



Université du Québec
à Rimouski

Fonctions mitochondriales et profils lipidiques cardiaques chez l'épinoche à trois épines

Un aperçu des limites physiologiques associées à la tolérance thermique

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en biologie

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

PAR

© **Simon Chouinard-Boisvert**

Décembre 2023

Composition du jury :

David Deslauriers, président du jury, Université du Québec à Rimouski-ISMER

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

France Dufresne, codirectrice de recherche, Université du Québec à Rimouski

Felix Christen, examinateur externe, Laboratoires Iso-BioKem

Dépôt initial le 12 juillet 2023

Dépôt final le 13 décembre 2023

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 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

Je remercie tout d'abord Pierre Blier, mon directeur, pour m'avoir donné l'occasion de participer à un super projet et d'avoir toujours su raviver et entretenir ma flamme pour mon sujet de maîtrise lorsqu'elle semblait s'affaiblir. Je remercie toutes et tous mes collègues du laboratoire qui m'ont assisté lors des manipulations et de la mise au point des analyses. Un merci tout particulier à Véro, Amé, Léo et Mathieu ! Je remercie également le Réseau Québec Maritime (RQM) pour avoir fourni le financement nécessaire au projet et à ma subsistance lors de ces trois dernières années.

RÉSUMÉ

Chez les ectothermes, le bon fonctionnement des processus biologiques est hautement dépendant de la température du milieu de vie. Des variations thermiques dépassant la gamme de température optimale propre à ces organismes risque ainsi d'engendrer des difficultés majeures chez certaines espèces, particulièrement en milieu aquatique. Selon les prédictions actuelles, les prochaines années verront la fréquence et l'intensité des vagues de chaleur augmenter, ce qui risque de modifier les dynamiques dans de nombreux écosystèmes. Dans ce contexte, il devient crucial de caractériser les déterminants physiologiques associés à la sensibilité thermique chez les ectothermes aquatiques. Des études sur le sujet ont démontré que chez les poissons, le cœur semble être l'un des premiers organes à défaillir en situation de stress thermique. Le présent mémoire se fonde sur l'hypothèse que les limites thermiques des ectothermes sont dictées par celles de leurs mitochondries cardiaques. Pour tester cette idée, la tolérance thermique de deux écotypes d'épinoches à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*), l'un issu d'un milieu estuarien et l'autre d'un milieu lacustre, a été évaluée à l'aide du test du CTmax. La consommation d'oxygène des mitochondries cardiaques sous plusieurs stades respiratoires a ensuite été mesurée à l'aide de respiromètres à haute résolution, et ce à trois températures, soit 10°C, 20°C et 30°C. De manière à tester si la composition en acides gras des membranes cardiaques pourrait elle aussi influencer la tolérance thermique, les profils lipidiques des cœurs d'épinoches ont été dressés par chromatographie en phase gazeuse. La population estuarienne a démontré une meilleure performance lors du test de CTmax que celle du milieu lacustre, toutefois cette différence n'a pas pu être expliquée par des variations au niveau de la consommation d'oxygène des mitochondries cardiaques. De plus, malgré des différences significatives dans les profils d'acides gras entre les deux écotypes, la tolérance thermique des épinoches n'a pas démontré de corrélation forte avec la composition lipidique des membranes cardiaques. En revanche, la respiration mitochondriale était hautement dépendante de la température expérimentale et une chute de la respiration de stade 3 a été observée à 30°C. Nos résultats permettent d'avancer que le Complexe I du système de transport des électrons semble être un élément limitant majeur de la respiration mitochondriale à haute température, suggérant ainsi qu'il pourrait être un déterminant clé de la tolérance thermique chez l'épinoche.

Mots clés : Limites thermiques, poissons, respiration mitochondriale, cœur, acides gras membranaires

ABSTRACT

In ectotherms, proper functioning of many key biological processes can be heavily influenced by the surrounding temperature. Thermal variations surpassing organism's optimal temperature range may therefore greatly affect the survival of many species, especially in aquatic environments. According to recent predictions, the future will bring heat waves of increasing frequency and intensity, which will surely impact ecosystem dynamics. Considering this, it is crucial for scientists to identify physiological determinants associated with ectotherms' thermal tolerance. Previous studies have shown that, in fish, heart failure often seems to be among the first major consequences of heat stress. The hypothesis behind the present master's thesis therefore suggests that ectotherm's thermal limits are dictated by that of their cardiac mitochondria. To test this hypothesis, thermal tolerance of two three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) ecotypes, the first one originating from an estuarine environment and the second one from a lacustrine environment, was evaluated by CTmax performance tests. Cardiac mitochondrial oxygen consumption during standard respiratory states was then measured by high resolution respirometry at three assay temperatures, namely 10°C, 20°C and 30°C. We also tested whether sticklebacks' heart fatty acid composition could influence their thermal tolerance by analysing lipid profiles, which was performed by gas chromatography. Estuarine fish showed a better performance during CTmax tests than lacustrine fish, but this difference could not be explained by variations at the level of cardiac mitochondrial oxygen consumption. Furthermore, despite significant differences in lipid profiles between both ecotypes, stickleback's thermal tolerance did not strongly correlate with heart fatty acid composition. On the other hand, mitochondrial respiration was strongly dependant on experimental temperature, and we observed a significant drop of state 3 respiration at 30°C. Our results suggests that Complex I of the electron transport system is a major limiting factor of mitochondrial respiration at high temperatures, which would make it a key determinant in sticklebacks' thermal tolerance.

Keywords: Thermal limits, fish, mitochondrial respiration, heart, membranes fatty acids

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	vii
RÉSUMÉ.....	ix
ABSTRACT.....	xi
TABLE DES MATIÈRES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES FIGURES.....	xix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xxi
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1. THERMOSENSIBILITÉ CHEZ LES ECTOTHERMES.....	1
2. PHYSIOLOGIE DES LIMITES THERMIQUES.....	2
2.1 Le système cardiovasculaire.....	2
2.2 La mitochondrie.....	4
3. ÉCOTYPES ET ADAPTATIONS MITOCHONDRIALES.....	12
3.1 Le cas de l'épinoche à trois épines.....	12
4. OBJECTIFS, HYPOTHÈSES ET PRÉDICTIONS.....	14
5. MÉTHODOLOGIE.....	15
5.1 Test du CTmax.....	15
5.2 Extraction lipidique.....	16
5.3 Respirométrie à haute résolution.....	16
CHAPITRE 1 Fonctions mitochondriales et profils lipidiques cardiaques chez l'Épinoche À trois Épines : Un aperçu des limites physiologiques associées à la tolérance thermique.....	21
1.1 RÉSUMÉ.....	21

1.2	CARDIAC MITOCHONDRIAL FUNCTIONS AND LIPID PROFILES IN THREE-SPINED STICKLEBACKS: AN INSIGHT INTO PHYSIOLOGICAL LIMITATIONS ASSOCIATED WITH THERMAL TOLERANCE.....	23
1.3	ABSTRACT.....	23
1.4	INTRODUCTION.....	24
1.5	MATERIAL AND METHODS.....	29
1.5.1	Population sampling and fish housing.....	29
1.5.2	Critical thermal maximum (CTmax) test.....	30
1.5.3	Fatty acid methyl esters (FAME) extraction and gas chromatography.....	31
1.5.4	Heart homogenate preparation.....	33
1.5.5	High resolution respirometry.....	33
1.5.6	Statistical analysis.....	34
1.6	RESULTS.....	35
1.6.1	CTmax and heart lipid profiles.....	35
1.6.2	Mitochondrial thermal tolerance.....	38
1.7	DISCUSSION.....	42
1.7.1	Thermal tolerance variations between stickleback ecotypes.....	43
1.7.2	Thermal sensitivity of mitochondrial respiratory pathways.....	46
1.8	CONCLUSION.....	49
	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	52
	ANNEXE 1.....	57
	ANNEXE 2.....	58
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	61

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. CTmax, time to reach CTmax and fish length in two populations of three-spined sticklebacks.....	36
Table 2. Heart fatty acid composition in two populations of three-spined sticklebacks.	37
Table 3. Temperature sensitivity of oxygen consumption in sticklebacks' heart homogenates, in the form of Q ₁₀ values.....	41

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation des principales voies d'action du métabolisme mitochondrial.	5
Figure 2. Exemple d'un protocole SUIIT utilisé dans le présent mémoire sur un homogénat de cœur d'épinoche à trois épines.	18
Figure 3. Three-spined sticklebacks sampling locations.	30
Figure 4. Oxygen consumption in three-spined sticklebacks' heart homogenates at three assay temperatures.....	39
Figure 5. COX respiration in three-spined sticklebacks' heart homogenates at three assay temperatures.....	40
Figure 6. Respective control of PM_P , S_P and PMS_P over PMS_E respiration.....	42

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ARA	Acide arachidonique
BS	Épinoches à trois épines d'eau saumâtre (Brackish water sticklebacks)
CI	Complexe I du système de transport des électrons
CII	Complexe II du système de transport des électrons
CIII	Complexe III du système de transport des électrons
COX	Complexe IV du système de transport des électrons, Cytochrome c oxydase
CT_{max}	Maximum thermique critique
DHA	Acide docosahexaénoïque
DPA	Acide docosapentaénoïque
DRO / ROS	Dérivé réactif de l'oxygène / Reactive oxygen species
EPA	Acide eicosapentaénoïque
FAME	Ester méthylique d'acide gras
FCCP	Carbonyl cyanide <i>p</i> -trifluoro-methoxyphenyl hydrazone
FS	Épinoches à trois épines d'eau douce (Freshwater sticklebacks)
GC	Chromatographie en phase gazeuse
OXPHOS	Phosphorylation oxydative

PI	Indice de peroxydation
PM_L	Respiration mitochondriale en LEAK supportée par le Complexe I
PM_P	Respiration mitochondriale en phosphorylation oxydative supportée par le Complexe I
PMS_E	Respiration mitochondriale maximale découplée supportée par les Complexes I et II
PMS_P	Respiration mitochondriale en phosphorylation oxydative supportée par les Complexes I et II
PUFA	Acide gras polyinsaturé
S_P	Respiration mitochondriale en phosphorylation oxydative supportée par le Complexe II
STE / ETS	Système de transport des électrons / Electron transport system
TCA	Cycle de l'acide tricarboxylique
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine dihydrochloride

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. THERMOSENSIBILITÉ CHEZ LES ECTOTHERMES

Les préférences d'occupation du territoire par les espèces vivantes sont sujettes à l'influence de multiples facteurs. Généralement, les organismes se répartissent de manière à avoir accès à des ressources particulières, en fonction des limites physiques associées à la géomorphologie du terrain et dans l'optique d'éviter les prédateurs (Campan et Scapini, 2002). Plusieurs paramètres physico-chimiques peuvent aussi influencer la capacité des organismes à occuper certains milieux en affectant directement l'homéostasie des systèmes physiologiques. C'est tout particulièrement le cas de la température. En effet, les principes fondamentaux de la thermodynamique impliquent un lien étroit entre le métabolisme des organismes et la température (Qian et Beard, 2005). La cinétique des enzymes impliquées dans le bon fonctionnement des réactions biochimiques est entre autres fortement dépendante de ce paramètre (Gillooly et al., 2001 ; Clarke et Fraser, 2004). Un grand nombre de processus biologiques essentiels tels que la croissance, la reproduction et l'alimentation dépendent de l'énergie fournie par le métabolisme mitochondrial et sont donc indirectement affectés par des variations thermiques (Brown et al., 2004). Pour cette raison, les organismes tendent à se répartir selon différents gradients de températures associés à la latitude ou encore à l'altitude, et ce de manière à occuper les niches thermiques qui leur sont le plus favorables (Prosser et Heath, 1991 ; Hochachka et Somero, 2002). Au fil de l'évolution, des stratégies de vie et des systèmes physiologiques plus perfectionnés les uns que les autres ont été développés chez différentes espèces pour leur permettre de prospérer dans des gammes de température très variables.

Les endothermes, par le biais de procédés métaboliques particuliers, ont la capacité de produire eux-mêmes leur chaleur corporelle. D'un autre côté, la température interne des ectothermes est plutôt dictée par celle de leur milieu. Pour la plupart de ces organismes et particulièrement chez les ectothermes aquatiques (Hochachka et Somero, 2002 ; Pinsky et al., 2019), il est beaucoup plus difficile de pallier une augmentation de température environnementale. Les ectothermes exposés à des variations thermiques du milieu n'ont généralement que deux options pour éviter de potentiels effets néfastes sur leur survie. Ils devront s'acclimater ou migrer vers de nouveaux écosystèmes plus favorables (Chevin et al., 2010 ; Rahel et al., 2008). Toutefois, ces options ne sont pas toujours réalistes et compte tenu des prédictions actuelles associées aux changements climatiques indiquant de potentielles hausses de températures dans plusieurs milieux (IPCC, 2021), les organismes ectothermes vivant déjà près de leur limite thermique se retrouveront en situation critique. Au niveau physiologique, les impacts d'une augmentation importante de température ne sont pas encore parfaitement compris. Dans une optique où les changements globaux feraient augmenter l'intensité et la fréquence des vagues de chaleur (Stillman, 2019), il est crucial d'établir quels sont les traits physiologiques responsables de la susceptibilité et de l'établissement des seuils de tolérance thermique chez les ectothermes aquatiques.

2. PHYSIOLOGIE DES LIMITES THERMIQUES

2.1 Le système cardiovasculaire

Les études sur la tolérance thermique ont mis en lumière le rôle central du système cardiovasculaire dans la détermination des limites thermiques chez les ectothermes (Farrell, 1997, 2002 ; Hilton et al., 2010). Lors d'une hausse de température, l'accélération du métabolisme implique une augmentation drastique de la demande énergétique des tissus. La majorité de la production d'énergie dans le corps et particulièrement dans le cœur est régulée par les mitochondries lors de la phosphorylation oxydative, ces dernières occupant près de

40% du volume des cellules cardiaques (Page et McCallister, 1973 ; Neely et Morgan, 1974 ; Harris et Das, 1991). Ce procédé métabolique utilise l'oxygène comme accepteur final d'électron, permettant ultimement l'activation du complexe enzymatique ATP synthase. L'ADP y est alors transformée en ATP, soit la principale source d'énergie utilisable lors des réactions métaboliques. Chez les poissons et chez d'autres ectothermes aquatiques, le cœur semble être l'un des premiers organes à défaillir lors d'une exposition à des températures élevées (Somero, 2005 ; Iftikar et Hickey, 2013). Lors d'insuffisance cardiaque, le transport de l'oxygène par le sang est interrompu et la demande énergétique élevée des tissus ne peut être satisfaite. Les causes physiologiques derrière les défaillances cardiaques associées à une hausse de température sont encore débattues à ce jour, il s'agit alors d'une cible de recherche particulièrement importante pour quiconque s'intéresse à identifier les facteurs déterminant les limites thermiques des ectothermes.

Pour certains, la clé de ce questionnement se trouve au niveau de la gestion du transport de l'oxygène. Dans les 20 dernières années, H. O. Pörtner et son équipe se sont penchés sur cette idée pour formuler l'hypothèse de l'*Oxygen and capacity-limited thermal tolerance* (OCLTT) (Pörtner, 2001 ; Pörtner et Knust, 2007 ; Pörtner et al., 2017). Cette hypothèse suggère que les limites thermiques qu'un organisme peut supporter sont dictées par la capacité du système circulatoire à approvisionner les tissus en oxygène. Lors d'une augmentation de température, une baisse de solubilité de l'oxygène accompagnée d'une hausse de sa demande causent une hypoxie et une mobilisation du métabolisme anaérobie, ce qui ultimement résulte en une baisse du rendement en ATP. Selon l'OCLTT, cette limitation en oxygène serait la première et la plus importante barrière rencontrée par les organismes lors d'une augmentation de température (Pörtner, 2001). Une carence en oxygène et donc en ATP dans le cœur impacte directement la capacité du muscle cardiaque à exercer les contractions nécessaires au pompage du sang. Une telle contrainte exercée sur cet organe essentiel, dans une situation de stress thermique où il doit fonctionner à pleine capacité, pourrait en partie expliquer les insuffisances cardiaques observées chez plusieurs organismes.

2.2 La mitochondrie

Un autre angle d'approche intéressant, et qui sera celui poursuivi dans le présent mémoire, suggère que les dysfonctionnements mitochondriaux sont fortement impliqués dans l'établissement des limites thermiques chez les ectothermes (Hilton et al., 2010 ; Iftikar et Hickey, 2013 ; Blier et al., 2014 ; Iftikar et al., 2014). Selon cette hypothèse, la tolérance thermique des organismes serait directement liée à celle des différentes composantes de leurs mitochondries. Pour comprendre les fondements de cette hypothèse, il faut revenir aux bases de la bioénergétique mitochondriale (figure 1). Le catabolisme des glucides, protéines et lipides fournit à la mitochondrie les électrons nécessaires à la phosphorylation oxydative, permettant ainsi la production d'ATP dans le corps (Nicholls et Ferguson, 2013 ; Nelson et al., 2021). Ce procédé complexe nécessite une bonne intégrité de la double membrane mitochondriale et des différentes enzymes qui s'y retrouvent. Les électrons extraits lors du catabolisme des macromolécules mènent à la formation d'équivalents réducteurs (NADH et FADH₂) et passent ensuite dans une série de complexes enzymatiques formant le système de transport des électrons (STE). Les complexes sont des pompes à protons (H⁺) qui transfèrent ces charges positives vers l'espace intermembranaire (Nicholls et Ferguson, 2013). L'imperméabilité de la membrane aux protons empêche alors la sortie de ces derniers par voie passive, créant un gradient électrochimique. C'est finalement grâce à l'énergie accumulée dans ce gradient de protons que la dernière enzyme du STE, l'ATP synthase, peut transformer l'ADP en ATP (Nicholls et Ferguson, 2013).

