

Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique
Centre Eau Terre Environnement

PERTURBATION DES MITOCHONDRIES PAR LE NICKEL ENVIRONNEMENTAL CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL : UNE QUESTION DE TEMPÉRATURE ?

Par
Elyas Aissia

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Présidente du jury et
examinatrice interne

Valérie Langlois
Centre Eau-Terre-Environnement
INRS

Examinatrice externe

Lise Parent
Département Science et Technologie
TÉLUQ

Directeur de recherche

Patrice Couture
Centre Eau-Terre-Environnement
INRS

Codirecteur de recherche

Pierre Blier
Département de biologie, chimie et
géographie
UQAR

« Ne demandez jamais quelle est l'origine d'un homme; interrogez plutôt sa vie, son courage, ses qualités et vous saurez ce qu'il est. »

Abd El-Kader

Artiste, écrivain, homme politique, philosophe, poète, scientifique, théologien (1808 - 1883)

REMERCIEMENTS

La gratitude. C'est le sentiment que j'éprouve après cette aventure pleine de rebondissements et de découvertes. Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur Patrice Couture, pour avoir cru en mon projet et mon parcours. Il m'a donné la liberté d'apprendre en autonomie, tout en me guidant dans les moments difficiles d'un projet de recherche. Tu m'as fait découvrir le Québec à travers ces années de maîtrise, et j'ai pu acquérir nombre de compétences que je ne pensais pas apprendre en faisant de la science (comme conduire une embarcation dans le Nord ou enseigner la pêche en lac aux nouveaux étudiants). Ce fut d'extraordinaires expériences et je t'en remercie chaudement.

J'ai à cœur de remercier mon co-directeur, Pierre Blier, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire à l'UQAR et qui a participé à la réussite ce de projet. Ton expertise mitochondriale impressionnante a été d'une grande inspiration pour moi et a permis de développer plein de perspectives dans cette étude. Je remercie également Mariem Fadhlaoui, qui a été présente à travers la maîtrise, et qui a apporté son soutien académique, psychologique et alimentaire : je te dois un sushi dès la réouverture des restaurants !

Je souhaite remercier les deux examinatrices de ce mémoire, Valérie Langlois et Lise Parent, deux chercheuses très talentueuses et inspirantes, qui ont accepté d'évaluer ce mémoire.

J'ai eu la chance d'avoir de supers amis et collègues dans mes deux labos à Québec et Rimouski : Mackie, Antho, Nisho, Rox, Bousdoch, Cam, mais aussi Manue, Amélie, Pauline et Lupann. Vous avez rendu ma maîtrise aussi agréable qu'enrichissante, merci pour ça.

Une grande reconnaissance à ma maman, cette femme absolument incroyable. Ton courage, ta résilience et ton amour ont fait de moi l'homme que je suis aujourd'hui. Quentin, tu as été mon partenaire durant ces trois dernières années et tu l'es encore aujourd'hui, tu m'as soutenu pendant tout ce temps. Ça a été un vrai bonheur de t'avoir à mes côtés.

Pour finir, je tiens à remercier tous mes amis de l'INRS et de l'UQAR, mais aussi les copains et copines de France et du Québec. Vous m'avez démontré une telle ouverture d'esprit, votre amour et votre partage à travers tous ces beaux moments qu'on a passés ensemble.

Merci à tou·te·s.

RÉSUMÉ

Dans un monde affecté par les changements globaux, aux activités anthropiques croissantes, les organismes aquatiques sont exposés de façon chronique à de multiples sources de stress, tels que les rejets miniers ou la variation de température. De nombreuses études ont démontré les effets de ces facteurs de stress individuels sur la mitochondrie, organite au cœur du métabolisme énergétique aérobie. Cependant, les études traitant des facteurs de stress simultanés sont encore rares. Cette étude met l'emphase sur les effets combinés du nickel (Ni) et de la température sur la fonction mitochondriale de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Pour cela, des truites juvéniles ont été acclimatées à deux températures contrastées (5 °C et 15 °C) en présence ou non de nickel (520 µg Ni/L). Après avoir mesuré des indices biométriques, j'ai mesuré l'activité des enzymes du système de transport des électrons (ETS) et la citrate synthase (CS), la peroxydation lipidique, et enfin dressé des profils d'acides gras phospholipidiques membranaires des mitochondries de foie. Seule la température a eu un effet sur les indices biométriques. Le Ni a affecté la réponse normale de la composition membranaire face à la variation de température. La peroxydation lipidique fut grandement inhibée par l'interaction entre le Ni et l'augmentation de température, là où la proportion en acides gras polyinsaturés était la plus élevée. La variation des ratios d'activités de l'ETS et la CS causée par le Ni à plus haute température suggère une accumulation potentielle d'électrons dans la membrane, ainsi qu'une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO). De plus, le faible taux de peroxydation lipidique et la diminution de l'activité du complexe IV de l'ETS suggèrent une diminution du métabolisme mitochondrial, qui pourrait limiter l'induction des ERO par les mitochondries. Les truites arc-en-ciel démontrent une réponse adaptative face au stress synergique induit par la température et le nickel. Sans être en situation de perte de contrôle, les processus alternatifs de détoxification permettent de réduire le stress oxydant, moyennant un coût métabolique plus élevé.

Mots-clés : nickel ; température ; stressés combinés ; mitochondrie ; métabolisme ; truite arc-en-ciel

ABSTRACT

In a world affected by global changes, with increasing anthropogenic activities, aquatic organisms are chronically exposed to multiple sources of stressors, such as mine wastes or temperature fluctuations. Many studies have highlighted effects of these individual stressors on mitochondria because it is the organelle responsible for aerobic energy metabolism. However, only few studies highlight combined effects. This study emphasizes on combined effects of nickel (Ni) and temperature on mitochondrial function of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Juvenile trout were acclimated to two different temperatures (5 °C and 15 °C) with or without nickel exposure (520 µg Ni/L). First, biometric indices were measured. Then, activities of electron transport system (ETS) enzymes and citrate synthase (CS) were measured, together with lipid peroxidation and liver mitochondrial membrane phospholipid fatty acids. Only temperature had effect on condition indices. Ni affected normal response of membrane composition to temperature variation. Lipid peroxidation was decreased by Ni-temperature interaction, while polyunsaturated fatty acid proportion was the highest. Variation of activity ratios of ETS and CS caused by Ni exposure for warm-acclimated fish suggested a potential accumulation of electrons in the membrane, linked with an increased production of reactive oxygen species (ROS). Moreover, lower lipid peroxidation rate and complex IV activity suggested a depletion of the mitochondrial mechanism causing a reduction of ROS production by mitochondria. Rainbow trout seem to adapt under the synergistic stress of nickel and temperature. Fish metabolism remains stable, nevertheless using alternative detoxification mechanisms require a higher metabolic cost.

