007/s11357-016-9933-y>
- Martin, N., Bureau, D. P., Marty, Y., Kraffe, E., & Guderley, H. (2013). Dietary lipid quality and mitochondrial membrane composition in trout: responses of membrane enzymes and oxidative capacities. *J. Comp. Physiol. B.*, *183*(3), 393-408. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0712-5>
- Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E., & Sanz, A. (2005). Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. *Rev. Fish Biol. Fish.*, *15*(1-2), 75-88. <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>
- Martinez-Rubio, L., Morais, S., Evensen, Ø., Wadsworth, S., Ruohonen, K., Vecino, J. L. G., ... Tocher, D. R. (2012). Functional feeds reduce heart inflammation and pathology in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) following experimental challenge with Atlantic salmon reovirus (ASRV). *PLoS One*, *7*(11), e40266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040266>
- Mathers, K. E., & Staples, J. F. (2015). Saponin-permeabilization is not a viable alternative to isolated mitochondria for assessing oxidative metabolism in hibernation. *Biol. Open*, *4*(7), 858-864. <https://doi.org/10.1242/bio.011544>
- Mattiasson, G. (2004). Flow cytometric analysis of isolated liver mitochondria to detect changes relevant to cell death. *Cytometry*, *60A*(2), 145-154. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20024>
- McKenzie, D. J., Higgs, D. A., Dosanjh, B. S., Deacon, G., & Randall, D. J. (1998). Dietary fatty acid composition influences swimming performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater. *Fish Physiol. Biochem.*, *19*(2), 111-122. <https://doi.org/10.1023/A:1007779619087>
- Medina, J. M., López-Mediavilla, C., & Orfao, A. (2002). Flow cytometry of isolated mitochondria during development and under some pathological conditions. *FEBS Lett.*, *510*(3), 127-132. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03260-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03260-4)
- Meyer, B. J., Byrne, M. K., Collier, C., Parletta, N., Crawford, D., Winberg, P. C., ... Grant, L. (2015). Baseline omega-3 index correlates with aggressive and attention deficit disorder behaviours in adult prisoners. *PLoS One*, *10*(3), 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120220>

- Moon, S. H., Liu, X., Cedars, A. M., Yang, K., Kiebish, M. A., Joseph, S. M., ... Gross, R. W. (2017). Heart failure-induced activation of phospholipase iPLA₂ γ generates hydroxyeicosatetraenoic acids opening the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.*, jbc.RA117.000405. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000405>
- Morgan, R., Finnøen, M. H., & Jutfelt, F. (2018). CTmax is repeatable and doesn't reduce growth in zebrafish. *Sci. Rep.*, 8(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25593-4>
- Morita, K., Fukuwaka, M. aki, Tanimata, N., & Yamamura, O. (2010). Size-dependent thermal preferences in a pelagic fish. *Oikos*, 119(8), 1265-1272. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.18125.x>
- Moro, K., Nagahashi, M., Ramanathan, R., Takabe, K., & Wakai, T. (2016). Resolvins and omega three polyunsaturated fatty acids: Clinical implications in inflammatory diseases and cancer. *World J. Clin. Cases*, 4(7), 155. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v4.i7.155>
- Munro, D., Banh, S., Sotiri, E., 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 Radic. Biol. Med.*, 96, 334-346. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.014>
- Munro, D., & Blier, P. U. (2012). The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. *Aging Cell*, 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00847.x>
- Munro, D., & Treberg, J. R. (2017). A radical shift in perspective: mitochondria as regulators of reactive oxygen species. *J. Exp. Biol., Online Mar*, 1170-1180. <https://doi.org/10.1242/jeb.132142>
- Murata, N., & Wadat, H. (1995). Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.*, 308, 1-8. <https://doi.org/10.1042/bj3080001>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.*, 417(1), 1-13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Murray, D. S., Hager, H., Tocher, D. R., & Kainz, M. J. (2014). Docosahexaenoic acid in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): The importance of dietary supply and physiological response during the entire growth period. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 181, 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.11.003>
- Murray, D. S., Hager, H., Tocher, D. R., & Kainz, M. J. (2014). Effect of partial replacement of dietary fish meal and oil by pumpkin kernel cake and rapeseed