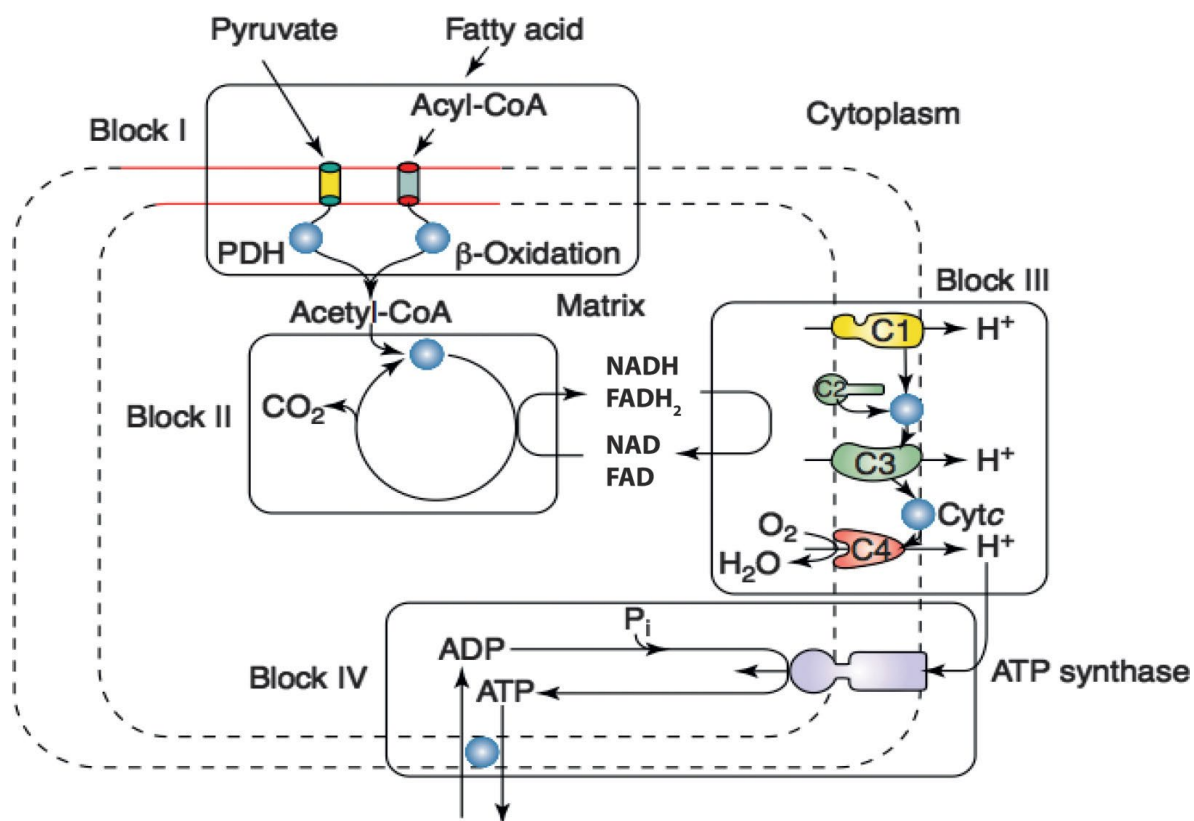


Figure 1. Représentation des principales voies d'action du métabolisme mitochondrial. Il est possible d'y observer l'entrée des substrats et leur oxydation au niveau du *Block I*, menant à la formation des équivalents réducteurs au niveau du *Block II*. Les différents complexes du système de transport des électrons (*Block III*) permettent alors la création d'un gradient électrochimique qui sera par la suite utilisé par l'ATP synthase pour la production d'énergie (*Block IV*). Figure tirée de Blier et al., 2001

Une perte d'intégrité et une accumulation de dysfonctionnements dans les différentes composantes de la mitochondrie ont alors de fortes chances de limiter la capacité de cet organe à produire l'énergie nécessaire au bon fonctionnement cardiaque, et en particulier lors d'une accélération du métabolisme causée par une hausse de température (voir annexe 1). Une bonne façon d'observer l'impact d'un stress thermique sur la phosphorylation oxydative est de mesurer la consommation d'oxygène des tissus ou des mitochondries à différentes températures. De manière générale, la consommation d'oxygène augmente avec la température jusqu'à l'atteinte d'un plateau ou jusqu'à une diminution drastique de la

respiration (Blier et al., 2014). Chez l'omble chevalier, il a été observé que ce point d'inflexion dans la consommation d'oxygène des mitochondries cardiaques survient à une température très proche de celle où les individus subissent un effondrement de leur homéostasie générale (Christen et al., 2018). Cette observation supporte la proposition que la limite thermique des mitochondries cardiaques pourrait bien dicter celle de l'organisme entier.

2.2.1 Bioénergétique mitochondriale

Compte tenu de la complexité du processus bioénergétique de la mitochondrie et du nombre important d'enzymes impliqué, il devient parfois difficile de déterminer exactement quels éléments sont limitants en situation de stress thermique. Chaque pièce de cet ensemble possède son propre niveau de tolérance thermique et réagit de manière différente lorsque exposé à des variations importantes de température (Blier et al., 2014). De manière générale, la phosphorylation oxydative peut être limitée par des dysfonctionnements au sein même du STE et des membranes mitochondriales, ou par des facteurs en amont au niveau de l'oxydation et du transport des substrats (Blier et al., 2014 ; Chung et Schulte, 2020).

Une façon d'agir en amont du système pour compenser l'effet de la température est de faire varier l'activité d'enzymes clés impliquées dans le cycle de Krebs. C'est grâce à l'action de ces enzymes que les métabolites nécessaires à la phosphorylation oxydative (i.e., NADH) sont produits et alimentent le STE. Cet approvisionnement en électrons semble limitant lors d'une exposition à des températures faibles (Pichaud et al., 2011). Par exemple, certaines études ont souligné le rôle du complexe enzymatique pyruvate déshydrogénase dans la tolérance au froid (Lemieux et al., 2010a ; Lemieux et al., 2010b). Cette enzyme utilise le pyruvate pour générer de l'acétyl-CoA (ainsi que du NADH), qui est l'un des principaux intermédiaires de la respiration cellulaire. Les études de Lemieux et al. (2010a ; 2010b) ont permis d'observer que chez une espèce de poissons d'eau froide, l'activité de la pyruvate déshydrogénase est significativement supérieure à celle observée chez le rat, un endotherme

de milieu tempéré. Ceci porte à croire que cette enzyme pourrait avoir été la cible d'une adaptation chez l'espèce de milieu froid, lui permettant d'éviter un débalancement au niveau de l'entrée des substrats vers les mitochondries (Blier et al., 2014).

Chez les poissons exposés à une augmentation importante de température, la limitation semble également se trouver au niveau de la perte de fonctionnalité des mitochondries (Iftikar et Hickey, 2013 ; Lemieux et al., 2010b ; Christen et al., 2018 ; Michaelsen et al., 2021). Un signe physiologique appuyant cette supposition est l'accumulation de succinate dans le sang de poissons soumis à un stress thermique (Iftikar et al., 2014). Le succinate est un donneur d'électrons utilisé lors de la phosphorylation oxydative par la succinate déshydrogénase (c.-à-d. le Complexe II du STE). L'accumulation de cet intermédiaire est un indice d'une perte d'intégrité au niveau de ce complexe enzymatique, puisque ce dernier n'est plus en mesure de traiter assez rapidement l'entrée des substrats (Iftikar et Hickey, 2013). Toutefois, plusieurs études ont démontré que les Complexes I et III sont souvent les éléments les plus sensibles à une augmentation de température chez les poissons (Hilton et al., 2010 ; Lemieux et al., 2010b; Gerber et al., 2020). Ces dysfonctionnements sont aussi fréquemment accompagnés d'une défaillance au niveau de la capacité de couplage de la mitochondrie (Sokolova, 2018). Le couplage mitochondrial représente le lien entre la consommation d'oxygène et la production d'ATP, souvent exprimé par un ratio ATP/O₂. Puisque l'efficacité de l'ATP synthase repose sur le gradient électrochimique intermembranaire, le couplage des mitochondries est grandement dépendant du taux de fuite de protons et donc de l'intégrité des membranes.

2.2.2 Stress oxydant

La majorité des études ayant porté sur les mitochondries se sont intéressées à leur rôle bioénergétique, mais ce n'est que l'un des multiples rôles que joue cet organite. La mitochondrie est aussi la principale source de production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) (Martin Fernandez et Gredilla, 2016). Ces molécules naissent lorsque l'un des

électrons extraits du NADH ou du FADH₂ réagit avec l'oxygène pour former un anion superoxyde, un radical hydroxyle ou du peroxyde d'hydrogène. Ces dérivés sont produits naturellement par le STE lors de la phosphorylation oxydative, principalement au niveau des Complexes I et III (Balaban et al., 2005).

Les DRO ont longtemps été considérés comme des molécules hautement toxiques pour l'environnement cellulaire. En effet, lorsqu'ils sont présents en grande quantité, ils attaquent les macromolécules telles que l'ADN et l'ARN, les acides gras et les protéines (Blier et al., 2014). Toutefois, il est maintenant reconnu qu'une concentration faible ou intermédiaire de DRO est nécessaire au bon fonctionnement des organismes. Ces molécules jouent un rôle important dans la signalisation intra-cellulaire et sont essentielles à la régulation d'un grand nombre de processus physiologiques clés tels que la différenciation et la prolifération cellulaire (Thannickal et Fanburg, 2000 ; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Les DRO jouent aussi un rôle au niveau de la modulation de l'apoptose, permettant l'élimination des cellules défectueuses (Simon et al., 2000). En conditions idéales, le système antioxydant des cellules régule la concentration de DRO et la maintient à des niveaux optimaux compatibles avec leurs fonctions de régulation et de signalisation, ce qui limite leurs effets néfastes (Belhadj Slimen et al., 2014). Toutefois, certains facteurs peuvent venir débalancer cet équilibre en affectant directement le taux de production de DRO, ou encore en limitant l'efficacité des enzymes antioxydantes.

C'est justement ce qui semble se produire lors d'un stress thermique, probablement en raison d'une perte d'intégrité des Complexes I et III, combinée à un flux élevé d'électrons dans le système (Belhadj Slimen et al., 2014 ; Blier et al., 2014 ; Banh et al., 2016 ; Gerber et al., 2020). L'étude de Christen et al. (2018) montre une situation où la hausse de production de DRO ne semble pas liée à l'augmentation de la consommation d'oxygène, mais plutôt à l'atteinte de la température critique des organismes. Cette observation supporte la suggestion que l'augmentation du stress oxydant est probablement liée à une perte de fonctionnalité au niveau de certaines composantes du STE, dont les Complexes I et III qui sont les deux principales sources de DRO dans la mitochondrie. Puisque les DRO n'ont pas facilement

tendance à diffuser hors de la mitochondrie (Banh et al., 2016), les premières cibles des dommages oxydants sont souvent les composantes même des mitochondries. L'ADN mitochondriale, les membranes lipidiques et les complexes enzymatiques de la phosphorylation oxydative sont ainsi soumis à l'attaque des DRO, entraînant une boucle d'amplification (Wang et al., 2014) des dommages associés au stress thermique.

2.2.3 Propriétés des membranes lipidiques

Les lipides, en plus de jouer un rôle au niveau bioénergétique, sont aussi les matériaux utilisés (avec les protéines) dans la formation et le maintien des membranes biologiques. Les membranes permettent de compartimenter les différentes composantes du milieu cellulaire, évitant la libre circulation d'éléments nécessaires aux multiples fonctions biologiques (Hochachka et Somero, 2002). Elles sont également impliquées de plusieurs manières dans les processus de signalisation cellulaire (Cho et Stahelin, 2005 ; Sunshine et Iruela-Arispe, 2017), par exemple au niveau de la régulation de l'expression de certains gènes (Hochachka et Somero, 2002), dans la gestion du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (Van Vliet et al., 2014) ou encore au niveau de la réponse immunitaire (Arts et Kohler, 2009). La membrane interne mitochondriale abrite quant à elle les enzymes nécessaires au bon fonctionnement de la phosphorylation oxydative et permet l'établissement du gradient de proton intermembranaire alimentant l'ATP synthase. La production d'énergie par les mitochondries repose donc en grande partie sur l'intégrité et le maintien de la structure des membranes (Hulbert et Else, 1999 ; Hochachka et Somero, 2002).

Les membranes biologiques sont extrêmement dynamiques et en constante réorganisation de manière à maintenir l'homéostasie des processus physiologiques. Cette faculté est cruciale chez les ectothermes lors d'un changement de température, puisque la fluidité et donc la structure des membranes est hautement dépendante de ce facteur (Hazel, 1995). Les poissons sont entre autres capables, par un procédé nommé adaptation homéovisqueuse (Sinensky, 1974), d'ajuster la composition lipidique de leurs membranes de

manière à conserver une fluidité adéquate, permettant ultimement de maintenir le bon fonctionnement des processus membranaires (Hazel, 1995 ; Arts & Kohler, 2009). Par exemple, il a été démontré qu'une acclimatation à des températures froides semble stimuler la production d'acides gras polyinsaturés chez la truite arc-en-ciel, augmentant ainsi la fluidité de leurs membranes et permettant de tolérer les températures plus basses (Hazel, 1984).

La composition en acides gras des membranes, et particulièrement des membranes mitochondriales, joue aussi un rôle crucial dans la résistance au stress oxydant. En effet, les membranes mitochondriales sont adjacentes à l'une des sources principales de DRO, soit les Complexes I et III du STE, ce qui en fait l'une des premières cibles du stress oxydant (Hulbert, 2005). Ce facteur est important à considérer en contexte de stress thermique, puisque la hausse de température semble être liée à une hausse de la production de DRO (Christen et al., 2018), d'autant plus dans les cellules cardiaques où la concentration en mitochondrie est très élevée (Page et McCallister, 1973). Toutefois, les différentes espèces d'acides gras n'ont pas nécessairement le même niveau de susceptibilité face au stress oxydant (Holman 1954). De manière générale, la présence de doubles liaisons au sein des chaînes de carbones affaiblit les liaisons simples environnantes, les rendant plus susceptibles à la peroxydation (Holman 1954). Les acides gras saturés sont ainsi généralement plus résistants que les acides gras polyinsaturés au stress oxydant (Hulbert, 2005). Un autre enjeu réside dans le fait que la peroxydation des acides gras membranaires a tendance à causer une boucle de propagation des dommages, affectant également les lipides environnants (Hulbert, 2005). De manière à estimer la propension des membranes à subir les effets néfastes du stress oxydant, un indice de peroxydation a été créé (Hulbert et al., 2007). Ce dernier mesure la proportion relative des différentes espèces d'acides gras présentes dans un échantillon et leur donne un score de susceptibilité à la peroxydation.

Les dommages cellulaires issus du stress oxydant ont également tendance à causer une augmentation de la réponse immunitaire, notamment par une hausse de l'inflammation (Hussain et al., 2016). Il a par exemple été démontré que l'oxydation des protéines cause une

libération de peroxyrédoxine 2, soit un médiateur de l'inflammation rédox-dépendant dont le rôle est d'entraîner une cascade de réponses immunitaires (Salzano et al., 2014). Ce facteur est intéressant à considérer dans une étude portant sur la tolérance thermique en raison du rôle joué par l'inflammation dans les maladies cardiaques (Yndestad et al., 2006 ; Adamo et al., 2020). Toutefois, l'inflammation est un processus extrêmement complexe, aux multiples facettes, et il n'est pas toujours simple de déterminer exactement s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence des problèmes cardiaques (Van Linthout et Tschöpe, 2017). Des études plus approfondies seront nécessaires pour pouvoir déterminer si les défaillances cardiaques associées au stress thermique peuvent en partie trouver leur source dans une hausse de la réponse immunitaire.

Puisque certaines espèces d'acides gras membranaires jouent un rôle important dans la régulation de l'inflammation (Simopoulos, 2002), il est bien possible que la composition lipidique des membranes influence également la sensibilité du cœur, et donc pourrait ultimement affecter la capacité des organismes à tolérer un stress thermique. Parmi les multiples espèces d'acides gras présentes chez les poissons, l'acide arachidonique (ARA) est le sujet de beaucoup de recherches. Il s'agit d'un acide gras polyinsaturé de type Omega-6 jouant un rôle dans plusieurs processus physiologiques clés chez les poissons, tel que la croissance et la reproduction (Xu et al., 2022). Toutefois, il s'agit également d'un intermédiaire dans la production d'une catégorie de molécules nommées eicosanoïdes, dont certaines espèces ont des propriétés pro-inflammatoires (Xu et al., 2022). Une étude récente portée sur divers salmonidés a observé qu'une quantité élevée d'ARA dans le cœur est corrélée à une plus faible tolérance thermique chez ces poissons (Christen et al., 2020). Les acides eicosapentaénoïque (EPA), aussi largement présents chez les poissons, sont également des précurseurs d'eicosanoïdes, mais ces derniers sont généralement reconnus comme étant beaucoup moins actifs que ceux issus de l'ARA (Adamo et al., 2020). Plusieurs études ont montré que les espèces d'eicosanoïdes issus de l'EPA semblent à l'inverse avoir des propriétés anti-inflammatoires (Simopoulos, 2002 ; Chapkin et al., 2009 ; Kubota et al., 2014).

3. ÉCOTYPES ET ADAPTATIONS MITOCHONDRIALES

Une autre approche pertinente pour aborder le sujet de la tolérance thermique des mitochondries est de se pencher sur les variations de niches thermiques observées entre les organismes de même espèce. Considérant le lien fort existant entre la température du milieu et le métabolisme (Schulte, 2015), il est probable que des adaptations au niveau du génome mitochondrial aient pu favoriser certains organismes et aient pu améliorer leur capacité à occuper de nouveaux milieux. À ce niveau, des études ont démontré que certains haplotypes mitochondriaux de populations divergentes sont associées à des niches thermiques bien particulières (Balloux et al., 2009 ; Camus et al., 2017). Chez la drosophile, Camus et son équipe ont observé que les populations subtropicales possèdent un haplotype mitochondrial leur conférant une plus grande résistance aux températures élevées et une moins grande tolérance au froid par rapport aux populations de milieux plus tempérés (Camus et al., 2017). La production de plusieurs protéines associées au métabolisme, incluant les complexes enzymatiques du STE, est régulée à la fois par le génome nucléaire des cellules et par celui des mitochondries (Blier et al., 2001 ; Ballard et Whitlock, 2004). Des variations au niveau de ces gènes et des interactions des protéines codées pourraient ainsi se refléter dans le fonctionnement même de la phosphorylation oxydative et impacter la capacité des organismes à tolérer des variations importantes de température (Baris et al., 2017).