Keywords : nickel ; temperature ; combined stress ; mitochondria ; metabolism ; rainbow trout

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	V
RÉSUMÉ	VI
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 BIOCHIMIE STRUCTURALE DES MEMBRANES CELLULAIRES	2
1.1.1 <i>Les protéines membranaires</i>	3
1.1.2 <i>Les lipides membranaires</i>	3
1.1.3 <i>Biochimie fonctionnelle</i>	7
1.2 LA MITOCHONDRIE, CET ORGANITE PLEIN D'ÉNERGIE.....	7
1.2.1 <i>Une structure bien singulière</i>	8
1.2.2 <i>La composition membranaire</i>	8
1.2.3 <i>La phosphorylation oxydative (OXPHOS - Oxidative Phosphorylation System)</i>	10
1.2.4 <i>La citrate synthase (CS) et le cycle de Krebs</i>	12
1.3 EFFETS DE LA TEMPERATURE SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE.....	13
1.3.1 <i>Acclimatation des membranes mitochondriales</i>	13
1.3.2 <i>Effets sur les enzymes du système de transport d'électrons</i>	15
1.4 LE STRESS OXYDANT ET LES ESPÈCES REACTIVES DE L'OXYGÈNE (ERO)	16
1.5 LE NICKEL ET SA TOXICITE	17
1.6 LA PEROXYDATION LIPIDIQUE (EN ANGLAIS, LIPID PEROXYDATION - LPO).....	18
1.7 LA TRUITE ARC-EN-CIEL COMME MODÈLE BIOLOGIQUE	20
1.8 PROBLÉMATIQUE, OBJECTIFS ET PRÉSENTATION DE L'ARTICLE	21
2 ARTICLE SCIENTIFIQUE	23
2.1 HIGHLIGHTS	24
2.2 ABSTRACT.....	24
2.3 GRAPHICAL ABSTRACT	25
2.4 KEYWORDS	25
2.5 INTRODUCTION	25
2.6 MATERIALS AND METHODS.....	27
2.6.1 <i>Animals</i>	27

2.6.2	<i>Experimental design</i>	28
2.6.1	<i>Trace metal analysis</i>	28
2.6.2	<i>Isolation of mitochondria</i>	28
2.6.3	<i>Enzyme assays</i>	29
2.6.1	<i>Lipid extraction and phospholipid fatty acid analysis</i>	31
2.6.2	<i>Lipid peroxidation</i>	31
2.6.3	<i>Calculation of indices and statistical analysis</i>	32
2.7	RESULTS.....	32
2.7.1	<i>Fish condition and nickel contamination</i>	32
2.7.2	<i>Mitochondrial enzyme activities</i>	33
2.7.3	<i>Fatty acid composition of membrane phospholipids</i>	35
2.7.4	<i>Lipid peroxidation</i>	36
2.7.5	<i>Relationships among parameters</i>	37
2.8	DISCUSSION.....	39
2.8.1	<i>Ni accumulation, temperature, and biometric indices</i>	39
2.8.2	<i>Effects of Ni and temperature on mitochondrial enzymes</i>	40
2.8.3	<i>Effects of Ni and temperature on the mitochondrial membrane</i>	41
2.8.4	<i>Relationships between mitochondrial membrane and enzymes</i>	42
2.9	CONCLUSION.....	43
2.10	ACKNOWLEDGEMENTS.....	44
3	DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	45
3.1	NICKEL ET TEMPERATURE, ENSEMBLE ON EST PLUS FORTS.....	45
3.2	LA REPONSE AU STRESS METALLIQUE, MODULEE PAR LA TEMPERATURE.....	46
3.3	UNE NOTE A TOI, FUTUR ETUDIANT ECOTOXICOLOGUE.....	48
3.4	CONCLUSION.....	49
4	BIBLIOGRAPHIE	50
5	ANNEXE I	56
6	ANNEXE II	57
7	ANNEXE III	58
8	ANNEXE IV	60