- oil on fatty acid composition and metabolism in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.039>
- Navarrete, A., Van Schaik, C. P., & Isler, K. (2011). Energetics and the evolution of human brain size. *Nature*, *480*(7375), 91-93. <https://doi.org/10.1038/nature10629>
- Neubauer, S. (2007). The Failing Heart — An Engine Out of Fuel. *N. Engl. J. Med.*, *356*(11), 1140-1151. <https://doi.org/10.1056/NEJMra063052>
- Nigam, S., & Schewe, T. (2000). Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, *1488*(1-2), 167-81. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11080686>
- Norin, T., Clark, T. D., Building, G. K., Glasgow, G., & Norin, T. (2017). Fish face a trade-off between ' eating big ' for growth efficiency and ' eating small ' to retain aerobic capacity. *Biol. Lett.*, *13*, 3-6.
- Nyboer, E. A., & Chapman, L. J. (2018). Cardiac plasticity influences aerobic performance and thermal tolerance in a tropical, freshwater fish at elevated temperatures. *J. Exp. Biol.*, *221*(15), jeb178087. <https://doi.org/10.1242/jeb.178087>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.*, *358*, 351-358.
- Olsen, R. E., Løvaas, E., & Lie, Ø. (1999). The influence of temperature , dietary polyunsaturated fatty acids , α -tocopherol and spermine on fatty acid composition and indices of oxidative stress in juvenile Arctic char , *Salvelinus alpinus* (L .). *Fish Physiol. Biochem.*, *20*, 13-29.
- Olsen, R., & Henderson, R. J. (1997). Muscle fatty acid composition and oxidative stress indices of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), in relation to dietary polyunsaturated fatty acid levels and temperature. *Aquac. Nutr.*, *3*(4), 227-238. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1997.00091.x>
- Orr, W., & Sohal, R. S. (1992). The Effects of Catalase Gene Overexpression on Life Span and Resistance to Oxidative Stress in Transgenic *Drosophila melanogaster*. *Arch. Biochem. Biophys.*, *297*(1), 35-41.
- Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2005). Cardiolipin Oxidation Sets Cytochrome C Free. *Nat. Chem. Biol.*, *1*(4), 188-189. <https://doi.org/10.1038/nchembio0905-188>
- P Verberk, W. C. E., T Bilton, D., Calosi, P., & I Spicer, J. (2011). Oxygen supply in aquatic ectotherms: partial pressure and solubility together explain biodiversity and size patterns. *Ecology*, *92*(8), 1565-1572. Repéré à

<http://www.mendeley.com/research/oxygen-supply-aquatic-ectotherms-partial-pressure-solubility-together-explain-biodiversity-size-patterns/>

- Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 1837(4), 408-417. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.006>
- Parletta, N., Niyonsenga, T., & Duff, J. (2016). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid levels and correlations with symptoms in children with attention deficit hyperactivity disorder, autistic spectrum disorder and typically developing controls. *PLoS One*, 11(5), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156432>
- Patra, R. W., Chapman, J. C., Lim, R. P., & Gehrke, P. C. (2007). The Effects of Three Organic Chemicals on the Upper Thermal tolerances of four freshwater species. *Environ. Toxicol.*, 26(7), 1454-1459.
- Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., & Stanton, C. (2012). Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Nutr. Metab.*, 2012, 16. <https://doi.org/10.1155/2012/539426>
- Penney, C. M., Nash, G. W., Gamperl, A. K., & Tierney, K. (2014). Cardiorespiratory responses of seawater-acclimated adult Arctic char (*Salvelinus alpinus*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) to an acute temperature increase. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 71(7), 1096-1105. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2013-0569>
- Pereira, R. J., Barreto, F. S., & Burton, R. S. (2014). Ecological novelty by hybridization: experimental evidence for increased thermal tolerance by transgressive segregation in *tigriopus californicus*. *Evolution (N. Y.)*, 68(1), 204-215. <https://doi.org/10.1111/evo.12254>
- Picard, M., Taivassalo, T., Ritchie, D., Wright, K. J., Thomas, M. M., Romestaing, C., & Hepple, R. T. (2011). Mitochondrial structure and function are disrupted by standard Isolation methods. *PLoS One*, 6(3), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018317>
- Pichaud, N., Ekström, A., Hellgren, K., & Sandblom, E. (2017). Dynamic changes in cardiac mitochondrial metabolism during warm acclimation in rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, (February), jeb.152421. <https://doi.org/10.1242/jeb.152421>
- Pinheiro, J., Bates, D., Debroy, S., Sarkar, D., & R Core Team. (2014). Linear and Nonlinear Mixed Effects Models [R package nlme version 3.1-131]. Comprehensive R Archive Network (CRAN). Repéré à <https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>
- Poppe, T. T., Johansen, R., Gunnes, G., & Torud, B. (2003). Heart morphology in