3.1 Le cas de l'épinoche à trois épines

Dans l'optique d'inspecter ce phénomène à l'échelle des populations, l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) a été choisie comme modèle d'étude pour le présent mémoire. Répartie sur la majorité de l'hémisphère nord, cette espèce d'origine marine a colonisé des milieux d'eau douce lors du retrait des glaces il y a près de 15 000 ans (Gibbons

et al., 2016). Ceci a mené à une grande divergence au niveau de la distribution des populations. Certaines ne fréquentent encore aujourd'hui que le milieu marin, d'autres ont adopté un comportement d'anadromie et certaines populations sont maintenant essentiellement limitées aux milieux lacustre et fluvial (Wootton. 1984). Ce changement d'environnement a entraîné des modifications physiologiques, morphologiques et comportementales variant d'une population à l'autre, supposant de potentielles adaptations aux nouvelles conditions (Bell et Foster, 1994). Ici, deux populations distinctes d'épinoches ont été échantillonnées sur le territoire québécois, dans la région du Bas-Saint-Laurent. La première est d'origine lacustre, alors que la deuxième est une population estuarienne anadrome visitant les marais salés en bordure du fleuve Saint-Laurent. Les conditions environnementales entre ces deux milieux sont très différentes, entre autres au niveau de la salinité et de la température. Les individus anadromes fréquentent abondamment les berges riches en végétation du Saint-Laurent, où l'eau saumâtre de l'estuaire se mélange à l'eau douce des tributaires. Ces épinoches sont ainsi directement affectées par les effets des marées journalières et se retrouvent régulièrement prisonnières de marelles lorsque le niveau d'eau baisse. En été, ces marelles se réchauffent significativement par rapport à l'eau du fleuve, exposant les épinoches à des variations importantes et très rapides de température. En lac, la température de l'eau est plutôt fonction de la saisonnalité et descend généralement plus bas lors de la saison hivernale que dans les milieux d'eau salée (Gibbons et al., 2016). Considérant ces différences majeures, il est probable que les deux populations aient développé, chacune de leur côté, des adaptations métaboliques spécifiques à ces environnements aux conditions très distinctes. Cette idée est soutenue par les résultats de Gibbons et al. (2016), où les épinoches de milieux d'eau douce avaient plus de facilité à tolérer une exposition drastique au froid que celles de milieu marin.

4. OBJECTIFS, HYPOTHÈSES ET PRÉDICTIONS

La présente recherche vise tout d'abord à évaluer l'effet et les principales zones d'impact d'une hausse de température sur les fonctions des mitochondries cardiaques. Notre hypothèse est que lorsque les mitochondries seront amenées près du seuil thermique critique de l'organisme, des défaillances associées à ce stress surgiront au niveau des maillons faibles du STE. Considérant les études mentionnées plus haut, nous nous attendons à ce que les Complexes I et III démontrent la plus grande sensibilité aux variations de températures (Hilton et al., 2010 ; Lemieux et al., 2010b). Nous prédisons que ce phénomène se reflétera par un plafonnement ou une chute drastique de la consommation d'oxygène au niveau de ces composantes lors de certains stades respiratoires. Compte tenu des conditions environnementales très différentes entre les milieux de vie des deux populations et des potentielles adaptations métaboliques qui pourraient en découler, des variations dans la tolérance thermique à l'échelle des organismes ou des mitochondries seront probablement observables. Considérant que les individus d'eau saumâtre se retrouvent régulièrement prisonniers de marelles chaudes en été et que les individus d'eau douce sont probablement soumis à des températures plus froides en hiver, nous prédisons que les premiers seront plus tolérants face à une hausse de température, ce qui sera reflété par une meilleure performance lors du test du maximum thermique critique (CT_{max}). De plus, si les épinoches d'eau saumâtre ont bel et bien une limite thermique plus élevée que celles d'eau douce, leurs mitochondries cardiaques devraient également tolérer des températures plus élevées avant de démontrer des signes de défaillance.

Nous testerons également si la composition lipidique du cœur est liée à la tolérance thermique des épinoches. Notre hypothèse est que la tolérance des individus face à une augmentation de température sera en partie dictée par la capacité des membranes cardiaques à résister aux dommages causés par le stress oxydant et par la proportion relative d'acides gras impliqués dans la régulation de l'inflammation. Nous prédisons que les poissons ayant des membranes riches en acides gras polyinsaturés, et donc avec un indice de peroxydation élevé subiront plus fortement les impacts des DRO et auront ainsi une plus faible tolérance

thermique. Nous nous attendons également à ce que les épinoches ayant un pourcentage élevé d'ARA dans leurs membranes aient une plus faible tolérance thermique en raison du rôle pro-inflammatoire de cet acide gras.

5. MÉTHODOLOGIE

5.1 Test du CTmax

Chez les ectothermes aquatiques, les limites thermiques critiques sont généralement déterminées soit à l'aide de tests de CTmax, ou en créant et en analysant des courbes de performance thermique (Chung et Schulte, 2020). Ces courbes en forme de cloche sont des estimations de la gamme de température supportable par un organisme ou une espèce donnée. La zone sous la courbe représente en quelque sorte le potentiel utilisable pour mener à bien certains processus biologiques cruciaux tels que la locomotion, la croissance et la reproduction (Van der Have, 2002). Aux extrêmes inférieurs et supérieurs de cette courbe, le processus physiologique étudié est grandement impacté, impliquant une détérioration de l'homéostasie pour l'organisme (Williams et al., 2016). Pour le présent mémoire, la température critique supérieure des épinoches a été déterminée par la méthode du CTmax. Ce test permet d'obtenir une valeur de température représentant le seuil à partir duquel les organismes subissent une perte de fonctionnalité importante. Chez les poissons, il est coutume d'observer une perte de la capacité de locomotion, accompagnée d'un renversement dorso-ventral du corps. Le principe est d'exposer les organismes à une augmentation progressive de température du milieu, tout en maintenant les autres facteurs stables. Dans le cas des ectothermes aquatiques, une bonne oxygénation de l'eau du bassin est importante pour éviter les potentiels effets dus à une hypoxie. Les épinoches les moins tolérantes à ce changement aigu de température subiront un renversement plus rapidement et à des températures moindres par rapport aux individus les plus résistants. Ce procédé permettra

d'obtenir, dans les deux populations d'épinoches, la température et le temps d'atteinte du CTmax pour chaque individu.

5.2 Extraction lipidique

Dans l'optique d'analyser la composition en acide gras des membranes dans les cœurs d'épinoches, nous avons utilisé la méthode d'extraction lipidique par chromatographie en phase gazeuse (GC). Cette méthode permet de séparer les différentes espèces d'acides gras en les chauffant, ce qui les fait passer sous forme gazeuse. Les composés maintenant volatils sont ensuite transportés à l'aide d'hélium à l'intérieur d'une colonne contenant une substance ayant plus ou moins d'affinité avec les différentes espèces d'acides gras. Les composés ayant le plus d'affinité avec la substance (généralement les acides gras polyinsaturés) prendront plus de temps à atteindre la fin de la colonne, alors que ceux ayant le moins d'affinité (acides gras saturés) arriveront plus rapidement à la fin. Il est alors possible de comparer chaque temps de rétention à un standard, ce qui nous informera sur les espèces d'acides gras présents dans nos échantillons. À la fin de la colonne, les composés sont brûlés et la quantité de carbone présente est mesurée, ce qui indique finalement la quantité de chaque composé présente dans l'échantillon initial. De manière à augmenter la résolution lors du GC, il est nécessaire au préalable de transestérifier les acides gras de manière à obtenir des esters méthyliques plus volatils, ce qui sera effectué dans le présent mémoire.

5.3 Respirométrie à haute résolution

La tolérance thermique des mitochondries est affectée par un grand nombre de facteurs, ce qui la rend assez complexe à quantifier. La tendance actuelle dans le domaine de l'analyse mitochondriale repose sur l'utilisation de respiromètres à haute résolution permettant la mesure de la consommation d'oxygène des mitochondries à des températures contrôlées.

Cette méthode fournit des informations très utiles quant à l'activité du système de phosphorylation oxydative. Par l'ajout successif des substrats utilisés par la mitochondrie lors de la respiration, il est possible de décortiquer le système de transport des électrons en ses composantes majeures et de voir comment chacune d'elle réagit lorsque exposé à différentes températures.

Pour ce faire, la plupart des protocoles standards utilisent une séquence de manipulations basée sur la méthode SUI (*Substrate-Uncoupler-Inhibitor Titration*) (figure 2) (Gnaiger, 2020). Le principe repose sur l'activation et l'inhibition des complexes du STE, permettant l'observation de différents stades respiratoires mitochondriaux. La phase de découplage permet de perméabiliser la membrane mitochondriale aux protons, menant à la dissipation passive, c'est-à-dire sans nécessiter l'action de l'ATP synthase, du gradient électrochimique. Grâce à ce découplage, le flux d'électrons n'est plus limité par la capacité d'action de l'ATP synthase et la consommation d'oxygène observée reflète alors l'activité maximale du STE ainsi que la respiration maximale des mitochondries.

Dans la majorité des études, la consommation d'oxygène est mesurée sur des mitochondries isolées à partir de tissus frais (Picard et al., 2011). Toutefois, la purification et l'isolation des mitochondries est un processus long, complexe et qui possède le désavantage de s'éloigner des conditions *in vivo* de l'organisme. Certains préfèrent alors l'utilisation de fibres de tissus qui auront été préalablement perméabilisées pour permettre le passage des substrats. Cette méthode offre l'option de conserver la structure des mitochondries et l'intégrité de l'environnement cellulaire, mais demande aussi une grande précision dans la préparation des tissus. Ici, la respiration mitochondriale sera mesurée sur des homogénats préparés à partir des cœurs d'épinoches. Il s'agit d'une technique rapide, extrêmement simple, fournissant des résultats de bonne qualité et offrant un environnement plus près des conditions *in vivo* par rapport aux mitochondries isolées. De manière à voir l'impact de la température sur le bon fonctionnement mitochondrial des cœurs d'épinoches, les mesures ont été prises à trois températures, soit 10°C, 20°C et 30°C. Ce choix couvre l'écart entre la

température d'acclimatation des épinoches et celle d'un stress thermique important, soit à la température du CTmax.

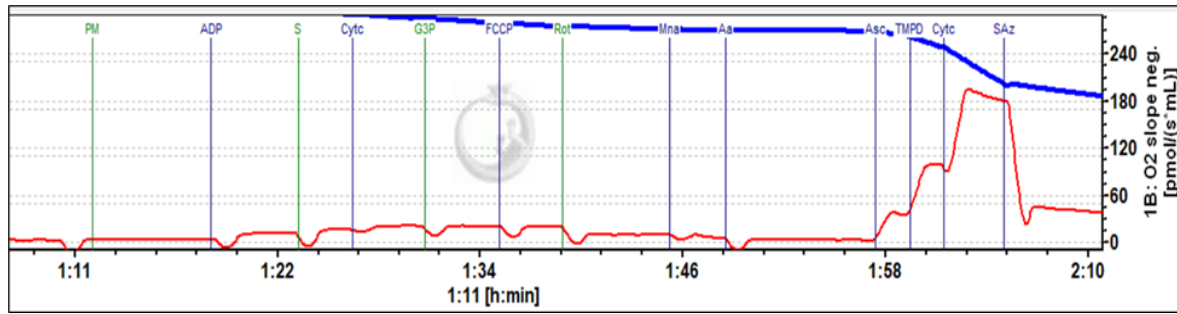


Figure 2. Exemple d'un protocole SUIT utilisé dans le présent mémoire sur un homogénat de cœur d'épinoche à trois épines. La courbe rouge représente le taux de consommation d'oxygène et la courbe bleu la concentration d'oxygène dans la chambre expérimentale. Les lignes verticales dénotent l'ajout de substrats à la chambre : PM (pyruvate et malate, activent le Complexe I), S (succinate, active le Complexe II), Cyt c (cytochrome c), G3P (glycérol-3-phosphate), FCCP (découpleur), Rot (roténone, inhibe le Complexe I), Mna (malonate, inhibe le Complexe II), Aa (antimycine a, inhibe le Complexe III), Asc (ascorbate), SAz (sodium azide, inhibe le Complexe IV). Noter que l'ajout d'un substrat ou d'un inhibiteur cause une variation dans la consommation d'oxygène, signe d'un passage vers un nouveau stade respiratoire. Les baisses de consommation d'oxygène observables suite à l'ajout des substrats sont des artéfacts dus à la perte temporaire d'étanchéité de la chambre expérimentale.

CHAPITRE 1
FONCTIONS MITOCHONDRIALES ET PROFILS LIPIDIQUES
CARDIAQUES CHEZ L'ÉPINOCHÉ À TROIS ÉPINES : UN APERÇU DES
LIMITES PHYSIOLOGIQUES ASSOCIÉES A LA TOLÉRANCE THERMIQUE

1.1 RÉSUMÉ

Les défaillances cardiaques semblent être parmi les premières conséquences majeures d'un stress thermique chez les ectothermes aquatiques. Il est également suggéré qu'elles puissent jouer un rôle important au niveau de la détermination des limites thermiques supérieures chez plusieurs espèces de poissons. Considérant la hausse prévue de la fréquence et de l'intensité des vagues de chaleur dans plusieurs écosystèmes aquatiques, il devient crucial de développer notre compréhension des processus physiologiques impliqués dans la tolérance thermique des poissons. Les mitochondries produisent presque la totalité de l'ATP utilisée par le cœur et représentent près de la moitié du volume des cellules cardiaques. Il a ainsi été hypothétisé que les dysfonctions mitochondriales pourraient être grandement impliquées dans les défaillances cardiaques associées à un stress thermique. De plus, lorsque exposées à des températures élevées, les mitochondries produisent des quantités significatives de dérivés réactifs de l'oxygène, qui sont reconnus pour dégrader les macromolécules environnantes tels que les lipides formant les membranes cellulaires. La présente étude vise à vérifier si le CT_{max} associé à des écotypes divergents d'épinoches à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) est lié à la sensibilité thermique des mitochondries cardiaques, ou s'il est influencé par la composition lipidique du cœur. Pour ce faire, la consommation d'oxygène des mitochondries cardiaques a été mesurée par respirométrie à haute résolution à trois températures, soit 10°C, 20°C et 30°C, puis les profils lipidiques des cœurs d'épinoches ont été dressés par chromatographie en phase gazeuse et ionisation de

flamme. Les épinoches issues du milieu estuarien ont démontré une meilleure performance lors du test de CTmax que celles du milieu lacustre, toutefois cette différence n'a pas pu être expliquée par des variations au niveau de la consommation d'oxygène des mitochondries cardiaques. Plusieurs différences dans les profils lipidiques entre les deux populations ont été observées. Le CTmax des épinoches était faiblement corrélé avec la proportion d'EPA dans le cœur, mais aucune tendance n'a été observée pour les autres acides gras mesurés. La respiration mitochondriale était hautement dépendante de la température expérimentale et une chute de la respiration de stade 3 a été observée à 30°C. Nos résultats suggèrent que le Complexe I du système de transport des électrons semble être un élément limitant majeur de la respiration mitochondriale à haute température, ce qui en ferait un déterminant clé de la tolérance thermique chez l'épinoche.

L'article suivant n'a pas encore été soumis pour publication, ce qui devrait idéalement se faire à l'automne ou l'hiver 2023. En tant que premier auteur, j'ai effectué et planifié l'échantillonnage des épinoches, je me suis chargé de leur maintien en animalerie, puis j'ai adapté et exécuté les manipulations, tests et analyses associés à l'étude. J'ai également rédigé le présent mémoire dans son entièreté. En tant que directeur de recherche et second auteur, Pierre Blier s'est occupé de trouver du financement pour l'étude, de lancer l'idée principale de la recherche et a participé à la coordination du projet et des analyses.

1.2 CARDIAC MITOCHONDRIAL FUNCTIONS AND LIPID PROFILES IN THREE-SPINED STICKLEBACKS: AN INSIGHT INTO PHYSIOLOGICAL LIMITATIONS ASSOCIATED WITH THERMAL TOLERANCE

Simon Chouinard-Boisvert¹, Pierre Blier¹

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

1.3 ABSTRACT

Heart failure is among the first major consequences of heat stress in aquatic ectotherms. It is also suspected to play an important role in dictating the upper thermal limits of many species of fish. Considering the predicted increase in heat waves frequency and intensity in many aquatic ecosystems, it is crucial to develop our understanding of the physiological processes involved in fish thermal tolerance. Mitochondria produce most of the ATP used by the heart and represent almost half of the volume in cardiac cells. It has therefore been hypothesized that mitochondrial dysfunctions may be highly involved in heart failure associated with heat stress. Furthermore, when exposed to elevated temperatures, these organelles have been shown to produce a significant amount of reactive oxygen species, which are known to cause damage to many macromolecules including lipids forming cell membranes. The present study aims to investigate if CTmax in diverging three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) ecotypes is linked to the thermal sensitivity of their cardiac mitochondria, or if it is influenced by their heart fatty acid composition. To do so, cardiac mitochondrial oxygen consumption was measured by high resolution respirometry at three assay temperatures, namely 10°C, 20°C and 30°C, and heart lipid profiles were obtained by gaz chromatography and FID detection. Fish from the estuarine environment performed better during CTmax tests than lacustrine fish, but this difference could not be explained by variations at the level of cardiac mitochondrial oxygen consumption. Fatty acid profiles significantly varied between populations, but CTmax only showed a weak correlation with Eicosapentaenoic acid. Mitochondrial respiration was strongly dependant on experimental temperature, and we observed a significant drop of state 3 respiration at 30°C. Our results suggest that Complex I of the electron transport system is a major limiting factor of mitochondrial respiration at high temperatures, which would make it a key determinant in sticklebacks' thermal tolerance.