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1	STRUCTURE D'UNE MEMBRANE CELLULAIRE SELON LE MODELE DE LA MOSAÏQUE FLUIDE	2
FIGURE 1.2	SCHEMA DE CLASSIFICATION DES LIPIDES POLAIRES ET NEUTRES	4
FIGURE 1.3	SCHEMA DE CLASSIFICATION DES PHOSPHOLIPIDES SELON LEUR SUBSTITUANT EN SN3	5
FIGURE 1.3	SPHINGOSINE ET ACIDES GRAS, MOLECULES CONSTITUTIVES DES SPHINGOLIPIDES	6
FIGURE 1.5	SCHEMA D'UNE COUPE DE MITOCHONDRIE	8
FIGURE 1.6	SCHEMA DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE	10
FIGURE 1.7	SCHEMA DU CYCLE DE KREBS	12
FIGURE 1.8	SCHEMA DE DEUX MEMBRANES : A. PRINCIPALEMENT CONSTITUEE D'AGPI ; B. CONSTITUEE UNIQUEMENT D'AGS.....	15
FIGURE 1.9	MECANISME SIMPLIFIE DE DETOXICATION DU RADICAL SUPEROXYDE O ₂ [•]	16
FIGURE 1.10	PEROXYDATION LIPIDIQUE INDUITE PAR LE RADICAL [•] OH.....	19
FIGURE 1.11	SCHEMA D'UNE TRUITE ARC-EN-CIEL (<i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>).....	20
FIGURE 2.1	EFFECT OF WARM ACCLIMATION AND Ni EXPOSURE ON RAINBOW TROUT LIVER MITOCHONDRIA ENZYME ACTIVITY RATIOS. A: COMPLEX I (CI) OVER CITRATE SYNTHASE (CS) ; B: CYTOCHROME C OXIDASE (CCO) OVER CITRATE SYNTHASE (CS) ; C: COMPLEX I (CI) OVER CYTOCHROME C OXIDASE (CCO) ; D: COMPLEX I (CI) OVER COMPLEX II (CII). THE EXPERIMENTAL GROUPS ARE CTRL: CONTROLS; Ni: 520.60 µG Ni/L. BARS WITH DIFFERENT LETTERS DIFFER SIGNIFICANTLY AS DETERMINED BY TUKEY'S HSD TEST (P ≤ 0.05).....	34
FIGURE 2.2	LIPID PEROXIDATION LEVEL EXPRESSED AS MDA CONTENT IN RAINBOW TROUT LIVER MITOCHONDRIA AMONG EXPOSURE CONDITIONS. DATA EXPRESSED AS MEAN ± SE (N = 7).	36
FIGURE 2.3	PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) OF BIOMETRIC (HSI, FCF) AND BIOCHEMICAL (CI/CII, CI/CCO, CI/CS, CCO/CS, SFA, MUFA, PUFA, PI AND MDA) PARAMETERS AMONG ALL CONDITIONS. EACH POINT REPRESENTS AN INDIVIDUAL FISH. BLUE POINTS REPRESENT 5 °C CONDITION; GREEN POINTS REPRESENT 5 °C + Ni CONDITION ; YELLOW POINTS REPRESENT 15 °C CONDITION ; RED POINTS REPRESENT 15 °C + Ni CONDITION	38
SUPPLEMENTARY FIGURE 5.1	EFFECT OF WARM ACCLIMATION AND Ni EXPOSURE ON RAINBOW TROUT LIVER MITOCHONDRIA CCO ACTIVITY. BARS WITH DIFFERENT LETTERS DIFFER SIGNIFICANTLY AS DETERMINED BY TUKEY'S HSD TEST (P ≤ 0.05).....	56
SUPPLEMENTARY TABLE 6.1	FATTY ACIDS OF MEMBRANE PHOSPHOLIPIDS (% OF TOTAL FATTY ACIDS) IN RAINBOW TROUT LIVER MITOCHONDRIA FROM EACH EXPOSURE CONDITION (MEAN ± SE ; N = 7). DIFFERENT SUPERScript LETTERS WITHIN A ROW INDICATE SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN CONDITIONS (P ≤ 0.05).	57

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1	COMPOSITION EN LIPIDES DE LA MEMBRANE EXTERNE (OMM) ET DE LA MEMBRANE INTERNE (IMM) DE MITOCHONDRIES.....	9
TABLEAU 2.1	MEAN OF LIVER NI CONCENTRATION (MG G ⁻¹ DRY WEIGHT), HEPATOSOMATIC INDEX (HSI) AND FULTON'S CONDITION FACTOR (FCF) (MEAN ± SE; N = 8) OF RAINBOW TROUT. MEANS WITH DIFFERENT SUPERSCRIT LETTERS DIFFER SIGNIFICANTLY AS DETERMINED BY TUKEY'S HSD TEST (P ≤ 0.05) FOR EACH ROW.	33
TABLEAU 2.2	EFFECTS OF TEMPERATURE, NI AND THEIR INTERACTION AS DETERMINED BY TWO-WAY ANOVA ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL ENZYME ACTIVITY RATIOS (CI/CS, CCO/CS, CI/CCO, CI/CII). VALUES IN BOLD REPRESENT A SIGNIFICANT EFFECT OF TEMPERATURE, NI OR THEIR INTERACTION (P ≤ 0.05).	35
TABLE 2.3	FATTY ACID GROUPS OF MEMBRANE PHOSPHOLIPIDS (SFA, MUFA AND PUFA) (% OF TOTAL FATTY ACID) AND PEROXIDATION INDEX (PI) IN RAINBOW TROUT LIVER MITOCHONDRIA FROM EACH EXPOSURE CONDITION (MEAN ± SE; N = 7). MEANS WITH DIFFERENT SUPERSCRIT LETTERS DIFFERED SIGNIFICANTLY AS DETERMINED BY ONE-WAY ANOVA (P ≤ 0.05). THE SIGNIFICANCE OF COMBINED EFFECTS OF TEMPERATURE AND NI EXPOSURE AS DETERMINED BY TWO-WAY ANOVA IS ALSO REPORTED. VALUES IN BOLD REPRESENT A SIGNIFICANT EFFECT OF TEMPERATURE, NI OR THEIR INTERACTION (P ≤ 0.05).	36
TABLE 2.4	SPEARMAN CORRELATIONS AMONG BIOMETRIC (HSI, FCF) AND BIOCHEMICAL (CI/CII, CI/CCO, CI/CS, CCO/CS, SFA, MUFA, PUFA, PI AND MDA) PARAMETERS IN RAINBOW TROUT FROM THE VARIOUS EXPOSURE CONDITIONS COMBINED (N = 28). NUMBERS IN BOLD INDICATE SIGNIFICANT CORRELATIONS. ASTERISKS DENOTE THE SIGNIFICANCE LEVEL OF THE CORRELATIONS: *0.05; **0.01; ***0.001.	37

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP	adénosine diphosphate
AGMI	acide gras monoinsaturé
AGPI	acide gras polyinsaturé
AGS	acide gras saturé
ATP	adénosine triphosphate
AVH	adaptation homéovisqueuse
CAT	catalase
CI	complexe I
CII	complexe II
CIII	complexe III
CIV / CCO	complexe IV / cytochrome c oxydase
CL	cardiolipine
CS	citrate synthase
ETS	système de transport d'électrons
ERO	espèce réactive de l'oxygène
FCF	facteur de condition de Fulton
GPx	glutathion peroxydase
HSI	indice hépatosomatique
IMM	membrane mitochondriale interne
LPO	peroxydation lipidique
MDA	malondialdéhyde
Ni	nickel
OMM	membrane mitochondriale externe
OXPHOS	phosphorylation oxydative
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidyléthanolamine
PI	indice de peroxydation
ROS	reactive oxygen species
SOD	superoxyde dismutase
T	température

1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le réchauffement climatique est une problématique désormais bien connue du grand public. Les modèles les plus récents des spécialistes du programme mondial de la recherche sur le climat (PMRC) estiment que nous devons nous attendre à une augmentation globale de la température terrestre entre 2,3 °C et 4,5 °C d'ici 60 à 80 ans (Sherwood *et al.*, 2020). Les organismes aquatiques sont particulièrement vulnérables à ces variations de température, puisqu'ils sont en majorité ectothermes, et dépendent donc de leur environnement pour réguler leur température corporelle (Angilletta Jr *et al.*, 2002). La température joue un rôle très important dans le maintien des réactions biochimiques des organismes vivants, et par conséquent, modifier la température d'acclimatation des poissons revient à influencer sur le métabolisme.