wild and farmed Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ.*, 57(1/2), 103–108.

Pörtner, H.-O., Bock, C., & Mark, F. C. (2017). Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. *J. Exp. Biol.*, 220(15), 2685-2696. <https://doi.org/10.1242/jeb.134585>

Pörtner, H. O., & Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science (80-.)*, 315(5808), 95.

Portnoy, J., Raine, A., Liu, J., & Hibbeln, J. R. (2018). Reductions of intimate partner violence resulting from supplementing children with omega-3 fatty acids: A randomized, double-blind, placebo-controlled, stratified, parallel-group trial. *Aggress. Behav.*, 44(5), 491-500. <https://doi.org/10.1002/ab.21769>

Qian, L., Song, X., Ren, H., Gong, J., & Cheng, S. (2004). Mitochondrial mechanism of heat stress-induced injury in rat cardiomyocyte. *Cell Stress Chaperones*, 9(3), 281-93. <https://doi.org/10.1379/CSC-20R.1>

Quinlan, C. L., Perevoschikova, I. V, Goncalves, R. L. S., Hey-mogensen, M., & Brand, M. D. (2013). *The Determination and Analysis of Site-Specific Rates of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. Hydrog. Peroxide Cell Signal. Part A* (1^{re} éd., Vol. 526). (S.I.) : Copyright © 2013 Elsevier, Inc. All rights reserved. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405883-5.00012-0>

Rasmussen, H. N., & Rasmussen, U. F. (2003). Oxygen solubilities of media used in electrochemical respiration measurements. *Anal. Biochem.*, 319(1), 105-113. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00274-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00274-4)

Ricciotti, P. E., & FitzGerald, G. A. (2012). Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 31(5), 986-1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449.Prostaglandins>

Richards, M. P., Pettitt, P. B., Stiner, M. C., & Trinkaus, E. (2001). Stable isotope evidence for increasing dietary breadth in the European mid-Upper Paleolithic. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98(11), 6528-6532. <https://doi.org/10.1073/pnas.111155298>

Risso-De Faverney, C., Orsini, N., De Sousa, G., & Rahmani, R. (2004). Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: Involvement of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.*, 69(3), 247-258. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.05.011>

Rodnick, K. J., Gamperl, a K., Nash, G. W., & Syme, D. a. (2014). Temperature and sex dependent effects on cardiac mitochondrial metabolism in Atlantic cod (*Gadus morhua*L.). *J. Therm. Biol.*, 44, 110-8. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.02.012>