1.4 INTRODUCTION

In both terrestrial and aquatic ecosystems, heat waves intensity and frequency are predicted to increase in the upcoming years, impacting the survival of all living organisms (Stillman, 2019). Among the great variety of animal species, ectotherms are suspected to be some of the first affected by temperature rises. As their own body temperature follows that of the environment they inhabit, many physiological challenges may arise from the heat (Hochachka & Somero, 2002). Organisms' metabolism is dictated by thermodynamics fundamentals (Qian & Beard, 2005), implying a strong link between body temperature and enzyme kinetics. The effectiveness of key biological processes such as growth and reproduction is therefore often limited by the ectotherm optimal temperature range (Brown et al., 2004). For many aquatic ectotherms, especially those who are already living close to their upper thermal limit, rising water temperatures will force either migrations to more suitable environments or physiological adaptations in response to the new conditions (Somero, 2005 ; Somero 2010). However, these solutions are not always suitable or realistic, and many species will have to face the consequences of globally rising temperatures. At the physiological level, there is still uncertainty surrounding the direct impacts of heat stress. Some potential targets have already been identified, yet it only revealed the impressive complexity associated with the concept of thermal tolerance in ectotherms.

As temperature rises, organisms' metabolic rate and the associated energetic demand in all cells increases. Most of the energy needed to fuel metabolic reactions is produced by the mitochondria in the form of ATP. This process, called oxidative phosphorylation (OXPHOS), uses oxygen as a final electron acceptor and is therefore strongly dependent on the efficiency of the cardiovascular system to supply oxygen to other tissues. However, in the case of many ectotherm species including fish, the heart seems to be one of the first organs to fail during heat stress, directly impacting energy production (Somero, 2005 ; Iftikar & Hickey, 2013). Cardiac contractile activity is also greatly dependent on mitochondria functional integrity, as OXPHOS produces more than 90% of the ATP used by the heart (Harris & Das, 1991). Several studies have shown that, when exposed to an acute temperature

rise, mitochondrial oxygen consumption increases for a while, but eventually reaches a breakpoint (Lemieux et al., 2010b ; Blier et al., 2014; Christen et al., 2018 ; Michaelsen et al., 2021). After that point, oxygen consumption will either plateau or decrease, concomitantly impacting ATP production (Sokolova, 2018). This led to the hypothesis that mitochondrial dysfunctions might be among the main factors implicated in heat-associated heart failures (Hilton et al., 2010 ; Iftikar & Hickey, 2013 ; Blier et al., 2014 ; Iftikar et al., 2014 ; Ekström et al., 2017). Understanding precisely how a temperature increase can cause cardiac mitochondrial defects is therefore crucial in order to pinpoint the physiological weaknesses of ectotherms at their upper thermal limits.

Whether ectotherms' upper thermal limit is primarily dictated by a decrease in mitochondrial respiration or by an insufficient ATP synthesis rate remains unclear and needs further investigation (Chung & Schulte, 2020). The bioenergetics efficiency of mitochondria relies mainly on the integrity of the electron transport system (ETS). The ETS is composed of various enzymatic complexes embedded in the inner mitochondrial membrane. The catabolism of organic metabolites feeds electrons to these complexes and allows the active transport of positive charges through the inner mitochondrial membrane, creating a proton (H^+) gradient in the intermembrane space (Nicholls & Ferguson, 2013). The enzymatic complex ATP synthase will then use this energy gradient to produce ATP from the existing pool of its precursor, ADP. To determine the overall thermal tolerance capacity of this multistep process, it is necessary to find the weakest components of the system as each of those pieces might not be affected by an acute heat stress in the same way (Lemieux et al., 2010b). In the end, the most limiting components (i.e., the most thermally sensitive) are the ones that are going to dictate the capacity of mitochondria to sustain the temperature increase. So far, results have been rather inconclusive as some studies found that a drop in ETS Complex II (CII) and Complex IV (cytochrome *c* oxidase, COX) activity at high temperatures seems to be linked to heart failure (Iftikar & Hickey, 2013 ; Iftikar et al., 2014), while others found that these complexes had a pretty high level of thermal tolerance (Hilton et al., 2010 ; Lemieux et al., 2010b ; Michaelsen et al., 2021). On the other hand, Complex I (CI) and Complex III (CIII) have often been shown to be particularly sensitive to heat stress

in fish and to be among the first components to fail (Lemieux et al., 2010b ; Ekström et al., 2017 ; Michaelsen et al., 2021). Furthermore, dysfunctions at the level of CI have been shown to increase protein acetylation and to weaken cardiac fibers, contributing to a lower resistance of the heart to various stressors and increasing the probability of heart failure (Karamanlidis et al., 2013 ; Zhou & Tian, 2018).

Mitochondria is also an important source of reactive oxygen species (ROS) generation, particularly at the level of CI and CIII (Balaban et al., 2005 ; Murphy, 2009 ; Belhadj Slimen et al., 2014). When maintained in low to medium concentrations, ROS are key components of many major physiological processes such as cell signaling and apoptosis (Simon et al., 2000 ; Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016). It is the role of the antioxidant system to work towards maintaining a good balance between ROS production and elimination in cells. This is crucial since an excess of ROS can have detrimental effects on the cellular environment by damaging important macromolecules like proteins, lipids, RNA and DNA (Blier et al., 2014). Oxidative stress has also been shown to be linked to heart failure in many ways by disrupting redox signaling in cells (Finkel, 2011 ; Hafstad et al., 2013). This can create many problems such as mitochondrial calcium (Ca^{2+}) overload, cardiomyocyte hypertrophy and bioenergetic deficiencies (Hafstad et al., 2013 ; Kiyuna et al., 2018). Loss of cardiac mitochondrial function associated with heat stress has been shown to be correlated with a drastic increase in ROS production in fish during OXPHOS (Christen et al., 2018). This observation suggests that the upper thermal limits of ectotherms could partly be dictated by cardiac mitochondrial dysfunctions impacting the redox environment through ROS generation.

Mitochondrial membranes play a pivotal role in the efficiency of key biological processes such as OXPHOS (Kraffe et al., 2007 ; Shaikh et al., 2014). Their fluidity and integrity directly impact the performance and activity of enzymes embedded in the membranes and affect crucial factors such as proton leak (Kraffe et al., 2007 ; Shaikh et al., 2014). As temperature changes, the fluidity of membranes also changes, greatly impacting their functions (Hazel & Williams, 1990). In order to prevent potential consequences and to

maintain cellular homeostasis during temperature changes, ectotherms can quickly modulate lipid composition of their membranes by a process called homeoviscous adaptation (Sinensky, 1974 ; Hazel & Williams, 1990). However, a temperature-associated increase in ROS production can also have detrimental effects on membranes, as they are particularly sensitive to oxidative stress (Bielsky et al., 1983 ; Chen & Yu, 1994). Membranes rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) have a higher susceptibility to oxidative stress, which is worsened by the fact that peroxidation of PUFA can cause a chain reaction impacting surrounding lipid molecules (Bielsky et al., 1983 ; Blier et al., 2017). Membrane lipid composition has also been shown to play a role in the regulation of inflammation (Simopoulos, 2002 ; Chapkin et al., 2009), which is suspected to be one of the leading causes of heart diseases (El Assar et al., 2013 ; Wenzel et al., 2017 ; Steven et al., 2019). These various factors led to the hypothesis that tolerance to heat stress in ectotherms could be dictated in some ways by the composition of cardiac membranes and particularly mitochondrial membranes (Hochachka & Somero, 2002 ; Christen et al., 2020).

In order to investigate how the various components of mitochondria can influence thermal tolerance in fish, we chose the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as our model species. It is a particularly useful model as its ecology, life traits, and genome have been widely studied (Ostlund-Nilsson et al., 2006 ; Feulner et al., 2013). Around 15 000 years ago, following ice retreat, the ancestral marine populations of three-spined sticklebacks colonized freshwater environments (Gibbons et al., 2016). This eventually led to many new ecotype-specific adaptations and phenotypes in response to novel ecosystems and conditions (Bell & Foster, 1994). Previous studies have shown that expression of some genes associated with mitochondrial activity and OXPHOS varies between freshwater and marine ecotypes (Morris et al., 2014 ; Stanford et al., 2020). As temperature greatly varies between both environments, it is sensible to suspect that some metabolic adaptations might have occurred in divergent stickleback populations, therefore affecting thermal tolerance. This is possible since mitochondrial haplotypes associated with thermal tolerance have already been observed in drosophila (Camus et al., 2017). We will therefore orient our study on two distinct populations of three-spined sticklebacks, from both a brackish water habitat (i.e., estuarine

environment) and from a freshwater lake. While many facets of sticklebacks ecotype-specific thermal tolerance have already been investigated (Barrett et al., 2011 ; Gibbons et al., 2016 ; Metzger et al., 2016 ; Dammark et al., 2018, Mottola et al., 2022), little to no work has been carried out linking cardiac mitochondrial functions and lipid composition to these differences.

The first objective of this study is to explore how temperature affects heart mitochondrial respiration in the two populations of three-spined sticklebacks. This will be done by measuring oxygen consumption at three temperatures using high resolution respirometry. Our hypothesis is that mitochondrial dysfunctions are going to arise at the species upper critical temperature (CT_{max}). We predict that CI will be highly affected by the temperature increase, showing signs of failure causing reduced oxygen consumption. We also suspect that potential variations in thermal tolerance between stickleback populations might reflect at the level of mitochondrial respiration, showing better efficiency at high temperatures in the population showing higher heat tolerance. In summer, estuarine sticklebacks migrate to salt marshes and tributaries for reproduction, often getting trapped in tide pools during the process. Water temperature in these tide pools can easily reach 30°C (Craig & FitzGerald, 1982), contrasting with the St-Lawrence River water averaging 5°C (Vézina & Guderley, 1991). Considering this factor, we suspect that estuarine sticklebacks might show greater heat tolerance than freshwater sticklebacks. Our second objective is to determine if lipid composition of sticklebacks' hearts is correlated to thermal tolerance. Our hypothesis is that thermal tolerance will be dictated both by the resistance of membranes to oxidative stress and by the proportion of fatty acids known to be involved in inflammation regulation.

1.5 MATERIAL AND METHODS

1.5.1 Population sampling and fish housing

Three-spined sticklebacks from two distinct populations were collected using minnow traps in Bas-Saint-Laurent administrative region (Quebec, Canada) in May and early June of 2020 (figure 3). Brackish water sticklebacks ($n = 100$, from now on referred to as BS) were captured in tide pools on the shoreline of the Saint-Lawrence estuary near Isle-Verte ($48^{\circ}01'24.7''\text{N } 69^{\circ}20'51.1''\text{W}$), where water temperature and salinity averaged 17°C and 9ppt respectively. Freshwater sticklebacks ($n = 24$, from now on referred to as FS) were sampled from Lac Côté in Rimouski Nature Reserve ($48^{\circ}07'20.2''\text{N } 68^{\circ}10'54.9''\text{W}$), where water temperature averaged 12°C . Sticklebacks were transported to Université du Québec à Rimouski (UQAR) to be kept in two 300L aquariums maintained at 10°C ($\pm 1.5^{\circ}\text{C}$) and 5ppt salinity ($\pm 1\text{ppt}$), one for each population. Water temperature was maintained using chillers (TK-500, TECO Refrigeration Technologies, Ravenna, Italy) and water salinity was tested and adjusted every three weeks. Aquariums were previously filled with water and substrate from sampling locations in order to limit fish stress as much as possible. Water temperature was gradually decreased at a rate of 2°C every 24h until reaching 10°C , and salinity was either increased (for freshwater fish) or decreased (for brackish water fish) at a rate of 2ppt every 24h until reaching 5ppt using Instant Ocean sea salt. Fish were acclimated for two months while fed frozen bloodworms (Hikari Sales USA, Inc.) every three days *ad libitum*. Fish sampling and housing, along with all following experiments were approved by our local Council on Animal Care (Certificate No.: CPA-88-22-239), supervised by the Canadian Council on Animal Care (CCPA).

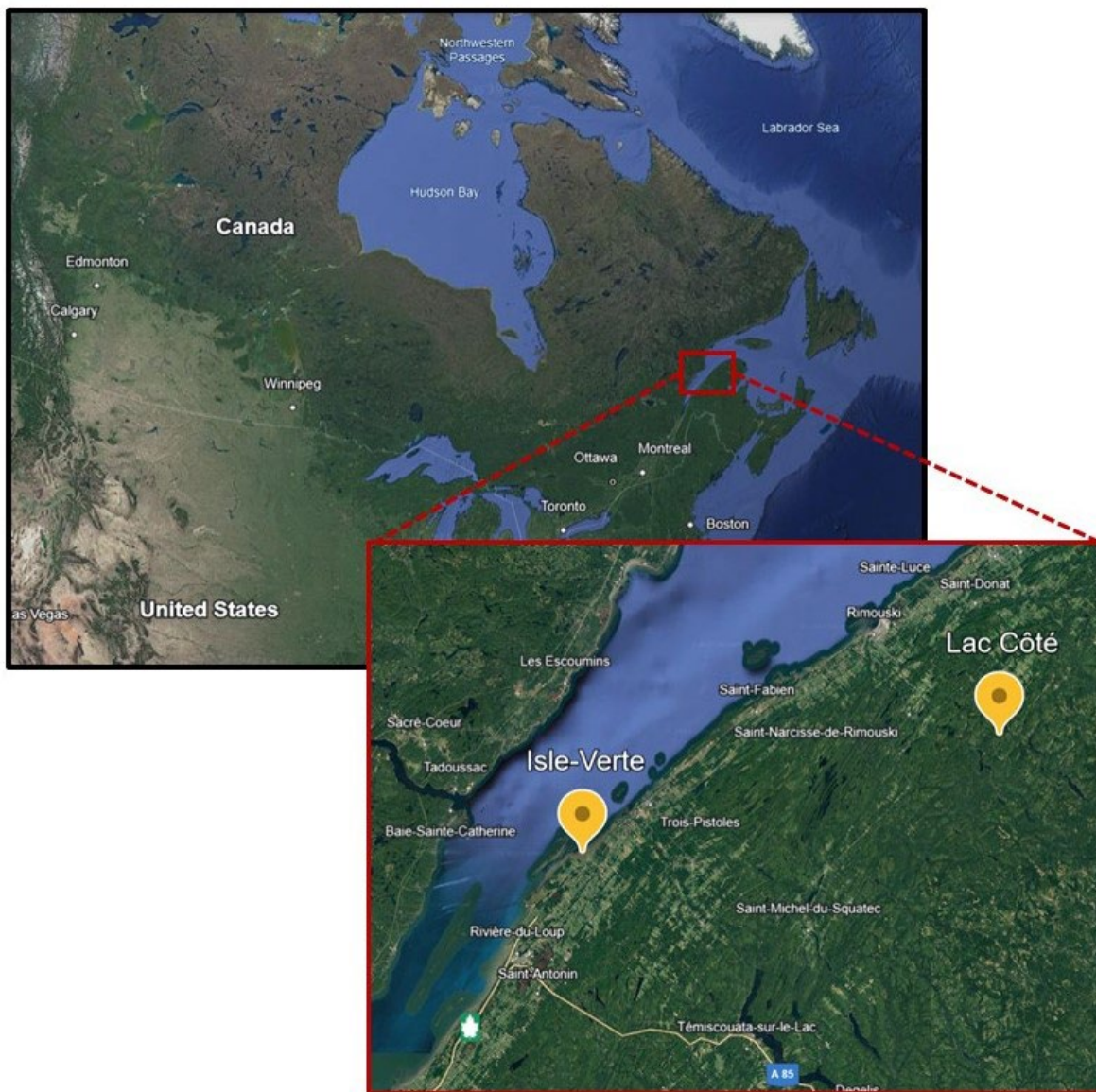


Figure 3. Three-spined sticklebacks sampling locations.

1.5.2 Critical thermal maximum (CT_{max}) test

Five days prior to the experiment, randomly selected fish from both populations ($n = 30$ for BS, $n = 22$ for FS) were individually tagged using small ring sections of copper cable

PVC insulation. Tags were installed on either dorsal or pelvic spines to create easily recognisable color codes. To limit fish stress as much as possible, we assured that they were never kept out of the water for more than 10 seconds during tag placement. CTmax tests were performed in a 40L aquarium connected by water pumps to two temperature controlling water baths (VWR International 1160S, Niles, IL, USA). For a single round of CTmax test, a maximum of 10 fish from a given population were put in the test aquarium at one time. For freshwater sticklebacks, three rounds of 7, 7 and 8 fish respectively were performed. Oxygen levels were maintained using an air pump and measured frequently by an oxygen sensor (Pro20, YSI, Yellow Springs, Ohio, USA). Water temperature was measured by two thermometers installed in the aquarium.

Water from the housing aquariums was used to fill the test aquarium and was set at acclimation temperature (10°C). Sticklebacks were then added to the test aquarium and acclimated for 20 minutes. The tests consisted of three distinct stages of temperature rises. Water was raised from 10°C to 25°C at a rate of 1°C every 10 minutes, from 25°C to 29°C at a rate of 0.5°C every 10 minutes, and finally until fish CTmax at a rate of 0.1°C every 12 minutes. We considered that sticklebacks reached CTmax when they flipped upside down or when all pectoral fins movement ceased. They were then rapidly taken out of the test aquarium and put in a recovery tank maintained at acclimation temperature. After an hour, they were transferred back into their respective housing aquariums. A week after the test, fish were sacrificed, weighed, measured, and dissected. Hearts were isolated in Eppendorf tubes and frozen at -80°C along with the rest of the body for later use. Considering the small number of FS captured in Lac Côté, only 11 were sacrificed for heart isolation, while the rest were returned to the housing aquarium for later experiments.

1.5.3 Fatty acid methyl esters (FAME) extraction and gas chromatography

Lipid extraction was performed on the hearts of fish that were previously tested for CTmax and sacrificed (FS: n = 11, BS: n = 30). The extraction protocol was adapted from

Christen et al. (2020). Frozen hearts were homogenized in 0,1 ml of distilled water before adding 0,5 ml of toluene and 10 µl of tricosanoic acid (C23:0) as an internal standard. Tricosanoic acid is not normally present in fish tissues, it can therefore be used as a safety method to confirm that the gas chromatography process worked properly. Heart lipids direct transesterification started with the addition of 3 ml of a 10% methanol-sulfuric acid solution followed by a 90°C heating for 1 h. Samples were cooled at room temperature and 3 ml of distilled water were added. For the FAME extraction, 0,5 ml of hexane was added, and the samples were centrifuged at 2000 g for 10 min at room temperature. Solvent present in the samples was evaporated at 45°C for 30 min and the resulting extraction was resuspended in 0,2 ml of toluene. Samples were then injected in a gas chromatograph (Trace GC Ultra, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) programmed with the following temperature sequence:

1. Initial temperature of 50°C maintained for 1 min;
2. temperature increase from 50 to 140°C at 25°C min⁻¹, then from 140 to 180°C at 3°C min⁻¹;
3. 180°C maintained for 10 min;
4. temperature increase from 180 to 225°C at 3.5°C min⁻¹;
5. 225°C maintained for 5 min.