Les activités anthropiques étant de plus en plus importantes, les effets de l'humain sur les organismes vivants se font davantage ressentir. Les effluents urbains, l'activité navale ou la production pharmacologique sont des exemples typiques de sources de contaminants. Au Canada, l'activité minière constitue une des principales industries dans le pays. Les rejets métalliques causés par les activités humaines finissent très souvent dans l'environnement et s'intègrent aux écosystèmes environnants. Les poissons se retrouvent donc confrontés à la fois à l'augmentation notable de température et à l'exposition aux métaux.

Les effets combinés des métaux et de la température sur les organismes ectothermes sont nombreux, et gagnent à être davantage étudiés (Sokolova & Lannig, 2008). Cependant, l'analyse à l'échelle subcellulaire des contaminants est encore émergente et repose sur des mécanismes complexes que l'on commence à comprendre.

Dans les prochaines sections, je vous présenterai une revue de littérature concernant la biologie structurale et fonctionnelle de la cellule, et plus particulièrement, la mitochondrie. À cela s'ajoute une bibliographie de deux facteurs de stress, à savoir la température et le nickel. Les objectifs seront abordés et le modèle biologique choisi sera présenté. Enfin, ce manuscrit comporte un article scientifique, suivi d'une discussion et d'une conclusion générale.

1.1 Biochimie structurale des membranes cellulaires

Les membranes biologiques sont des barrières qui protègent et délimitent les cellules et les organites qu'elles contiennent. Elles sont constituées d'un arrangement de lipides en deux couches : la partie dirigée vers l'extérieur étant hydrophile, et celle vers l'intérieur, hydrophobe (Figure 1.1). Cette structure amphiphile confère à la bicouche lipidique un caractère imperméable, et assure ainsi sa stabilité (de Kroon *et al.*, 2013). Les membranes sont principalement constituées de lipides, majoritaires, de protéines (périphériques ou intégrales), et de glucides (Iyer *et al.*, 2018).

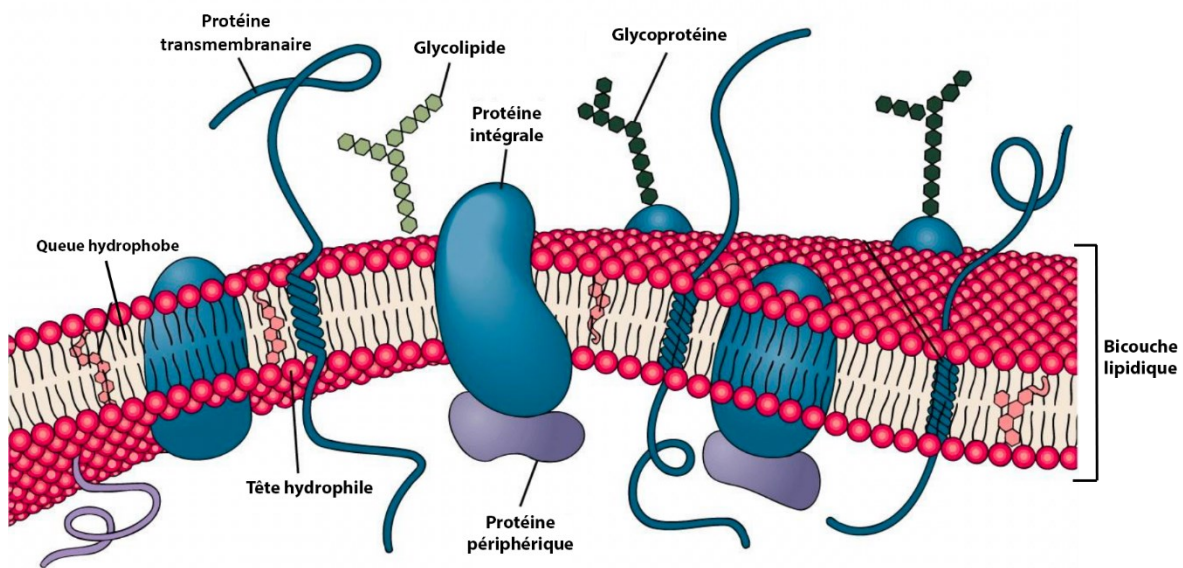


Figure 1.1 Structure d'une membrane cellulaire selon le modèle de la mosaïque fluide

Source : Tirée et modifiée de *Microbiologie BIOL 3253. La cellule procaryote: structures et fonctions*. Présentation ppt consultée le 10 janvier 2021.

http://www8.umoncton.ca/umcm-filion_martin/cours/microbiologie/Chapitre%203.pdf

Cette définition a été introduite en 1935 par Danielli et Davson avec le modèle symétrique, n'incluant pas les protéines (Danielli & Davson, 1935). C'est en 1972, qu'apparaît le modèle actuel, défini par Singer et Nicolson. Ce dernier, appelé « modèle de la mosaïque fluide », repose sur l'idée que la bicouche lipidique comprend également des protéines, distribuées de façon asymétrique dans la structure. De plus, les protéines et lipides sont en mouvement différenciés, faisant émerger l'idée de fluidité membranaire (Singer & Nicolson, 1972). Cette fluidité est nécessaire au contrôle des fonctions cellulaires.