- Rodríguez-Cruz, M., & Serna, D. S. (2017). Nutrigenomics of ω -3 fatty acids: Regulators of the master transcription factors. *Nutrition*, *41*, 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.04.012>
- Rosca, M. G., Vazquez, E. J., Kerner, J., Parland, W., Chandler, M. P., Stanley, W., ... Hoppel, C. L. (2008). Cardiac mitochondria in heart failure: Decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc. Res.*, *80*(1), 30-39. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn184>
- Roze, T., Christen, F., Amerand, A., & Claireaux, G. (2013). Trade-off between thermal sensitivity, hypoxia tolerance and growth in fish. *J. Therm. Biol.*, *38*(2), 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.12.001>
- Ruff, C. B., Trinkaus, E., & Holliday, T. W. (1997). Body mass and encephalization in Pleistocene Homo. *Nature*, *387*(6629), 173-176. <https://doi.org/10.1038/387173a0>
- Said, H., Lashkarbolouki, T., & Abrari, K. (2014). Chronic administration of quercetin prevent spatial learning and memory deficits provoked by chronic stress in rats. *Behav. Brain Res.*, *270*, 196-205. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.015>
- Santulli, G., Xie, W., Reiken, S. R., & Marks, A. R. (2015). Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *1513047112*-. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513047112>
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., & Estevez, A. (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, *177*(1-4), 191-199. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00083-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00083-6)
- Scialò, F., Fernández-Ayala, D. J., & Sanz, A. (2017). Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. *Front. Physiol.*, *8*(June), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00428>
- Scott, W. B., & Crossman, E. J. (1973). Freshwater fishes of Canada. *Bull. Fish. Res. Board Canada*, *184*, 148-154. <https://doi.org/10.1111/j.1540-5834.2012.00693.x>
- Seebacher, F., Brand, M. D., Else, P. L., Guderley, H., Hulbert, A. J., & Moyes, C. D. (2010). Plasticity of Oxidative Metabolism in Variable Climates: Molecular Mechanisms. *Physiol. Biochem. Zool.*, *85*(5), 721-732. <https://doi.org/10.1086/649964>
- Serbinova, E., Kagan, V., Han, D., & Packer, L. (1991). Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radic. Biol. Med.*, *10*(5), 263-275. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90033-Y](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90033-Y)

- Serhan, C. N., & Petasis, N. A. (2011). Resolvins and Protectins in Inflammation-Resolution. *Chem. Rev.*, *111*, 5922-5943.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.10.017.A>
- Shadel, G. S., & Horvath, T. L. (2015). Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell*, *163*(3), 560-569. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.001>
- Sidell, B. D., Crockett, E. L., & Driedzic, W. R. (1995). Antarctic Fish Tissues Preferentially Catabolize Monoenoic Fatty Acids. *J. Exp. Zool.*, *81*, 73-81.
- Simopoulos, A. P. (2001). Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids*, *60*(5-6), 421-9.
[https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(99\)80023-4](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(99)80023-4)
- Simopoulos, A. P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.*, *21*(6), 495-505. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12480795>
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.*, *56*(8), 365-379.
[https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00253-6)
- Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed. Pharmacother.*, *60*(9), 502-507. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.07.080>
- Simopoulos, A. P. (2008). The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Exp. Biol. Med.*, *233*(6), 674-688. <https://doi.org/10.3181/0711-MR-311>
- Slaninová, A., Smutna, M., Modra, H., & Svobodova, Z. (2009). A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinol. Lett.*
<https://doi.org/NEL300709R01> [pii]
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A., Gartner, F. H., Frovenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.*, *85*, 76-85.
- Somero, G. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *J. Exp. Biol.*, *213*(6), 912-920.
- Somero, G. N. (2002). Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integr. Comp. Biol.*, *42*(4), 780-9.
<https://doi.org/10.1093/icb/42.4.780>
- Song, C., Shieh, C. H., Wu, Y. S., Kalueff, A., Gaikwad, S., & Su, K. P. (2016). The

role of omega-3 polyunsaturated fatty acids eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the treatment of major depression and Alzheimer's disease: Acting separately or synergistically? *Prog. Lipid Res.*, 62, 41-54.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.12.003>

Soxhlet, F. (1879). Soxhlet, über gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Polytech. J.*, 232. Repéré à <http://dingler.culture.hu-berlin.de/article/pj232/ar232136>

Speakman, J. R., & Garratt, M. (2014). Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model. *BioEssays*, 36(1), 93-106.
<https://doi.org/10.1002/bies.201300108>

Stéphan, G., Guillaume, J., & Lamoura, F. (1995). Lipid peroxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) tissue : effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 130, 251-268.