Helium was used as the transport gas for the FAME inside the column (DB-23, Agilent Technologies Canada, Mississauga, ON, Canada). Resulting gas chromatography peaks were analyzed using Supelco 37 FAME standard as comparison, and relative percentages of each fatty acid was obtained by flame ionization detection at the end of the column.

1.5.4 Heart homogenate preparation

Shortly before high resolution respirometry, randomly selected sticklebacks from the housing aquariums (FS: $n = 5$, BS: $n = 41$) were killed by decerebration, measured, and weighted. The low sample size for FS was a factor of both a relatively low fishing success in Lac Côté, followed by mortalities during housing. Hearts were rapidly extracted, washed, weighed, and put in a small glass homogenizer with ice-cold mitochondrial respiration medium (MiR05: 200 mM Sucrose, 0.5 mM EGTA, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM Taurine, 20 mM HEPES, and 0.2% BSA, pH 7.2). If possible, an optimal dilution level of 40 μ l MiR05 per mg of tissue was opted for, but smaller hearts required a higher level of dilution to obtain enough homogenate (minimum 80 μ l). While keeping the homogenizers on ice, hearts were manually ground until no visible tissue fragments remained. Homogenates were transferred in 0.5 ml Eppendorf tubes and kept on ice until the experiment.

1.5.5 High resolution respirometry

Oroboros Oxygraph-2K were used to measure tissue oxygen consumption using DatLab 7.4 software. Oxygen sensor calibration was performed daily before each test using air saturated MiR05. Three oxygraphs set at 10°C, 20°C and 30°C respectively were used simultaneously during each substrate-uncoupler-inhibitor titration (SUIT) protocols. The following respiration states appellations were adapted from already established Oroboros nomenclature (see e.g., Lemieux et al., 2017 ; Gnaiger, 2020). Titration sequence started with the addition of 2 ml of MiR05 and 20 μ g of heart homogenate to the respiration chambers. Every single fish was tested at each of the three assay temperatures. CI respiration in LEAK state (PM_L) was measured by adding pyruvate (10 mM) and malate (2 mM). The addition of ADP (5 mM) to the chambers enabled coupled respiration (i.e., activating the OXPHOS system) fueled by CI substrates (PM_P). CII was then activated by adding succinate (10 mM), enabling CI and CII conjoint electron flow to the Q junction in OXPHOS state (PMS_P).

Mitochondrial membrane integrity was assessed by the addition of cytochrome *c* (10 μ M). Potential involvement of the glycerophosphate electron pathway was tested by adding glycerol-3-phosphate (G3P) (10 mM). Maximum mitochondrial respiration capacity (PMS_E) was enabled by carefully titrating small quantities of mitochondrial uncoupler FCCP (carbonyl cyanide *p*-trifluoro-methoxyphenyl hydrazine) (0.5 μ M steps) until stabilization of respiration. CI, CII and CIII were then sequentially inhibited by rotenone (0.5 μ M), malonate (5 mM) and antimycin A (2.5 μ M) respectively. As a last step, COX was activated by adding ascorbate (2 mM) and TMPD (N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride) (0.5 mM), and cytochrome *c* was added to the point of saturation (80 μ M). Residual oxygen consumption was obtained after inhibition of COX by sodium azide (100 mM).

Chemicals used during the tests were all purchased from Sigma-Aldrich.

1.5.6 Statistical analysis

Fish performance during CT_{max} tests can be influenced by confounding morphological factors such as organism length and mass (Messmer et al., 2017). To avoid this issue, a Student's *t*-test was used to verify that mean fish length did not differ between stickleback populations. Student's *t*-tests were then used to compare both populations CT_{max} and time to reach CT_{max}. The time for sticklebacks to reach CT_{max} can give a better resolution when CT_{max} temperatures are similar between the compared groups and when fish spend a long time at each temperature, towards the end of the protocol. In order to remove the effect of fish size when investigating the link between the time to reach CT_{max} and heart lipid composition, partial regressions were created using residuals from linear models including fish length. This was done for arachidonic acid (ARA), docosahexaenoic acid (DHA), docosapentaenoic acid (DPA), eicosapentaenoic acid (EPA), peroxidation index (PI), and total Omega-3/Omega-6 ratio. PI calculations were performed based on Hulbert et al. (2007). All linear regressions were created for the two populations taken separately and when pooled together. Statistical assumptions for normality and homogeneity of variance

were tested using Shapiro-Wilk and Levene tests. For each respiratory state, the influence of temperature on oxygen consumption was tested using Friedman's nonparametric method of analysis followed by Conover multiple comparison tests. Differences in oxygen consumption between populations at each given respiratory state and temperature were assessed using Mann-Whitney U tests. The choice of non-parametric tests was based on the observation that data often did not meet the basic assumptions of parametric tests. All statistical tests were performed using R software (R Core Team, 2023).

1.6 RESULTS

1.6.1 CTmax and heart lipid profiles

Fish length did not differ between BS and FS ($p = 0.937$), and the two populations showed statistical differences in their CTmax and in the time it took to reach it (table 1). BS had a slightly higher CTmax (30.2°C) than FS (29.4°C) and tolerated a rise in temperature for longer, more than an hour on average, than FS (BS = 383 min, FS = 301 min). Relative percentages of heart ARA, EPA, DHA and DPA, along with PI also differed significantly between populations (table 2). This was not the case for the Omega-3/Omega-6 ratio ($p = 0.2584$). BS hearts contained higher levels of EPA, DHA and had a higher peroxidation index, while FS hearts showed higher levels of ARA and DPA.

Table 1. CTmax, time to reach CTmax and fish length in two populations of three-spined sticklebacks.

	Freshwater		Brackish water		p value
	Mean	SD	Mean	SD	
CTmax(°C)	29.393 (29.183 - 29.602)	0.472	30.215 (29.967 - 30.433)	0.623	< 0.01
Time(min)	301 (279 - 323)	48.6	383 (356 - 410)	72.9	< 0.01
Length(cm)	6.22 (5.846 - 6.594)	0.522	6.24 (5.852 - 6.638)	0.936	0.937

Means are presented with their 95% confidence intervals. Statistical differences of the means between freshwater (FS: n = 22) and brackish water (BS: n = 30) sticklebacks are represented by p values in bold.

Table 2. Heart fatty acid composition in two populations of three-spined sticklebacks.

	Freshwater		Brackish water		p value
	Mean	SD	Mean	SD	
ARA(%)	0.609 (0.456 - 0.762)	0.214	0.368 (0.294 - 0.441)	0.175	< 0.01
EPA(%)	2.69 (2.303 - 3.078)	0.541	3.97 (3.580 - 4.362)	0.932	< 0.01
DHA(%)	12.5 (10.762 - 14.217)	2.41	18.2 (15.919 - 20.407)	5.34	< 0.01
DPA(%)	4.28 (3.442 - 5.114)	1.17	2.91 (2.515 - 3.296)	0.931	< 0.01
Ω -3/ Ω -6	3.25 (2.777 - 3.729)	0.665	5.72 (1.798 - 9.642)	9.34	0.2584
PI	154 (136.77 - 171.22)	24.1	199 (179.26 - 218.41)	46.6	< 0.01

ARA, EPA, DHA, and DPA values are expressed in relative percentages of the total fatty acid contents measured in hearts. Means are presented with their 95% confidence intervals. Statistical differences of the means between freshwater (FS: n = 10) and brackish water (BS: n = 29) sticklebacks are represented by p values in bold.

The only statistically significant correlation observed between individual fatty acids and time to reach CTmax were with EPA when all fish were pooled (see annexe 2). EPA levels in sticklebacks' hearts had a positive correlation with the time to reach CTmax.

1.6.2 Mitochondrial thermal tolerance

Oxygen consumption by CII in OXPHOS state (S_P) was determined by subtracting respiration values after CI inhibition by rotenone from the values obtained after CII inhibition by malonate. No statistical differences in oxygen consumption were detected between three-spined stickleback populations when measured during PM_L , PM_P , S_P , PMS_P or PMS_E respiratory states. Considering the lack of differences, both populations were pooled for these respiratory states to improve the resolution of statistical analysis (figure 4). FS COX respiration was slightly higher at 10°C versus BS (figure 5). This difference is probably an artifact of the very low FS sample size ($n = 5$) compared to BS ($n = 41$).

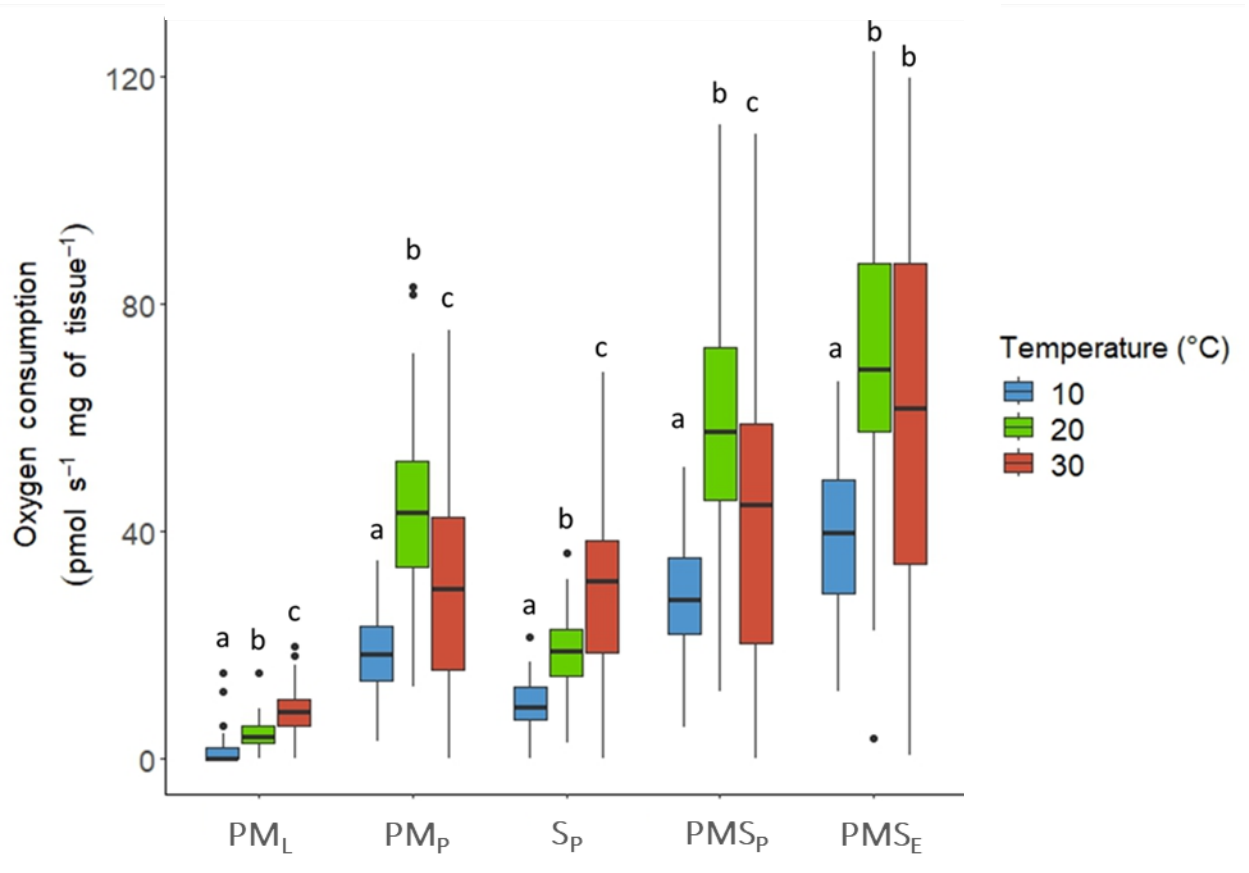


Figure 4. Oxygen consumption in three-spined sticklebacks' heart homogenates at three assay temperatures. This figure shows oxygen consumption during five mitochondrial respiratory states: CI LEAK (PM_L), CI OXPHOS (PM_P), CII OXPHOS (S_P), CI and CII working simultaneously in OXPHOS (PMS_P) and maximum ETS capacity (PMS_E). Both stickleback populations were pooled in this figure (n = 46). Letters above boxplots represent statistical differences (p < 0.05) between temperatures at each given respiratory state.

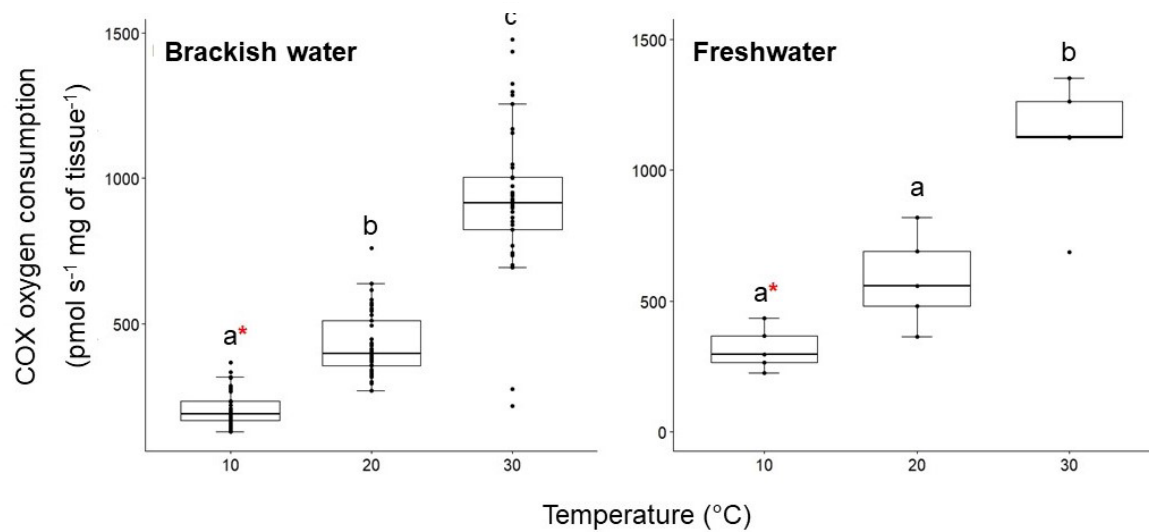


Figure 5. COX respiration in three-spined sticklebacks' heart homogenates at three assay temperatures. This figure shows oxygen consumption in heart homogenates for the two stickleback populations ($n = 41$ for BS, $n = 5$ for FS). Measures are taken at three temperatures when COX is activated by TMPD, ascorbate and cytochrome *c*, and when all other ETS complexes are inhibited. Red asterisks represent statistical differences ($p < 0.05$) between populations, while letters represent differences between temperatures.

From 10°C to 20°C, oxygen consumption statistically increased in every respiratory state, except for FS COX respiration ($p = 0.31$) (figures 4 and 5). Q_{10} values for this temperature gap varied between 1.79 during PMS_E and 2.58 during PM_L (table 3). From 20°C to 30°C, oxygen consumption in PM_L , S_P and COX states showed a significant increase (figures 4 and 5). These augmentations are also represented by Q_{10} values higher than 1 for these respiratory states (table 3). In the same temperature range, oxygen consumption decreased significantly during both PM_P and PMS_P and plateaued during PMS_E ($p = 0.053$) (figure 4). Q_{10} values for these respiratory states were all lower than 1 (table 3).

Table 3. Temperature sensitivity of oxygen consumption in sticklebacks' heart homogenates, in the form of Q_{10} values.

	PM_L	PM_P	S_P	PMS_P	PMS_E	COX
Q_{10} (10°C - 20°C)	2,58	2,35	1,99	2,09	1,79	2,02
Q_{10} (20°C - 30°C)	1,81	0,70	1,52	0,73	0,86	2,09

These values represent the rate of change in oxygen consumption for a 10°C increase, from 10°C to 20°C and from 20°C to 30°C. Q_{10} are calculated for six different mitochondrial respiratory states. The two stickleback populations are pooled in this table (n = 46).

Relative contributions of PM_P , S_P and PMS_P over PMS_E were calculated in the form of flux control ratios (PM_P , S_P , PMS_P / PMS_E) for each of the three temperature assays (figure 5). At 30°C, PM_P and PMS_P respective control over PMS_E were statistically higher in FS than in BS. Otherwise, there were no differences between populations. In BS, flux control ratios of PM_P and PMS_P significantly increased from 10°C to 20°C and greatly decreased from 20°C to 30°C back to values statistically similar to those measured at 10°C. S_P control over PMS_E for BS was similar between 10°C and 20°C, but drastically increased from 20°C to 30°C. Temperature had no statistically significant effect over flux control ratios in FS, but visual examination shows similar trends to those observed in BS at 10°C and 20°C (figure 5). This lack of statistical evidence is, once again, probably caused by the low sample size in FS compared to BS.