1.1.1 Les protéines membranaires

Les protéines membranaires sont à l'origine de la régulation des échanges entre les cellules et le milieu extracellulaire, mais aussi entre la matrice des organites et le cytosol. Elles sont également responsables de différentes fonctions cellulaires, telles que la compartimentation, la transduction des signaux ou encore la production d'énergie. Le ratio lipides/protéines dans une membrane diffère selon son type (cellulaire, mitochondriale...), le type de cellule (foie, muscle...) ou encore le type d'organisme (plante, animal...) (Karp *et al.*, 2020). De même, protéines et membranes sont liées selon des structures cristallographiques diverses, leur conférant des propriétés uniques (von Heijne, 2006). On note trois catégories de protéines membranaires : les protéines intrinsèques (intégrales), les extrinsèques (périphériques) et celles à ancrage lipidique. Elles se distinguent notamment selon le type de liaison qu'elles forment avec la membrane : les protéines intrinsèques, par leur structure amphiphile, sont liées à la membrane grâce à des interactions hydrophobes. Les protéines extrinsèques, quant à elles, s'associent à la membrane par des forces électrostatiques aux têtes polaires des lipides. Enfin, les protéines à ancrage lipidique sont liées par covalence aux lipides membranaires (Karp *et al.*, 2020).

1.1.2 Les lipides membranaires

Les lipides sont des molécules qui possèdent une propriété physique particulière : ils ne sont que faiblement, voire nullement, solubles dans l'eau, mais présentent une forte solubilité dans les solvants organiques. Essentiellement composés de longues chaînes carbonées, ils peuvent s'enrichir d'autres éléments (tels que le soufre, le phosphore ou l'oxygène) pour former de nouveaux groupes caractéristiques (ester, carboxyle, amino...) et ainsi se doter de propriétés spécifiques. Ils remplissent de nombreux rôles dans l'organisme : principalement structuraux, ils peuvent également servir de messagers intra et intercellulaires, ou de réserve énergétique (Green & Tzagoloff, 1966).

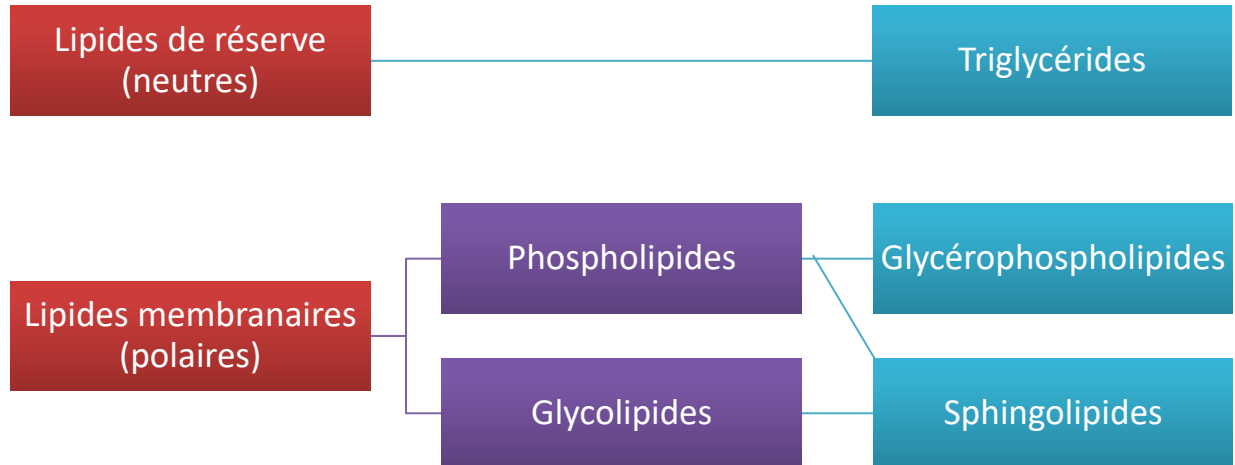


Figure 1.2 Schéma de classification des lipides polaires et neutres

On retrouve deux grandes catégories de lipides, distinguables par leur polarisation. Les lipides neutres (ou apolaires) sont électroneutres et sont largement représentés par les triglycérides. Ils ont comme rôle principal la réserve énergétique (Figure 1.2). Dans le cadre de ce projet, nous nous focaliserons sur les lipides polaires, constitutifs des lipides membranaires. Ceux-ci sont composés d'abord d'une tête polaire, dite hydrophile, dont la structure diffère selon la catégorie du lipide. À cette tête se rajoute une queue apolaire, hydrophobe, constituée de deux ou plusieurs acides gras. Les différences structurelles de la tête et de la queue des lipides membranaires permettent de les classer et de comprendre leur fonction dans la membrane (Colette & Monnier, 2011).

Les phospholipides

Parmi les différentes classes de lipides membranaires, on retrouve notamment les glycérophospholipides et certains sphingolipides. Ces deux sous-groupes sont communément appelés phospholipides. Les glycérophospholipides sont constitués d'un assemblage d'acides gras (liés en position *sn1* et *sn2*), d'un glycérol, d'un groupement phosphate et d'un substituant (en *sn3*) (Akoh, 2017). C'est ce groupement qui vient changer la nature du phospholipide et dont on différencie les classes (Figure 1.3).

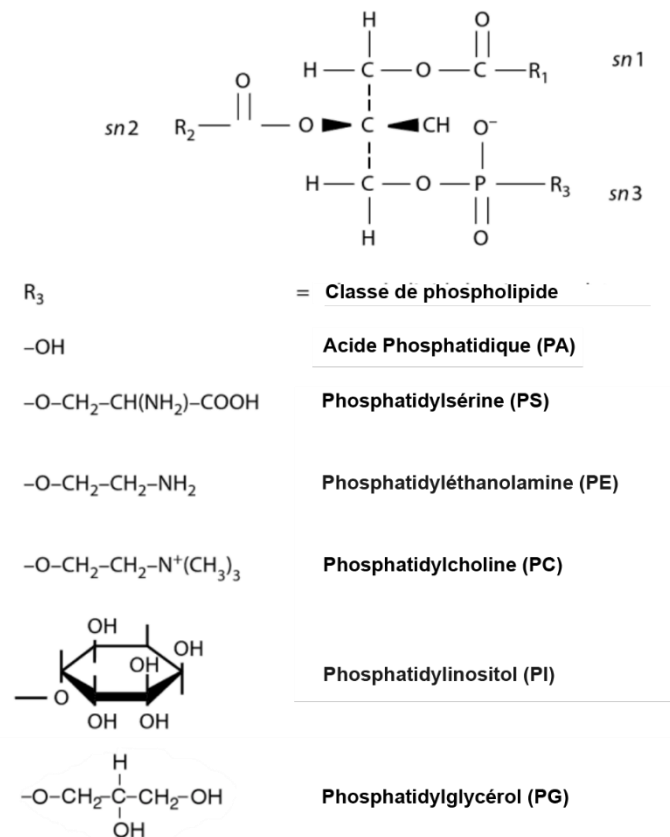


Figure 1.3 Schéma de classification des phospholipides selon leur substituant en *sn3*

Source : Tirée et modifiée de Akoh (2017).