Stubbs, C., & Smith, A. (1984). The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane and function. *Biochim. Biophys. Acta*, 779, 89-137. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(84\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0304-4157(84)90005-4)

Stubhaug, I., Lie, & Torstensen, B. E. (2007). Fatty acid productive value and β -oxidation capacity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on different lipid sources along the whole growth period. *Aquac. Nutr.*, 13(2), 145-155.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00462.x>

Sunday, J. M., Bates, A. E., & Dulvy, N. K. (2012). Thermal tolerance and the global redistribution of animals. *Nat. Clim. Chang.*, 2(9), 686-690.
<https://doi.org/10.1038/nclimate1539>

Susman, R. L. (1994). Fossil Evidence for Early Hominid Tool Use. *Science* (80-), 265(5178), 1570-1573.

Sutton, J., Balfry, S., Higgs, D., Huang, C.-H., & Skura, B. (2006). Impact of iron-catalyzed dietary lipid peroxidation on growth performance, general health and flesh proximate and fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in seawater. *Aquaculture*, 257(1-4), 534-557.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.013>

Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2015). Feed matters: Satisfying the feed demand of aquaculture. *Rev. Fish. Sci. Aquac.*, 23(1), 1-10.
<https://doi.org/10.1080/23308249.2014.987209>

Tai, C. C., & Ding, S. T. (2010). N-3 polyunsaturated fatty acids regulate lipid metabolism through several inflammation mediators: mechanisms and implications for obesity prevention. *J. Nutr. Biochem.*, 21(5), 357-363.

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.09.010>

- Takeuchi, T., Shiina, Y., Watanabe, T., Sekiya, S., & Imaizumi, K. (1992). Suitable Levels of n-3 Highly Unsaturated Fatty in Diet for Fingerlings of Yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(7), 1341-1346.
- Thomas, J., Thomas, C. J., Radcliffe, J., & Itsiopoulos, C. (2015). Omega-3 Fatty Acids in Early Prevention of Inflammatory Neurodegenerative Disease : A Focus on Alzheimer ' s Disease. *Biomed Res. Int.*, 2015, 1-13.
- Tocher, D. (2003). Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Rev. Fish. Sci.*, 11, 107-184. Repéré à <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/713610925>
- Tocher, D., Mourente, G., Eecken, A. Van Der, Evjemo, J., Diaz, E., Bell, J. G., ... Olsen, Y. (2002). Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L. *Aquac. ...*, 8, 195-207. Repéré à <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2095.2002.00205.x/full>
- Tocher, D. R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac. Res.*, 41(5), 717-732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x>
- Tocher, D. R. (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, 449, 94-107. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.010>
- Tocher, D. R., Mourente, G., Eecken, A. Van Der, Evjemo, J. O., & Diaz, E. (2003). Comparative study of antioxidant defence mechanisms in marine fish fed variable levels of oxidised oil and vitamin E. *Aquaculture*, 11, 1-27. Repéré à <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1024127003997>
- Tosi, F., Sartori, F., Guarini, P., Olivieri, O., & Martinelli, N. (2014). Delta-5 and Delta-6 Desaturases: Crucial Enzymes in Polyunsaturated Fatty Acid- Related Pathways with Pleiotropic Influences in Health and Disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 824, 61-81. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-07320-0>
- Tsudoku, T., Ph, D., Honma, T., Sc, M., Nakagawa, K., Ph, D., ... Ph, D. (2011). Long-term intake of fish oil increases oxidative stress and decreases lifespan in senescence-accelerated mice. *Nutrition*, 27(3), 334-337. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.05.017>
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E., & Ng, W. K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquac.*, 1(1), 10-57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>

- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 552, 335-44. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Turrens, J. F., Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 217(2), 411-421. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90519-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90519-7)
- Upchurch, R. G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol. Lett.*, 30(6), 967-977. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9639-z>
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., & Veksler, V. (2004). Energy metabolism in heart failure. *J Physiol*, 555(Pt 1), 1-13. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.055095>
- Verberk, W. C. E. P., Bilton, D. T., Calosi, P., & Spicer, J. I. (2011). Oxygen supply in aquatic ectotherms: Partial pressure and solubility together explain biodiversity and size patterns. *Ecology*, 81(4), 1565-1572. <https://doi.org/10.2307/23143908>
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., & Diniz, M. (2012). Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecol. Indic.*, 23, 274-279. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.04.009>
- Vinothkumar, K. R., Zhu, J., & Hirst, J. (2014). Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 515(7525), 80-84. <https://doi.org/10.1038/nature13686>. Architecture
- Vornanen, M., Haverinen, J., & Egginton, S. (2014). Acute heat tolerance of cardiac excitation in the brown trout (*Salmo trutta fario*). *Clin. Cancer Res.*, 217(2), 299-309. <https://doi.org/10.1242/jeb.091272>
- Wagner, G. N., Balfry, S. K., Higgs, D. A., Lall, S. P., & Farrell, A. P. (2004). Dietary fatty acid composition affects the repeat swimming performance of Atlantic salmon in seawater. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, 137(3), 567-576. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2003.11.005>
- Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2010a). Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr. Rev.*, 68(5), 280-9. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00287.x>
- Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2010b). Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr. Rev.*, 68(5), 280-9. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00287.x>
- Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2010c). Fatty acids from fish: The anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr. Rev.*, 68(5), 280-289. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00287.x>

- Wang, C., & Harris, W. (2006). n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary-and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.*, *84*, 5-17. Repéré à <http://ajcn.nutrition.org/content/84/1/5.short>
- Wang, S. W., Hollmén, T. E., & Iverson, S. J. (2010). Validating quantitative fatty acid signature analysis to estimate diets of spectacled and Steller's eiders (*Somateria fischeri* and *Polysticta stelleri*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.*, *180*(1), 125-139. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0393-x>
- Welker, T. L., & Congleton, J. L. (2003). Relationship between dietary lipid source, oxidative stress, and the physiological response to stress in sub-yearling chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Fish Physiol. Biochem.*, *29*, 225-235.
- Willett, C. S. (2010). Potential fitness trade-offs for thermal tolerance in the intertidal copepod *Tigriopus californicus*. *Evolution (N. Y.)*, *64*(9), 2521-2534. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01008.x>
- Worm, B., Hilborn, R., Baum, J. K., Branch, T. A., Collie, J. S., Costello, C., ... Zeller, D. (2009). Rebuilding global fisheries. *Science*, *325*(5940), 578-85. <https://doi.org/10.1126/science.1173146>
- Wu, C., Yan, L., Depre, C., Dhar, S. K., Shen, Y.-T., Sadoshima, J., ... Vatner, D. E. (2009). Cytochrome c oxidase III as a mechanism for apoptosis in heart failure following myocardial infarction. *AJP Cell Physiol.*, *297*(4), C928-C934. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00045.2009>
- Yang, X. W., & Dick, T. (1994). Arctic Char (*Salvelinus Alpinus*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Differ in Their Growth and Lipid Metabolism in Response to Dietary Polyunsaturated Fatty Acids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, *51*(6), 1391-1400.
- Yashodhara, B. M., Umakanth, S., Pappachan, J. M., Bhat, S. K., Kamath, R., & Choo, B. H. (2009). Omega-3 fatty acids: A comprehensive review of their role in health and disease. *Postgrad. Med. J.*, *85*(1000), 84-90. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2008.073338>
- Ye, Q., Zheng, D., Liu, L., & Hong, L. (2011). Rapid analysis of aldehydes by simultaneous microextraction and derivatization followed by GC-MS. *J. Sep. Sci.*, *34*(13), 1607-1612. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100145>
- Zelzer, S., Oberreither, R., Bernecker, C., Stelzer, I., Truschnig-Wilders, M., & Fauler, G. (2013). Measurement of total and free malondialdehyde by gas-chromatography mass spectrometry-comparison with high-performance liquid chromatography methodology. *Free Radic. Res.*, *47*(8), 651-656. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.812205>

- Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., & Haugland, R. P. (1997). A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. *Anal. Biochem.*, 253(253), 162-168. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2391>
- Zukiene, R., Nauciene, Z., Ciapaite, J., & Mildaz, V. (2010). Acute temperature resistance threshold in heart mitochondria : Febrile temperature activates function but exceeding it collapses the membrane barrier. *Int. J.*, 26(February), 56-66. <https://doi.org/10.3109/02656730903262140>