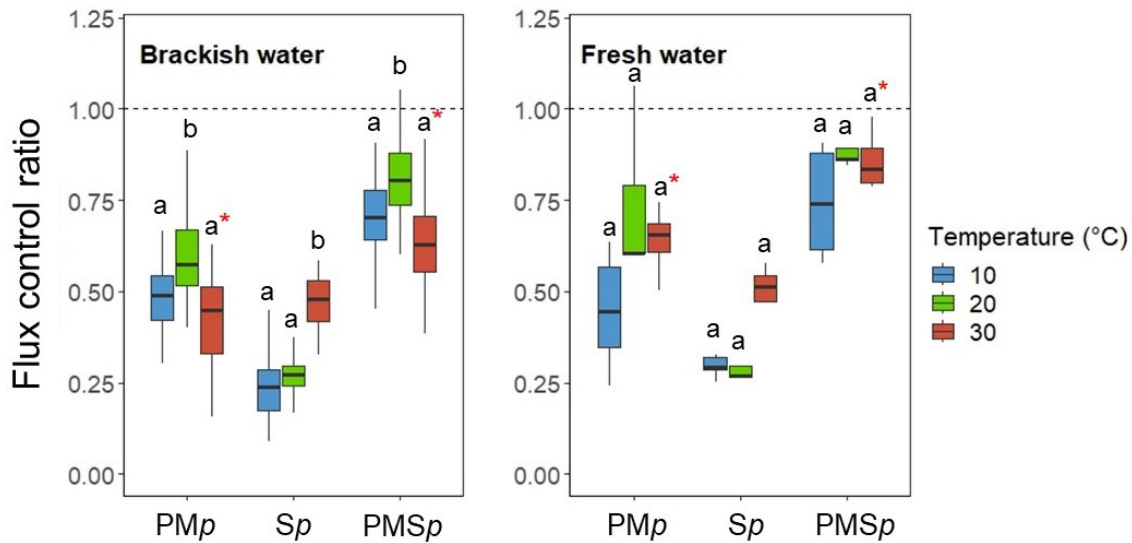


Figure 6. Respective control of PM_p , S_p and PMS_p over PMS_E respiration. Values were obtained by dividing oxygen consumption during each of the three respiratory states from the oxygen consumption after addition of the uncoupler (FCCP). The two stickleback populations are shown in this figure ($n = 41$ for BS, $n = 5$ for FS. Red asterisks represent statistical differences ($p < 0.05$) between populations, while letters represent differences between temperatures for each respiratory state.

1.7 DISCUSSION

Understanding the physiological causes underlying the upper thermal limits of ectotherms can be complex and requires investigating many factors. It has previously been shown that heart mitochondria (Iftikar & Hickey, 2013 ; Blier et al., 2014 ; Christen et al., 2018) along with heart fatty acid composition (Christen et al., 2020) may have a place at the very center of this conundrum. The present study shows that heart mitochondrial respiration at elevated temperatures seems to be highly affected by the thermal sensitivity of CI in three-spined sticklebacks. Furthermore, the first signs of CI dysfunctions appeared at the same temperature as the species CT_{max} , implying that this enzymatic complex might be among the main limiting factors when it comes to thermal tolerance in fish.

1.7.1 Thermal tolerance variations between stickleback ecotypes

Previous studies have shown higher cold tolerance in freshwater populations of three-spined sticklebacks when compared with marine populations, while heat tolerance seems to be similar among different ecotypes (Barrett et al., 2011 ; Gibbons et al., 2016 ; Metzger et al., 2016 ; Dammark et al., 2018). Conclusions from these studies suggest that sticklebacks have a high plasticity when it comes to tolerating cold conditions and that this resistance can be acquired rapidly across only a few generations (Barrett et al., 2011). Cold water adaptation is evident in freshwater populations experiencing intense winter conditions. This plasticity has likely been carried on from the ancestral marine ecotype, while also having been under intensive selection after the divergence (Barrett et al., 2011; Morris et al., 2014). On the other hand, there are little signs of adaptations associated to heat tolerance across different stickleback ecotypes (Mottola et al., 2022). This trend towards higher capacity of cold tolerance modulation in comparison to heat tolerance has also been observed in different populations of killifish (*Heterandria formosa*) (Baer & Travis, 2000).

Here we did observe a greater heat tolerance in BS reflected by a slightly higher CTmax, and by a much longer length of time during which they resisted the temperature rise. We suspected that this would be the case based on the observation that BS often get trapped in tide pools that rapidly heat during the summer months, underlying a potential advantage over FS when it comes to heat tolerance. There is also a possibility that FS exposed to colder temperatures during winter might experience a trade-off involving a greater cold tolerance at the expense of heat tolerance (Willett, 2010). To be able to speculate on possible ecotype-specific metabolic adaptations leading to differences in heat tolerance, sticklebacks have all been acclimated to the same conditions in terms of temperature, salinity, and feeding frequency. Environmental salinity is known to influence thermal tolerance in fish (Sardella & Brauner, 2007 ; Sardella et al., 2008), so there is a chance that salinity conditions in sticklebacks' original environments may have had a lasting effect over their performance

during CTmax tests, despite the acclimation period. However, previous studies comparing CTmax of marine and freshwater populations of three-spined sticklebacks acclimated under various salinity conditions showed that this trait is very consistent between both ecotypes (Barrett et al., 2011 ; Metzger et al., 2016).

To our knowledge, no other studies have investigated thermal tolerance variations between stickleback ecotypes from the perspective of the respiratory capacity and function of cardiac mitochondria. This approach is of interest considering that some mitochondrial haplotypes have been shown to be correlated with the occupation of different thermal niches in divergent populations, and to be associated with a greater resistance to high temperatures in the drosophila (Balloux et al., 2009 ; Camus et al., 2017). We predicted that differences in whole organism thermal tolerance would reflect at the level of the heart mitochondrial respiration in sticklebacks. In our study, however, the two populations showed very little differences in oxygen consumption across our temperature range for the various mitochondrial respiratory pathways investigated.

Three-spined sticklebacks performance during CTmax tests was independent of heart fatty acids profiles, except for a weak positive link involving EPA. On the other hand, heart fatty acid differed in many ways between stickleback populations despite common rearing and feeding conditions. This is not very surprising considering that stickleback's ability to biosynthesise long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) varies quite significantly between habitats and lineages (Hudson et al., 2022). For example, Ishikawa et al. (2019) found that, in Japan, diverging sticklebacks that colonised freshwater environments have more copies of the FADS2 gene than marine sticklebacks. This gene codes for the enzyme Fatty acid desaturase-2, which is implicated in the biosynthesis of key LC-PUFA such as ARA, EPA and DHA (Glaser et al., 2010). Furthermore, they found that a longer evolutionary history in freshwater was also associated with a higher number of FADS2 copies (Ishikawa et al., 2019). More copies of the FADS2 gene probably helped freshwater sticklebacks adapt to their new environments, allowing them to survive despite lower food quality (Hudson et al., 2022).

The positive correlation observed between EPA and CT_{max} could in part find its source in the anti-inflammatory properties associated with this Omega-3 fatty acid (Zeng et al., 2014 ; Ganesan et al., 2017 ; Adamo et al., 2020 ; Christen et al., 2020). Indeed, EPA has been shown to reduce Interleukin-6 levels and buffer ARA-derived proinflammatory by-products (Simopoulos, 2002 ; Chapkin et al., 2009 ; Kubota et al., 2014). Higher levels of DHA observed in BS could also act in a similar fashion, as it is also an important modulator of the inflammatory response in organisms (Chapkin et al., 2009). The lower levels of ARA observed in BS hearts compared to FS might partly explain the lower thermal tolerance of the later, as a high level of this Omega-6 fatty acid is often associated with an increase in the inflammatory response through the production of ARA-derived eicosanoids such as prostaglandins (Xu et al., 2022). However, the exact mechanisms by which EPA, DHA and ARA influence the inflammatory response are still to be documented in fish. Heart fatty acid composition can also influence thermal tolerance by affecting cellular membranes integrity and robustness to oxidative stress (Bielsky et al., 1983 ; Chen & Yu, 1994). It has previously been observed by Christen et al. (2020), who found a negative correlation between EPA and CT_{max} in hearts of two species of salmonids (*Salvelinus alpinus* and *Salvelinus fontinalis*) and their hybrids. The authors suspected that ROS generated at high temperatures (Christen et al., 2018) could peroxidise membranes rich in long-chain PUFA, which would impair tolerance at these temperatures. However, in the present study, EPA and PI of heart membranes were counterintuitively lower in FS, which had lower CT_{max}. It is therefore difficult to link these factors and would require further investigation.

Another major factor to consider when comparing thermal tolerance between stickleback populations is the high level of parasitism found in FS by the flatworm *Schistocephalus solidus*. Parasites in general can heavily impact fish responses to external stressors and have been shown in some cases to significantly increase oxygen consumption in their hosts (Östlund-Nilsson et al., 2005 ; Timi & Poulin, 2020 ; Guitard et al., 2022). A higher demand on the metabolism due to parasitism could then partly explain the lower resistance to temperature rise observed in FS.

1.7.2 Thermal sensitivity of mitochondrial respiratory pathways

As expected, temperature played a significant role in dictating the rates of mitochondrial respiration in stickleback hearts. Moreover, the response of mitochondrial respiration to temperature showed very similar tendencies in both stickleback populations. From 10°C to 20°C, mitochondrial oxygen consumption generally increased across the various ETS components investigated, following a standard temperature-associated rise in metabolism. The Q_{10} values related to this temperature gap were around 2, which seems to be common in fish exposed to rapidly increasing temperatures (Blier & Lemieux, 2001 ; Ekström et al., 2017). The effects of potential dysfunctionalities started to display when mitochondria were exposed to temperatures averaging the upper thermal limit of sticklebacks (30°C). Oxygen consumption during CI OXPHOS (PM_P) and State 3 respiration (PMS_P) was significantly lower. These observations are in line with a study from Michaelsen et al. (2021) focusing on isolated mitochondria from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hearts. However, previous study on Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) heart showed that State 3 respiration and many crucial components of the mitochondria including CI can tolerate temperatures higher than the species CTmax before starting to deteriorate (Lemieux et al., 2010b). Failures at the level of substrates oxidation inside the tricarboxylic acid cycle (TCA) could also potentially explain a diminishing oxygen consumption by the mitochondria at high temperatures (Chamberlin, 2004 ; Ekström et al., 2017), but previous studies have found that some TCA key enzymes seems to be less thermally sensitive than the components of the ETS (Blier & Guderley, 1993 ; Lemieux et al., 2010).

Stickleback mitochondrial oxygen consumption in the uncoupled state (PMS_E) also showed signs of failure at 30°C by plateauing, which is very similar to what has been observed previously in mitochondria from rainbow trout hearts (Michaelsen et al., 2021). When using an uncoupler to separate mitochondrial oxygen consumption from the production of ATP by the OXPHOS system, we allow a maximum electron flow through the

ETS. This represents a rate of oxygen consumption that is not restricted by the limited capacity of nucleotide transporters or of the ATP synthase (Gnaiger et al., 2020). Mitochondrial respiration in the uncoupled state may therefore be limited by the ETS catalytic capacity or by factors upstream of the ETS. The reduced uncoupled respiration observed at 30°C then supports the idea that mitochondrial respiration in sticklebacks' hearts at high temperatures is at least partly limited by factors at the level of the ETS. The OXPHOS capacity also seemed to be impacted by the temperature rise, as suggested by the decrease in PMS_P over PMS_E flux control ratio from 20°C to 30°C. A lower OXPHOS capacity might also lead to a drop in ATP/O₂ efficiency, therefore limiting the incoming supply of energy to the heart in a time where it is critically needed.

Mitochondrial respiration in PM_L and S_P states showed a completely different response to the elevated temperatures in stickleback hearts, as oxygen consumption kept increasing from 20°C to 30°C. Typically, LEAK respiration compensates for the constant dissipation of the proton gradient across mitochondrial inner membrane, occurring independently from the action of the ATP synthase (Divakaruni et al., 2014). Increased proton leak in stickleback hearts could therefore play a mild uncoupling role as it lowers the potential energy used by the OXPHOS system, which would also reduce the efficiency of ATP production in the heart (Brown et al., 2010). As for the response of CII, other studies investigating the activity of this enzymatic complex in fish hearts also found that it could sustain higher temperatures than CI before showing signs of failure (Lemieux et al., 2010b ; Michaelsen et al., 2021). CII flux control ratio over PMS_E also greatly increased at 30°C, while CI flux control ratio decreased. Despite CII increase, PMS_P decreased at 30°C and PMS_E plateaued, suggesting that CII could not compensate for the decrease of CI catalytic capacity. This supports the idea that CI might be one of the main instigators of the major decrease in mitochondrial respiration during OXPHOS at temperatures close to CTmax in three-spined sticklebacks. However, results from other studies (Iftikar et al., 2014 ; Christen et al., 2018) suggest that thermal tolerance of CI and CII, and their relative contribution to total respiration might vary across different species. Christen et al. (2018) observations contrast with ours, as they found an increase in CI and a decrease in CII relative contribution to maximal coupled respiration at high

temperature in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) hearts. The use of isolated mitochondria in Christen et al. (2018) study, compared to heart homogenates in ours, might also explain some of the differences observed.

It has now been well-established that CI and CIII are major sites of mitochondrial ROS production (Balaban et al., 2005). Previous study on Arctic char showed that when heart mitochondria were exposed to the species CTmax temperature, State 3 respiration plateaued, which was associated to a drastic increase in ROS production (Christen et al., 2018). Considering the elevated electron flow through CI at high temperatures, it is reasonable to suggest that dysfunctionalities observed at this particular site could be associated to an increase in ROS production in the present study. Also, as CII catalytic capacity keeps increasing, over reduction of ubiquinone could force electrons to go back from the Q-junction pool towards CI. This phenomenon, called reverse electron flow, represents another potential factor which could further increase CI ROS production and increase overall oxidative stress in the heart (Liu et al., 2002 ; Murphy, 2009). The mitochondria itself, due to the proximity of its key components to the main ROS production centers, is particularly sensitive to oxidative stress. Damage from these small molecules at the level of key metabolic enzymes such as the ETS complexes or on the main genes coding for them can have detrimental effects on mitochondrial respiration and energy production. ROS-induced damage at the level of CI and CIII could also potentially increase their production of new ROS molecules, which can create a vicious circle further amplifying oxidative stress (Wang et al., 2014).

The high levels of oxygen consumption measured for COX at each assay temperature when compared to PMS_E reflects both its substantial excess capacity and its high thermal tolerance. The excess capacity of COX has been extensively studied but the exact function of this excess is still obscure (Gnaiger et al., 1998). It has been observed in Arctic char red muscle (Blier and Lemieux, 2001), in hearts of various species of triplefin fish (Hilton et al., 2010) and also in mammals (Benard et al., 2006). Current consensus seems to indicate that a high COX excess capacity could play a role in allowing a quick adjustment to hypoxia as it is the final ETS oxygen acceptor, and is therefore an important regulator of mitochondrial

oxygen affinity (Gnaiger et al., 1998 ; Hilton et al., 2010 ; Lemieux et al., 2010b). In stickleback hearts, the fact that this excess is maintained at each of the assay temperatures indicates that COX could hardly set a limitation in this temperature range, but it still could partly dictate thermal sensitivity by modulating the reduction level of the whole ETS system (Blier and Lemieux, 2001). Control strength studies carried out by titration of mitochondrial respiration with COX specific inhibitors demonstrated that this enzymatic complex has a very low control capacity over mitochondrial respiration (Gnaiger et al., 1998 ; Blier and Lemieux, 2001).

1.8 CONCLUSION

Our study shows that three-spined sticklebacks' performance during CT_{max} tests varies slightly between brackish water and freshwater fish, but these differences cannot easily be linked to the two populations respective heart lipid composition or to the thermal tolerance of heart mitochondrial respiration. On the other hand, in both populations, heart mitochondrial respiration is highly sensitive to a temperature rise and seems to be mainly limited by the capacity of CI to tolerate the heat stress, while CII and COX are much more resistant. Mitochondrial respiration during OXPHOS was significantly lower at CT_{max} temperature, suggesting that mitochondrial dysfunctions at the level of CI is a key physiological determinant of sticklebacks' upper thermal tolerance. Given the impressive volume (around 40%) represented by mitochondria in cardiac cells (Page & McCallister, 1973), it is reasonable to state that the heart is an organ that maximises aerobic capacity in organisms. Our study shows that, at CT_{max}, mitochondrial efficiency, and therefore aerobic capacity, clearly decreases in sticklebacks. Mitochondrial dysfunctions, via the associated increase in ROS production, is also considered to be greatly implicated in the aging process (Harman, 1956 ; Blier et al., 2017). By integrating the mitochondrial oxidative stress theory of aging (MOSTA) (Barja, 2014), future studies could easily investigate the potential links

between animal longevity and thermal tolerance, which would further develop our understanding of the many roles played the mitochondria.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les prévisions actuelles annoncent pour les prochaines années une hausse marquée de la fréquence et de l'intensité des vagues de chaleur dans beaucoup de milieux (Stillman, 2019). Ceci donne une importance toute particulière aux travaux axés sur le développement des connaissances associées à la tolérance thermique des organismes, et particulièrement des ectothermes aquatiques. La présente étude visait tout d'abord à explorer l'hypothèse selon laquelle la sensibilité thermique des mitochondries cardiaques serait étroitement liée à celle de l'organisme entier. Un bon nombre de recherches ont abordé l'étude de la tolérance thermique sous cet angle, mais la grande étendue des résultats obtenus démontre la nécessité de pousser plus loin dans cette direction de manière à raffiner les connaissances sur le sujet.

Nous avons ici observé que la limite thermique supérieure des épinoches à trois épines est étroitement liée à celle de leurs mitochondries cardiaques. En effet, nous avons pu cibler certains signes évidents d'une apparition de dysfonctionnements mitochondriaux à 30°C, soit la température du CTmax des épinoches. À cette température, la respiration de stade 3 a chuté drastiquement et la respiration maximale découplée des mitochondries a plafonné. Nous avons également observé que ce point de rupture est lié à une dégradation au niveau du Complexe I du système de transport des électrons, ce qui suggère que ce complexe enzymatique est un acteur majeur dans la détermination de la limite thermique supérieure des épinoches. Les Complexes II et IV ont démontré une bonne tolérance à la hausse de température. Contrairement à ce que nos hypothèses avançaient, les différences au niveau de la tolérance thermique entre les deux écotypes d'épinoches n'ont pas pu être expliquées par des variations dans la sensibilité thermique des mitochondries cardiaques. En effet, la consommation d'oxygène aux trois températures expérimentales était très semblable entre

les populations. Finalement, la tolérance thermique des épinoches n'a pas pu être corrélée avec la composition lipidique des cœurs.