Les sphingolipides sont formés à partir de la sphingosine dont le groupement amine (-NH₂) a subi une amidification sur la fonction carboxyle (-COOH) d'un acide gras.

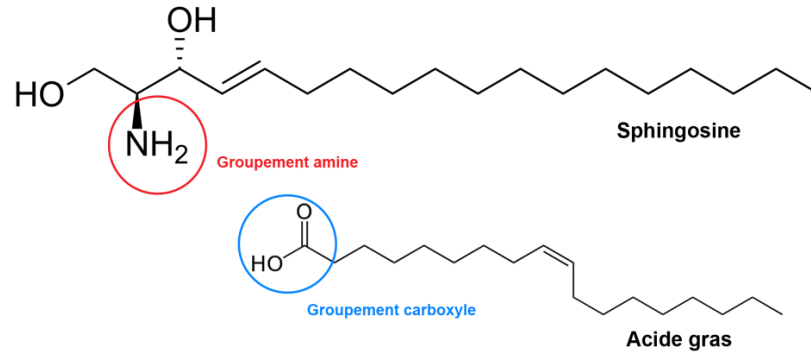


Figure 1.4 Sphingosine et acides gras, molécules constitutives des sphingolipides

Les acides gras

Les acides gras sont des molécules composées d'une chaîne hydrocarbonée de longueur variable, possédant un groupement carboxyle (-COOH) terminal. Ces chaînes carbonées sont linéaires et peuvent posséder une ou plusieurs insaturations : elles résultent de la déshydrogénation de deux atomes de carbone adjacents afin de former une double liaison entre eux. Selon la nomenclature conventionnelle, la structure des acides gras se résume à la formule suivante : Ca : Xn-Y, dans laquelle « a » est le nombre d'atomes de carbone, « X », le nombre de doubles liaisons, et « Y », la position de la première double liaison à partir de l'extrémité opposée au groupement carboxyle. Il existe d'autres conventions utilisées, comme celle du ω (Ca : ω Y), où « ω » représente la position de la première double liaison (Colette & Monnier, 2011). On retrouve trois catégories d'acides gras :

- Les acides gras saturés (AGS) : Leur chaîne carbonée est dite saturée; tous les atomes de carbone sont liés entre eux par des liaisons simples.

- Les acides gras mono-insaturés (AGMI) : La chaîne possède une insaturation; une paire d'atomes de carbone possède une double liaison.

- Les acides gras polyinsaturés (AGPI) : La chaîne possède plusieurs insaturations.

1.1.3 Biochimie fonctionnelle

La structure spécifique en phospholipides dans les membranes n'est pas due au hasard. La fluidité membranaire est modulée par la composition en acides gras des phospholipides, mais aussi par la conformation des chaînes acyles et les interactions entre elles (Zhang & Granick, 2005). En effet, une membrane ordonnée comportant des lipides à longues chaînes saturées aura tendance à être moins fluide, car les interactions y sont favorisées. Les forces mises en jeu maintiennent alors une certaine rigidité dans la structure (McMurchie & Raison, 1979). À l'inverse, une membrane désordonnée, qui comporte des chaînes insaturées et courtes, aura tendance à être plus fluide. Ceci s'explique par la diminution de la surface de contact entre les chaînes, et par l'idée qu'une insaturation confère un point de rotation supplémentaire de la molécule.

De la même manière, l'asymétrie structurale des lipides et des protéines dans la membrane joue un rôle déterminant dans la fluidité membranaire (Singer & Nicolson, 1972). Chaque type de membrane possède sa composition propre afin de répondre aux besoins de la cellule (ou de l'organite) et faire face aux changements dans son environnement, comme la température.

1.2 La mitochondrie, cet organite plein d'énergie

La cellule eucaryote possède des organites, ayant pour chacun un rôle spécifique. Tous sont délimités par leur membrane, ce qui permet de compartimenter le cytoplasme et ordonner les fonctions cellulaires. La mitochondrie est l'un d'entre eux : d'origine bactérienne (Gray *et al.*, 2001), elle démontre une certaine similarité avec ces organismes d'un point de vue biochimique. Cet organite joue un rôle primordial dans la cellule, puisqu'il est à l'origine de la production d'énergie chez les organismes aérobies.

1.2.1 Une structure bien singulière

Les mitochondries diffèrent en nombre, en forme et en taille selon les besoins en énergie et le type de tissus (Tzagoloff, 2012). Leur positionnement intracellulaire également peut varier et dépend de la demande énergétique. Contrairement aux autres organites, la mitochondrie possède deux membranes qui délimitent trois milieux : le cytosol, l'espace intermembranaire, et la matrice mitochondriale. La membrane interne possède d'ailleurs des crêtes mitochondriales, des sortes de replis de la membrane qui permettent d'augmenter sa surface de contact (Figure 1.5). À cette particularité, s'ajoute une perméabilité sélective caractérisée par les différents transporteurs présents au niveau de la membrane interne.

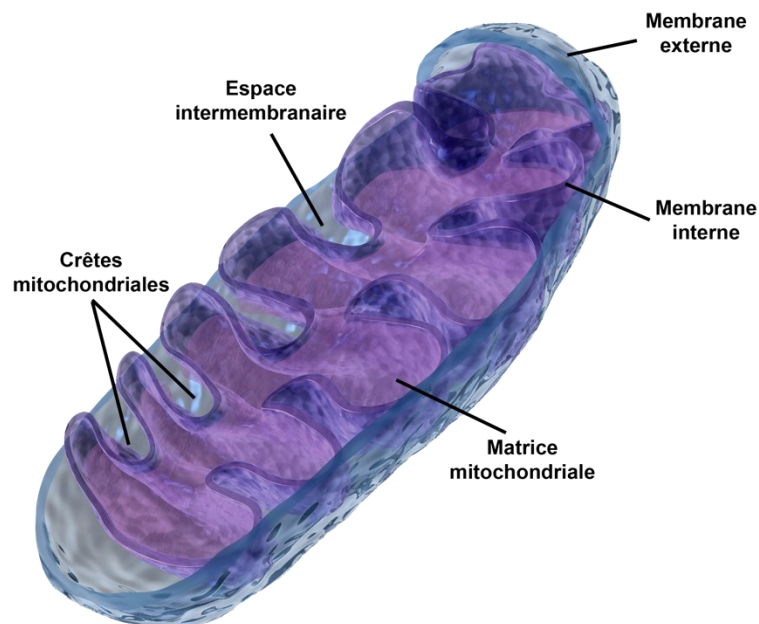


Figure 1.5 Schéma d'une coupe de mitochondrie

Source : Tirée et modifiée de Media Buzzle.com. Image consultée le 10 janvier 2021.
<https://media.buzzle.com/media/images-en/gallery/mammals/1200-96168902-mitochondrion.jpg>

1.2.2 La composition membranaire

Nous avons expliqué précédemment l'importance de la composition dans la membrane (de Kroon *et al.*, 2013). Les membranes mitochondriales possèdent un rapport molaire phospholipide / protéine de 40/60 pour la membrane externe (OMM) et de 80/20

pour la membrane interne (IMM), ce qui en font des membranes hautement spécialisées. Deux phospholipides sont majoritaires, à savoir la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 Composition en lipides de la membrane externe (OMM) et de la membrane interne (IMM) de mitochondries

	Cellules de mammifère (Foie de rat)		Cellules végétales (Chou-fleur)		Levure (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	
	OMM	IMM	OMM	IMM	OMM	IMM
Phospholipides (mg/mg protéine)	0.45	0.20	0.63	0.41	0.91	0.15
Stérols (mg/mg protéine)	0.04	<0.01	0.08	0.03	<0.01	0.03
	% de phospholipides totaux					
Phosphatidylcholine (PC)	54	40	47	42	46	38
Phosphatidyléthanolamine (PE)	29	34	27	38	33	24
Phosphatidylinositol (PII)	13	5	23	5	10	16
Phosphatidylsérine (PS)	2	3	-	-	1	4
Cardiolipine (CL)	<1	18	3	15	6	16
Acide Phosphatidique (PA)	1	-	-	-	4	2

Source : Tiré et modifié de Horvath & Daum, 2013.

La mitochondrie est le seul organite qui possède en sa membrane interne une grande proportion de cardiolipine (CL). Cette molécule particulière, à la différence des autres phospholipides, possède un squelette comportant non pas un, mais trois groupements glycérol, et quatre chaînes d'acides gras au lieu de deux. Cette structure lui confère un rôle particulier dans la mitochondrie. Elle est essentielle au bon fonctionnement des enzymes mitochondriales, notamment celles impliquées dans le système de transport d'électrons (ETS) (Houtkooper & Vaz, 2008).

1.2.3 La phosphorylation oxydative (OXPHOS - Oxidative Phosphorylation System)

La phosphorylation oxydative constitue le mécanisme principal de production énergétique pour les organismes aérobies sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Cette suite de réactions se déroule au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, qui lui vaut le surnom d'usine énergétique de la cellule. En fait, selon la théorie de Mitchell (1961), le potentiel énergétique dû au gradient de protons entre la matrice mitochondriale et l'espace inter-membranaire permet aux différentes enzymes et coenzymes de réaliser la succession de réactions chimiques menant à la production d'ATP. Plus précisément, la capacité des protons à traverser la membrane interne de la mitochondrie depuis la matrice vers l'espace inter-membranaire permet de faire transiter les électrons à partir de cofacteurs d'oxydoréduction réduits comme la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) ou le flavine adénine dinucléotide (FADH_2) vers l'oxygène (O_2) à travers le système de transport des électrons (Figure 1.6).

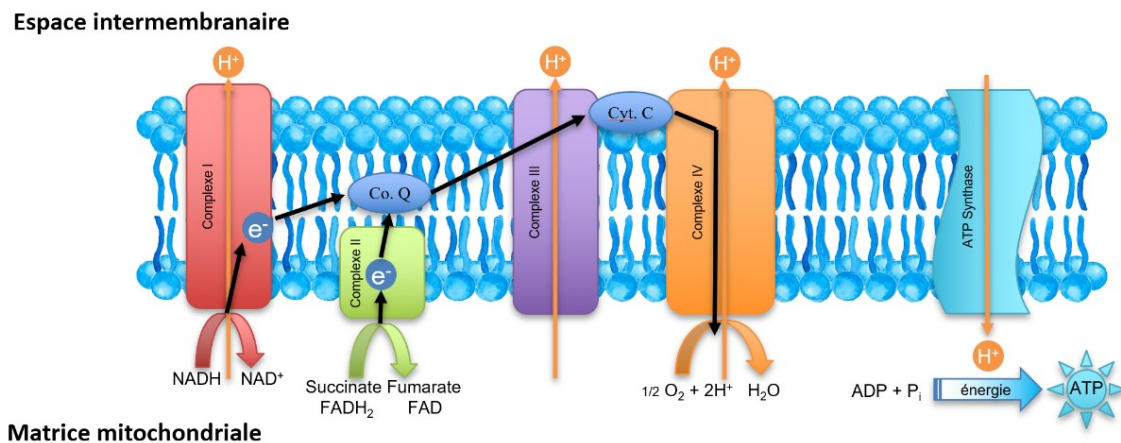


Figure 1.6 Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale

Le transfert d'électrons se produit à travers quatre complexes grâce à des transporteurs spécifiques et accompagne le pompage protonique vers l'espace intermembranaire. Parmi les transporteurs, on retrouve le cytochrome C et la coenzyme Q (ou ubiquinone). Le cytochrome C est une hémoprotéine hydrosoluble qui a la capacité de transférer un électron en se liant au complexe III puis au complexe IV via des réactions

électrostatiques (Yeagle, 2016). La coenzyme Q, liposoluble, peut transférer un ou deux électrons (formant ainsi de l'ubiquinol) vers le complexe III où elle sera oxydée.