Pour obtenir ces résultats, nous avons développé un protocole de respirométrie à haute résolution basé sur l'utilisation d'homogénats de cœurs. Cette méthode est rapide et donne des résultats satisfaisants, mais elle possède aussi certaines limites par rapport à l'utilisation de mitochondries isolées. La préparation d'homogénats de tissus implique la conservation de tous les métabolites et enzymes présents dans l'échantillon, ce qui peut influencer les résultats de respirométrie. La présence d'ATPases et de substrats utilisés par la mitochondrie dans les homogénats limite notre capacité à contrôler les concentrations des substrats ajoutés durant le protocole SUIIT. Par exemple, la première étape du protocole est de mesurer la respiration au stade LEAK en ajoutant les homogénats et les substrats du Complexe I à la chambre expérimentale, mais sans fournir l'ATP nécessaire pour activer la phosphorylation oxydative. Toutefois, à ce stade, la consommation d'oxygène mesurée inclue l'utilisation des métabolites restants dans l'échantillon. Ce bruit de fond influencera alors légèrement la résolution des mesures de LEAK. Dans la présente étude, ce biais est somme toute négligeable puisque nous ne nous intéressons pas aux valeurs exactes de consommation d'oxygène, mais plutôt à sa réponse face aux différentes températures expérimentales.

Un autre enjeu lié à notre méthode de respirométrie résidait dans la faible quantité d'homogénat utilisable par individu. Les cœurs d'épinoches sont petits et ne nous permettaient que d'obtenir autour de 100 μ l d'homogénat, parfois beaucoup moins dans le cas des individus plus petits. Notre protocole impliquait de mesurer la consommation d'oxygène à trois températures pour chaque individu, ce qui ne laissait pas assez d'homogénat pour travailler en duplicata. De plus, nous aurions préféré pouvoir normaliser la consommation d'oxygène par unité de citrate synthase plutôt que par milligramme de tissus de manière à avoir des résultats plus représentatifs du contenu en mitochondries, ce qui n'a pas pu être fait en raison de la faible quantité d'homogénat restante à la fin des manipulations. Il aurait été possible de modifier le protocole de manière à limiter chaque individu à une seule température et d'ainsi pouvoir travailler en duplicata voir en triplicata. Toutefois, nous

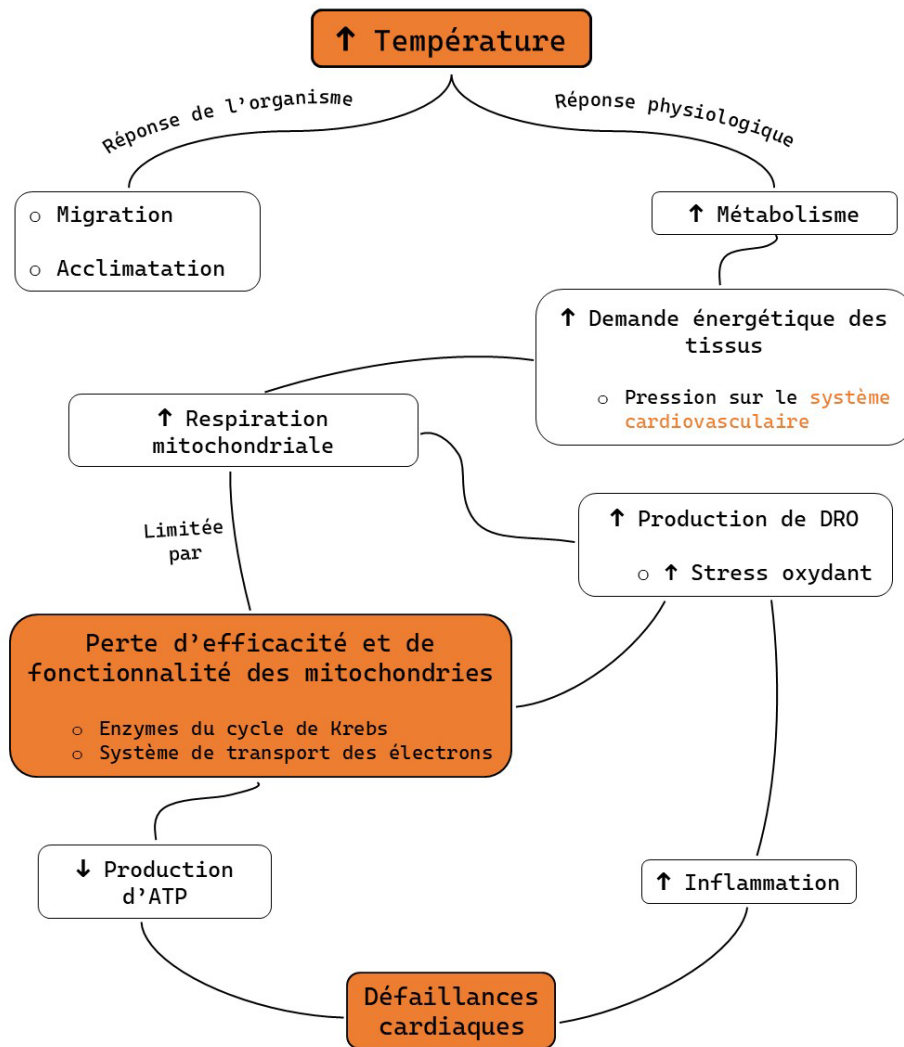
trouvions beaucoup plus pertinent d'avoir la réponse de chaque individu aux trois températures. Le fait de ne pas avoir pu travailler en duplicata n'est pas si limitant, puisque l'un des points forts de la présente étude réside dans son large échantillon d'individus. En effet, la plupart des études de respirométrie se limitent généralement à moins d'une dizaine d'individus, alors que nous avons pu mesurer la consommation d'oxygène sur 46 épinoches. Malheureusement, sur ces 46 individus, nous n'avons pu tester que cinq épinoches issues de milieu lacustre en raison du faible nombre de captures lors de l'échantillonnage. Nous n'avons pas détecté de différences significatives au niveau de la consommation d'oxygène entre les deux populations, mais il aurait tout de même été préférable d'augmenter la quantité d'épinoches lacustres de manière à avoir des résultats encore plus rigoureux.

Le second objectif du présent mémoire était de tester si la tolérance thermique des épinoches est liée à la composition en acides gras des membranes cardiaques. Cet angle d'approche est relativement nouveau dans la littérature (voir Christen et al., 2020) et nécessite de plus amples investigations. Il s'agit malgré tout d'une piste intéressante dans la recherche sur la tolérance thermique des ectothermes. L'hypothèse testée soutient que la composition lipidique des membranes peut à la fois influencer la résistance au stress oxydant et jouer un rôle clé dans l'induction de l'inflammation, affectant ainsi la tolérance des organismes au stress thermique. Ici, nous n'avons pas réussi à détecter de corrélation forte entre le CTmax des épinoches et la proportion de différents acides gras clés des membranes cardiaques. Une façon intéressante d'aborder cette hypothèse qui pourra être poursuivie dans de futures études serait de vérifier directement la présence de certains marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation, puis de tester si le CTmax et la composition en acide gras des membranes sont corrélés à la quantité de ces marqueurs. Par exemple, il serait aisément possible de mesurer par ELISA la quantité d'interleukines (marqueur d'inflammation), de 4-HNE (marqueur de la peroxydation des lipides) ou encore de 8-Oxoguanine (marqueur d'oxydation de l'ADN). De plus, ces marqueurs pourraient être associés aux résultats de consommation d'oxygène des mitochondries pour évaluer si un haut taux de dommages oxydants et d'inflammation affecte la phosphorylation oxydative.

Nous étions également intéressés à tester si la divergence évolutive des deux populations d'épinoches aurait pu entraîner des adaptations métaboliques particulières pouvant influencer la tolérance thermique des individus. Nous avons bel et bien détecté des différences au niveau du CTmax et du temps passé avant d'atteindre le CTmax entre les populations. Toutefois, puisque les épinoches d'eau douce étaient hautement parasitées, il est difficile de déterminer exactement à quoi peuvent être dues les différences observées. De manière à éliminer le biais du parasitisme chez les épinoches lacustres, il serait préférable pour les futures études d'établir des populations expérimentales domestiques. De futures études trouveraient intérêt à exploiter l'existence chez *G. aculeatus* de deux haplotypes mitochondriaux bien documentés. En effet, lors d'une période d'isolation dans la mer du Japon, l'hybridation de *G. aculeatus* et de son espèce sœur *G. nipponicus* a mené à l'apparition d'un nouveau mitotype (TNP) chez *G. aculeatus* (Yamada et al., 2001 ; Beck et al., 2022). Les individus présentant le mitotype TNP ont par la suite pu rejoindre ceux présentant le mitotype d'origine (ENA), causant ainsi un chevauchement de ces deux génomes mitochondriaux distincts. Cette divergence est particulièrement intéressante puisqu'elle touche principalement des sections du génome codants pour des protéines du Complexe I du système de transport des électrons (Beck et al., 2022). Comme nous avons pu observer dans le présent mémoire, le Complexe I chez l'épinoche à trois épines semble être un élément limitant en ce qui concerne la tolérance thermique des mitochondries de cette espèce. Il serait ainsi possible de comparer l'activité mitochondriale entre les deux mitotypes lors d'une exposition à différentes températures.

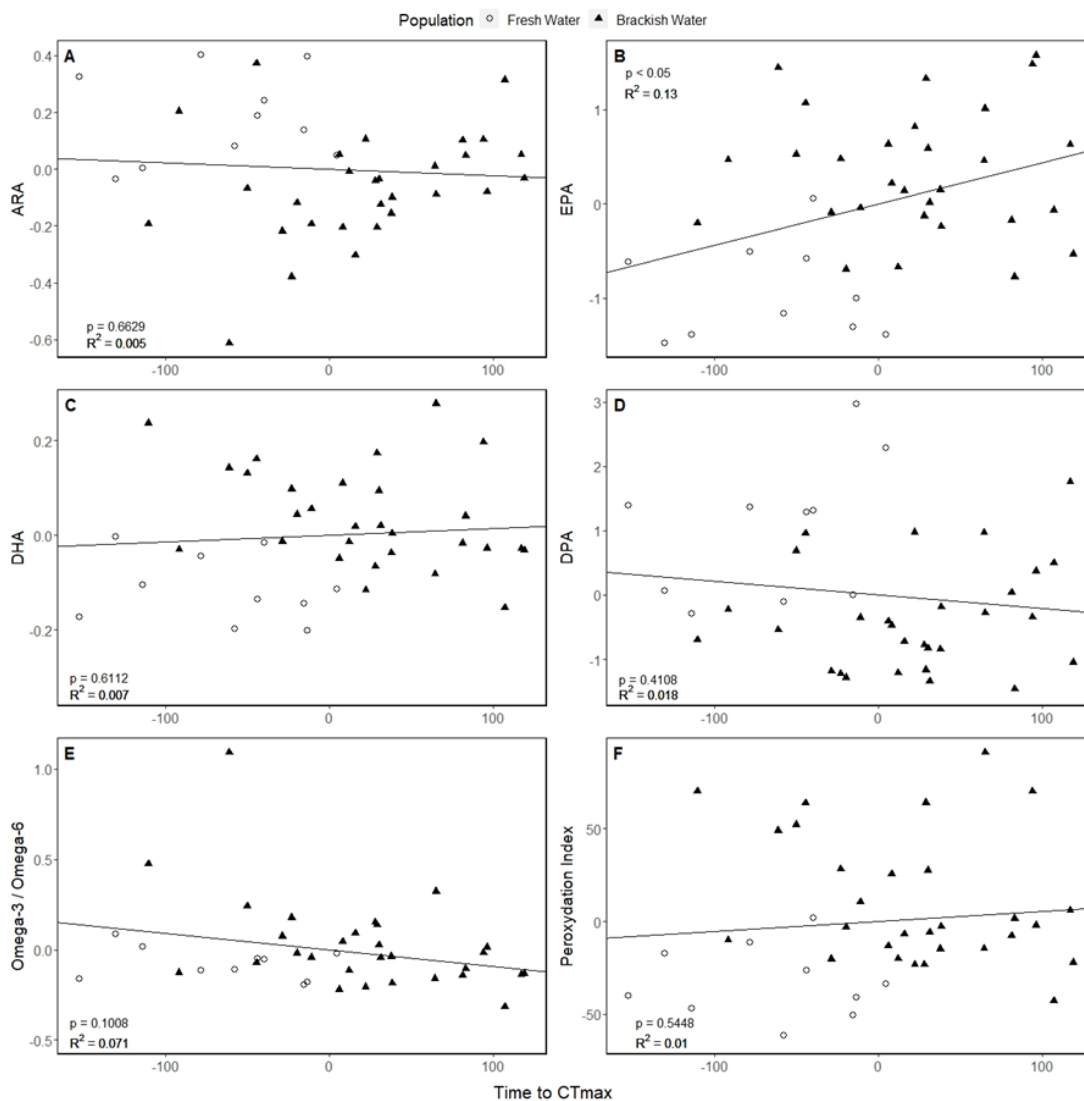
ANNEXE 1

SCHÉMA DES PRINCIPAUX IMPACTS PHYSIOLOGIQUES ASSOCIÉS À UNE HAUSSE DE TEMPÉRATURE



ANNEXE 2

CORRELATION OF STICKLEBACKS' HEART COMPOSITION AND TIME TO REACH CTMAX



Partial regressions were obtained using residuals from linear models including fish length.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adamo, L., Rocha-Resende, C., Prabhu, S. D. et Mann, D. L. (2020). Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, 17(5), 269-285.
- Arts, M. T. et Kohler, C. C. (2009). Health and condition in fish: the influence of lipids on membrane competency and immune response. Dans M. Kainz, M. T. Brett et M. T. Arts (dir.), *Lipids in aquatic ecosystems* (p. 237-256). Springer
- Baer, C. F. et Travis, J. (2000). Direct and correlated responses to artificial selection on acute thermal stress tolerance in a livebearing fish. *Evolution*, 54(1), 238-244.
- Balaban, R. S., Nemoto, S. et Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483-495.
- Ballard, J. W. O. et Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, 13(4), 729-744.
- Balloux, F., Handley, L. J. L., Jombart, T., Liu, H. et Manica, A. (2009). Climate shaped the worldwide distribution of human mitochondrial DNA sequence variation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1672), 3447–3455.
- Banh, S., Wiens, L., Sotiri, E. et Treberg, J. R. (2016). Mitochondrial reactive oxygen species production by fish muscle mitochondria: potential role in acute heat-induced oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 191, 99-107.
- Baris, T. Z., Wagner, D. N., Dayan, D. I., Du, X., Blier, P. U., Pichaud, N., Oleksiak, M. F. et Crawford, D. L. (2017). Evolved genetic and phenotypic differences due to mitochondrial-nuclear interactions. *PLoS Genetics*, 13(3), e1006517. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006517>
- Barja, G. (2014). The mitochondrial free radical theory of aging. *Progress in molecular biology and translational science*, 127, 1-27.
- Barrett, R. D., Paccard, A., Healy, T. M., Bergek, S., Schulte, P. M., Schluter, D. et Rogers, S. M. (2011). Rapid evolution of cold tolerance in stickleback. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1703), 233-238.

- Beck, E. A., Bassham, S. et Cresko, W. A. (2022). Extreme intraspecific divergence in mitochondrial haplotypes makes the threespine stickleback fish an emerging evolutionary mutant model for mito-nuclear interactions. *Frontiers in Genetics*, 13, 925786.
- Belhadj Slimen, I., Najar, T., Ghram, A., Dabbebi, H., Ben Mrad, M. et Abdrabbah, M. (2014). Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *International journal of hyperthermia*, 30(7), 513-523.
- Bell, M. A., Foster, S. A. (1994). *The Evolutionary Biology of the Threespine Stickleback*. Oxford University Press.
- Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Delage, J.-P., Casteilla, L., Letellier, T. et Rossignol, R. (2006). Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 291(6), C1172-C1182.
- Bielski, B. H., Arudi, R. L. et Sutherland, M. W. (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂-with unsaturated fatty acids. *Journal of biological chemistry*, 258(8), 4759-4761.
- Blier, P. U. et Guderley, H. E. (1993). Effects of pH and temperature on the kinetics of pyruvate oxidation by muscle mitochondria from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiological zoology*, 66(4), 474-489.
- Blier, P. U., Dufresne, F. et Burton, R. S. (2001). Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends in Genetics*, 17(7), 400-406.
- Blier, P. U. et Lemieux, H. (2001). The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. *Journal of Comparative Physiology B*, 171, 247-253.
- Blier, P. U., Lemieux, H. et Pichaud, N. (2014). Holding our breath in our modern world: will mitochondria keep the pace with climate changes?. *Canadian Journal of Zoology*, 92(7), 591-601.
- Blier, P. U., Abele, D., Munro, D., Degletagne, C., Rodriguez, E. et Hagen, T. (2017). What modulates animal longevity? Fast and slow aging in bivalves as a model for the study of lifespan. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 70, 130-140.
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M. et West, G. B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, 85(7), 1771-1789.

- Brown, G. C., Murphy, M. P., Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R. et Brand, M. D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in biochemistry*, 47, 53-67.
- Campan, R. et Scapini, F. (2002). Chapitre 7. Utilisation de l'espace et exploitation des ressources. Dans R. Campan et F. Scapini (dir.), *Éthologie: Approche systémique du comportement* (p. 343-441). De Boeck Supérieur.
- Camus, M. F., Wolff, J. N., Sgrò, C. M. et Dowling, D. K. (2017). Experimental support that natural selection has shaped the latitudinal distribution of mitochondrial haplotypes in Australian *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, 34(10), 2600-2612.
- Chamberlin, M. E. (2004). Top-down control analysis of the effect of temperature on ectotherm oxidative phosphorylation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(4), R794-R800.
- Chapkin, R. S., Kim, W., Lupton, J. R. et McMurray, D. N. (2009). Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(2-3), 187-191.
- Chen, J. J. et Yu, B. P. (1994). Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(5), 411-418.
- Chevin, L. M., Lande, R. et Mace, G. M. (2010). Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS biology*, 8(4), e1000357. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000357>
- Cho, W. et Stahelin, R. V. (2005). Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 34, 119-151.
- Christen, F., Desrosiers, V., Dupont-Cyr, B. A., Vandenberg, G. W., Le François, N. R., Tardif, J. C., Dufresne, F., Lamarre, S. G. et Blier, P. U. (2018). Thermal tolerance and thermal sensitivity of heart mitochondria: Mitochondrial integrity and ROS production. *Free Radical Biology and Medicine*, 116, 11-18.
- Christen, F., Dufresne, F., Leduc, G., Dupont-Cyr, B. A., Vandenberg, G. W., Le François, N. R., Tardif, J.-C., Lamarre, S. G. et Blier, P. U. (2020). Thermal tolerance and fish heart integrity: fatty acids profiles as predictors of species resilience. *Conservation Physiology*, 8(1), coaa108. <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa108>
- Chung, D. J. et Schulte, P. M. (2020). Mitochondria and the thermal limits of ectotherms. *Journal of Experimental Biology*, 223(20), jeb227801. <https://doi.org/10.1242/jeb.227801>

- Clarke, A. et Fraser, K. P. P. (2004). Why does metabolism scale with temperature?. *Functional ecology*, 18(2), 243-251.
- Craig, D., et FitzGerald, G. J. (1982). Reproductive tactics of four sympatric sticklebacks (Gasterosteidae). *Environmental Biology of Fishes*, 7, 369-375.
- Dammark, K. B., Ferchaud, A. L., Hansen, M. M., & Sørensen, J. G. (2018). Heat tolerance and gene expression responses to heat stress in threespine sticklebacks from ecologically divergent environments. *Journal of thermal biology*, 75, 88-96.
- Divakaruni, A. S., Paradyse, A., Ferrick, D. A., Murphy, A. N. et Jastroch, M. (2014). Analysis and Interpretation of Microplate-Based Oxygen Consumption and pH Data. Dans A. N., Murphy et D. C., Chan (dir.), *Methods in Enzymology* (Vol 547, p. 309-354). Academic Press.
- 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*. *Journal of Experimental Biology*, 220(3), 386-396.
- El Assar, M., Angulo, J. et Rodríguez-Mañas, L. (2013). Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 380-401.
- Farrell, A. P. (1997). Effects of temperature on cardiovascular performance. Dans C. M., Wood et D. G., McDonald (dir.) *Global warming: implications for freshwater and marine fish* (Vol. 61, p. 135-158). Cambridge University Press.
- Farrell, A. P. (2002). Cardiorespiratory performance in salmonids during exercise at high temperature: insights into cardiovascular design limitations in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(4), 797-810.
- Feulner, P. G., Chain, F. J., Panchal, M., Eizaguirre, C., Kalbe, M., Lenz, T. L., Mundry, M., Samonte, I. E., Stoll, M., Milinsky, M., Reusch, T. B. H. et Bornberg-Bauer, E. (2013). Genome-wide patterns of standing genetic variation in a marine population of three-spined sticklebacks. *Molecular ecology*, 22(3), 635-649.
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*, 194(1), 7-15.
- Ganesan, S., Volodina, O., Pearce, S. C., Gabler, N. K., Baumgard, L. H., Rhoads, R. P. et Selsby, J. T. (2017). Acute heat stress activated inflammatory signaling in porcine oxidative skeletal muscle. *Physiological reports*, 5(16), e13397. <https://doi.org/10.14814/phy2.13397>

- Gerber, L., Clow, K. A., Mark, F. C. et Gamperl, A. K. (2020). Improved mitochondrial function in salmon (*Salmo salar*) following high temperature acclimation suggests that there are cracks in the proverbial ‘ceiling’. *Scientific Reports*, *10*(1), 21636. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78519-4>
- Gibbons, T. C., Rudman, S. M. et Schulte, P. M. (2016). Responses to simulated winter conditions differ between threespine stickleback ecotypes. *Molecular ecology*, *25*(3), 764-775.
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M. et Charnov, E. L. (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science*, *293*(5538), 2248-2251.
- Glaser, C., Heinrich, J. et Koletzko, B. (2010). Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. *Metabolism*, *59*(7), 993-999.
- Gnaiger, E., Lassnig, B., Kuznetsov, A., Rieger, G. et Margreiter, R. (1998). Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *Journal of Experimental Biology*, *201*(8), 1129-1139.
- Gnaiger, E. (2020). Mitochondrial pathways and respiratory control: an introduction to OXPHOS analysis. *Bioenergetics Communications*. <https://doi.org/10.26124/bec:2020-0002>
- Gnaiger, E. et al — MitoEAGLE Task Group (2020). Mitochondrial physiology. *Bioenergetics Communications*. doi:10.26124/bec:2020-0001.v1.
- Guitard, J. J., Chrétien, E., De Bonville, J., Roche, D. G., Boisclair, D. et Binning, S. A. (2022). Increased parasite load is associated with reduced metabolic rates and escape responsiveness in pumpkinseed sunfish. *Journal of Experimental Biology*, *225*(15), jeb243160.
- Hafstad, A. D., Nabeebaccus, A. A. et Shah, A. M. (2013). Novel aspects of ROS signalling in heart failure. *Basic research in cardiology*, *108*, 1-11.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, *11*, 298-300.
- Harris, D. A. et Das, A. M. (1991). Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochemical journal*, *280*(Pt 3), 561-573.
- Hazel, J. R. (1984). Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *246*(4), R460-R470.

- Hazel, J. R. et Williams, E. E. (1990). The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in lipid research*, 29(3), 167-227.
- Hazel, J. R. (1995). Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation?. *Annual review of physiology*, 57(1), 19-42.
- Hilton, Z., Clements, K. D. et Hickey, A. J. (2010). Temperature sensitivity of cardiac mitochondria in intertidal and subtidal triplefin fishes. *Journal of Comparative Physiology B*, 180, 979-990.
- Hochachka, P.W. et Somero, G.N. (2002). *Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution*. Oxford University Press.
- Holman, R.T. (1954). Autoxidation of fats and related substances. Dans R.T., Holman, W.O., Lundberg et T. Malkin (dir.), *Progress in Chemistry of Fats and Other Lipids*, (vol. 2, p. 51–98). Pergamon Press.
- Hudson, C. M., Ladd, S. N., Leal, M. C., Schubert, C. J., Seehausen, O. et Matthews, B. (2022). Fit and fatty freshwater fish: contrasting polyunsaturated fatty acid phenotypes between hybridizing stickleback lineages. *Oikos*, 2022(7). <https://doi.org/10.1111/oik.08558>
- Hulbert, A. J. et Else, P. L. (1999). Membranes as possible pacemakers of metabolism. *Journal of theoretical biology*, 199(3), 257-274.
- Hulbert, A. J. (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *Journal of theoretical biology*, 234(2), 277-288.
- Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R. et Buttemer, W. A. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological reviews*, 87(4), 1175-1213.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. et Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Iftikar, F. I. et Hickey, A. J. (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. et Hickey, A. J. (2014). Could thermal sensitivity of mitochondria determine species distribution in a changing climate?. *Journal of Experimental Biology*, 217(13), 2348-2357.

- IPCC (2021). Summary for Policymakers. Dans Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, and B. Zhou (dir.). *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (p. 3–32). Cambridge University Press. doi:10.1017/9781009157896.001.
- Ishikawa, A., Kabeya, N., Ikeya, K., Kakioka, R., Cech, J. N., Osada, N., ... et Kitano, J. (2019). A key metabolic gene for recurrent freshwater colonization and radiation in fishes. *Science*, 364(6443), 886-889.
- Karamanlidis, G., Lee, C. F., Garcia-Menendez, L., Kolwicz, S. C., Suthammarak, W., Gong, G., Sedensky M. M., Morgan, P. G., Wang, W. et Tian, R. (2013). Mitochondrial complex I deficiency increases protein acetylation and accelerates heart failure. *Cell metabolism*, 18(2), 239-250.
- Kiyuna, L. A., e Albuquerque, R. P., Chen, C. H., Mochly-Rosen, D. et Ferreira, J. C. B. (2018). Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: Challenges and opportunities. *Free Radical Biology and Medicine*, 129, 155-168.
- Kraffe, E., Marty, Y. et 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. *Journal of Experimental Biology*, 210(1), 149-165.
- Kubota, T., Arita, M., Isobe, Y., Iwamoto, R., Goto, T., Yoshioka, T., Urabe, D. Inoue, M. et Arai, H. (2014). Eicosapentaenoic acid is converted via ω -3 epoxygenation to the anti-inflammatory metabolite 12-hydroxy-17, 18-epoxyeicosatetraenoic acid. *The FASEB Journal*, 28(2), 586-593.
- Lemieux, H., Tardif, J. C., et Blier, P. U. (2010a). Thermal sensitivity of oxidative phosphorylation in rat heart mitochondria: Does pyruvate dehydrogenase dictate the response to temperature?. *Journal of Thermal Biology*, 35(2), 105-111.
- Lemieux, H., Tardif, J. C., Dutil, J. D. et Blier, P. U. (2010b). Thermal sensitivity of cardiac mitochondrial metabolism in an ectothermic species from a cold environment, Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 384(1-2), 113-118.
- Lemieux H., Blier, P. U. et Gnaiger, E. (2017). Remodeling pathway control of oxidative phosphorylation by temperature in the heart, *Scientific Reports*, 7(2840), 1-28.
- Liu, Y., Fiskum, G. et Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry*, 80(5), 780-787.

- Martín-Fernández, B. et Gredilla, R. (2016). Mitochondria and oxidative stress in heart aging. *Age*, 38(4), 225-238.
- Messmer, V., Pratchett, M. S., Hoey, A. S., Tobin, A. J., Coker, D. J., Cooke, S. J. et Clark, T. D. (2017). Global warming may disproportionately affect larger adults in a predatory coral reef fish. *Global Change Biology*, 23(6), 2230-2240.
- Metzger, D. C., Healy, T. M. et Schulte, P. M. (2016). Conserved effects of salinity acclimation on thermal tolerance and hsp70 expression in divergent populations of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Journal of Comparative Physiology B*, 186, 879-889.
- Michaelsen, J., Fago, A. et Bundgaard, A. (2021). High temperature impairs mitochondrial function in rainbow trout cardiac mitochondria. *Journal of Experimental Biology*, 224(9), jeb242382. <https://doi.org/10.1242/jeb.242382>
- Morris, M. R., Richard, R., Leder, E. H., Barrett, R. D., Aubin-Horth, N. et Rogers, S. M. (2014). Gene expression plasticity evolves in response to colonization of freshwater lakes in threespine stickleback. *Molecular ecology*, 23(13), 3226-3240.
- Mottola, G., López, M. E., Vasemägi, A., Nikinmaa, M. et Anttila, K. (2022). Are you ready for the heat? Phenotypic plasticity versus adaptation of heat tolerance in three-spined stickleback. *Ecosphere*, 13(4), e4015. <https://doi.org/10.1002/ecs2.4015>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical journal*, 417(1), 1-13.
- Neely, J. R. et Morgan, H. E. (1974). Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annual review of physiology*, 36(1), 413-459.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., Hoskins, A. A. et Lehninger, A. L. (2021). *Lehninger principles of biochemistry* (8^e éd.). Macmillan International Higher Education.
- Nicholls, D. G. et Ferguson, S. J. (2013). *Bioenergetics* (4^e éd.). Elsevier.
- Ostlund-Nilsson, S., Mayer, I. et Huntingford, F. A. (2006). *Biology of the three-spined stickleback*. CRC press.
- Page, E. et McCallister, L. P. (1973). Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells: application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts. *The American journal of cardiology*, 31(2), 172-181.

- Picard, M., Taivassalo, T., Ritchie, D., Wright, K. J., Thomas, M. M., Romestaing, C. et Hepple, R. T. (2011). Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PloS one*, 6(3), e18317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018317>
- Pichaud, N., Ballard, J. W. O., Tanguay, R. M. et Blier, P. U. (2011). Thermal sensitivity of mitochondrial functions in permeabilized muscle fibers from two populations of *Drosophila simulans* with divergent mitotypes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(1), R48-R59.
- Pinsky, M. L., Eikeset, A. M., McCauley, D. J., Payne, J. L. et Sunday, J. M. (2019). Greater vulnerability to warming of marine versus terrestrial ectotherms. *Nature*, 569(7754), 108-111.
- Pörtner, H. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88(4), 137-146.
- Pörtner, H. O. et Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315(5808), 95-97.
- Pörtner, H. O., Bock, C. et Mark, F. C. (2017). Oxygen-and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. *Journal of Experimental Biology*, 220(15), 2685-2696.
- Prosser, C. L. et Heath, J. E. (1991). Temperature. Dans C. L., Prosser (dir.), *Comparative Animal Physiology: Environmental and Metabolic Animal Physiology* (4^e éd., p. 109-165). Wiley-Liss.
- Qian, H. et Beard, D. A. (2005). Thermodynamics of stoichiometric biochemical networks in living systems far from equilibrium. *Biophysical chemistry*, 114(2-3), 213-220.
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rahel, F. J., Bierwagen, B. et Taniguchi, Y. (2008). Managing aquatic species of conservation concern in the face of climate change and invasive species. *Conservation Biology*, 22(3), 551-561.
- Redza-Dutordoir, M. et Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977-2992.

- Salzano, S., Checconi, P., Hanschmann, E. M., Lillig, C. H., Bowler, L. D., Chan, P., ... et Ghezzi, P. (2014). Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(33), 12157-12162.
- Sardella, B. A. et Brauner C. J. (2007). The osmo-respiratory compromise in fish: the effects of physiological state and the environment. Dans M. N. Fernandes, F. T. Rantin, M. L. Glass, B. G. Kapoor (dir), *Fish respiration and environment* (p. 147–165). Enfield, NH: Science Publishers.
- Sardella, B. A., Sanmarti, E. et Kültz, D. (2008). The acute temperature tolerance of green sturgeon (*Acipenser medirostris*) and the effect of environmental salinity. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309(8), 477-483.
- Schulte, P. M. (2015). The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *The Journal of experimental biology*, 218(12), 1856-1866.
- Shaikh, S. R., Sullivan, E. M., Alleman, R. J., Brown, D. A. et Zeczycki, T. N. (2014). Increasing mitochondrial membrane phospholipid content lowers the enzymatic activity of electron transport complexes. *Biochemistry*, 53(35), 5589-5591.
- Simon, H. U., Haj-Yehia, A. et Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5, 415-418.
- Simopoulos, A. P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *Journal of the American College of nutrition*, 21(6), 495-505.
- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(2), 522-525.
- Sokolova, I. (2018). Mitochondrial adaptations to variable environments and their role in animals' stress tolerance. *Integrative and Comparative Biology*, 58(3), 519-531.
- Somero, G. N. (2005). Linking biogeography to physiology: evolutionary and acclimatory adjustments of thermal limits. *Frontiers in zoology*, 2(1), 1-9.
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 912-920.

- Stanford, B. C., Clake, D. J., Morris, M. R., et Rogers, S. M. (2020). The power and limitations of gene expression pathway analyses toward predicting population response to environmental stressors. *Evolutionary Applications*, 13(6), 1166-1182.
- Steven, S., Frenis, K., Oelze, M., Kalinovic, S., Kuntic, M., Bayo Jimenez, M. T., ... et Daiber, A. (2019). Vascular inflammation and oxidative stress: major triggers for cardiovascular disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7092151>
- Stillman, J. H. (2019). Heat waves, the new normal: summertime temperature extremes will impact animals, ecosystems, and human communities. *Physiology*, 34(2), 86-100.
- Sunshine, H. et Iruela-Arispe, M. L. (2017). Membrane lipids and cell signaling. *Current opinion in lipidology*, 28(5), 408-413.
- Thannickal, V. J. et Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-L1028.
- Timi, J. T. et Poulin, R. (2020). Why ignoring parasites in fish ecology is a mistake. *International Journal for Parasitology*, 50(10-11), 755-761.
- Van der Have, T. M. (2002). A proximate model for thermal tolerance in ectotherms. *Oikos*, 98(1), 141-155.
- Van Linthout, S. et Tschöpe, C. (2017). Inflammation—cause or consequence of heart failure or both?. *Current heart failure reports*, 14, 251-265.
- Van Vliet, A. R., Verfaillie, T. et Agostinis, P. (2014). New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(10), 2253-2262.
- Vézina, D., et Guderley, H. (1991). Anatomic and enzymatic responses of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* to thermal acclimation and acclimatization. *Journal of Experimental Zoology*, 258(3), 277-287.
- Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. G. et Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1240-1247.
- Wenzel, P., Kossmann, S., Münzel, T. et Daiber, A. (2017). Redox regulation of cardiovascular inflammation—Immunomodulatory function of mitochondrial and Nox-derived reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 109, 48-60.

- Willett, C. S. (2010). Potential fitness trade-offs for thermal tolerance in the intertidal copepod *Tigriopus californicus*. *Evolution*, 64(9), 2521-2534.
- Williams, C. M., Buckley, L. B., Sheldon, K. S., Vickers, M., Pörtner, H. O., Dowd, W. W., ... et Stillman, J. H. (2016). Biological impacts of thermal extremes: mechanisms and costs of functional responses matter. *Integrative and comparative biology*, 56(1), 73-84.
- Wootton, R. J. (1984). *A Functional Biology of Sticklebacks*. Springer New York.
- Xu, H., Meng, X., Wei, Y., Ma, Q., Liang, M. et Turchini, G. M. (2022). Arachidonic acid matters. *Reviews in Aquaculture*, 14(4), 1912-1944.
- Yamada, M., Higuchi, M. et Goto, A. (2001). Extensive introgression of mitochondrial DNA found between two genetically divergent forms of threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, around Japan. *Environmental Biology of Fishes*, 61, 269-284.
- Yndestad, A., Kristian Damås, J., Øie, E., Ueland, T., Gullestad, L. et Aukrust, P. (2006). Systemic inflammation in heart failure—the whys and wherefores. *Heart failure reviews*, 11, 83-92.
- Zeng, T., Li, J. J., Wang, D. Q., Li, G. Q., Wang, G. L. et Lu, L. Z. (2014). Effects of heat stress on antioxidant defense system, inflammatory injury, and heat shock proteins of Muscovy and Pekin ducks: evidence for differential thermal sensitivities. *Cell Stress and Chaperones*, 19, 895-901.
- Zhou, B. et Tian, R. (2018). Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *The Journal of clinical investigation*, 128(9), 3716-3726.