Les enzymes liées à l'ETS se déclinent comme ceci :

- **Complexe I - NADH:ubiquinone oxydoréductase (CI)** : Cette enzyme est la première et la plus large de la chaîne respiratoire. En acceptant les électrons du NADH, elle le convertit en NAD^+ et transfère ses électrons vers la coenzyme Q.
- **Complexe II - succinate:ubiquinone oxydoréductase (CII)** : Cette fois-ci, l'enzyme se sert du succinate (FADH_2) pour former du fumarate (FAD) en acceptant un seul électron à la fois. La coenzyme Q sert également de transporteur pour ces électrons. Le CII est lié à la voie d'oxydation des glucides (à contrario de CI qui est lié à la voie d'oxydation des lipides).
- **Complexe III - ubiquinol:cytochrome C oxydoréductase (CIII)** : La troisième enzyme de l'ETS est en fait un regroupement de plusieurs protéines membranaires, dont le but est d'accepter les électrons de la coenzyme Q et de les donner au cytochrome C un à un.
- **Complexe IV - cytochrome C oxydase (CIV ou CCO)** : Le complexe IV, appelé aussi CCO, peut accepter un électron donné par le cytochrome C à la fois, pour le passer à l'oxygène qui va venir former de l'eau. Il faut deux électrons, deux protons et une demi-molécule d' O_2 pour former une molécule H_2O .
- **ATP Synthase** : C'est ici que se produit l'OXPHOS. Le pompage protonique réalisé par les quatre enzymes de l'ETS offre un gradient électrochimique idéal pour l'ATP Synthase. Elle convertit l'énergie dérivée du déplacement des protons vers la matrice en ATP, à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (P_i).

1.2.4 La citrate synthase (CS) et le cycle de Krebs

Afin que la phosphorylation oxydative puisse avoir lieu, la mitochondrie a besoin de coenzymes (telles que le NADH ou le FADH₂) fournies par le cycle de Krebs (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). L'ETS et le cycle de Krebs sont intimement liés et se produisent tous les deux dans la mitochondrie. La CS est l'enzyme qui catalyse la réaction de production du citrate à partir d'oxaloacétate et d'acétyl-CoA. Dans le cycle de Krebs, la CS sert de régulateur, car, en plus d'être fortement exergonique (la réaction se fait spontanément dans le sens de la formation du citrate), la réaction catalysée par la CS est la première du cycle (Ciccarone *et al.*, 2019). Étudier l'activité de la CS permet notamment d'avoir une idée quantitative des mitochondries et peut donc servir comme facteur de normalisation des données enzymatiques selon la quantité et la qualité des mitochondries dans un isolat (Wei *et al.*, 2020).

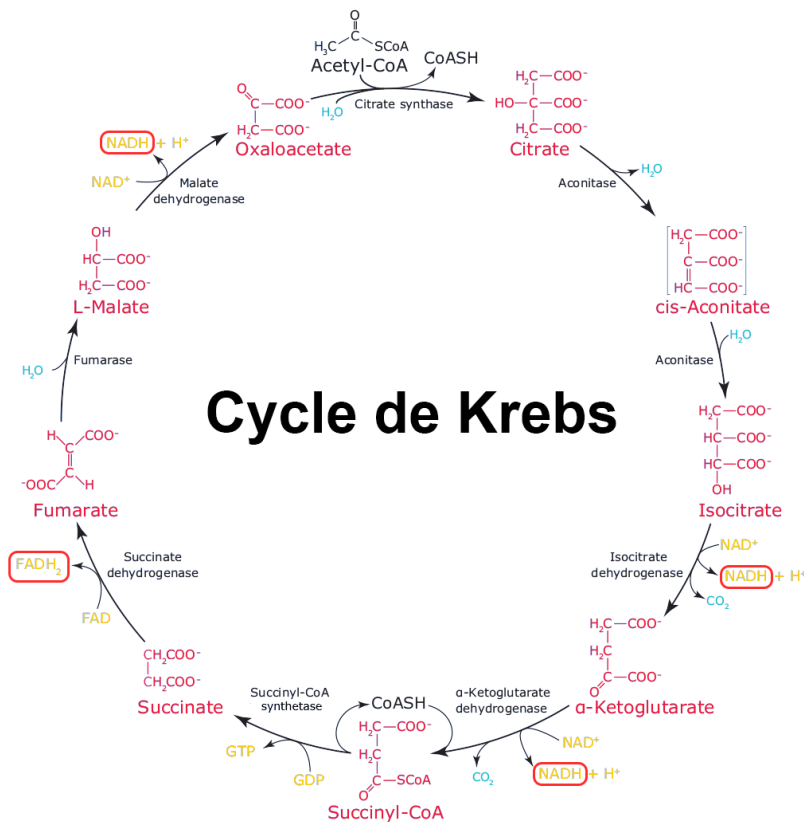


Figure 1.7 Schéma du cycle de Krebs

Source : Tirée et modifiée de *Biofiles* – Sigma Aldrich. Image consultée le 10 janvier 2021. Reproduced with permission from Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biofiles/biofiles-volume-22/TCA-krebs-cycle.png>

1.3 Effets de la température sur la fonction mitochondriale

L'augmentation saisonnière de la température des eaux en milieux lacustres et fluviaux est d'abord un phénomène naturel. En régions canadiennes, la hausse de température au printemps et à l'été peut entraîner une stratification thermique en lac. Cependant, avec le réchauffement climatique, l'augmentation de la température des eaux est inévitable (VijayaVenkataRaman *et al.*, 2012). On envisage aujourd'hui une augmentation de la température atmosphérique moyenne de 0,2 °C par an d'ici les deux prochaines décennies et entre 1,8 °C et 4 °C de plus en 2100. On rapporte également une augmentation de la fréquence des canicules pouvant augmenter la température des eaux de surface de 20 °C au-delà des températures observées jusqu'alors.

Les poissons sont des organismes ectothermes, c'est-à-dire en équilibre thermique avec leur environnement. Ils ne sont pas capables de réguler eux-mêmes leur température corporelle et donc dépendent des conditions climatiques pour se distribuer dans l'espace. Cette dépendance rend plus complexe leur capacité d'adaptation, d'autant plus que leurs cellules et organites (dont la mitochondrie) doivent être capables de supporter les fluctuations locales de température. À plus grande échelle, la distribution biogéographique des organismes est fortement influencée par le facteur thermique. Elle souligne l'importance de ce paramètre sur le métabolisme des poissons, notamment les fonctions mitochondriales et la demande énergétique associée (Blier *et al.*, 2014).

1.3.1 Acclimatation des membranes mitochondriales

D'un point de vue membranaire, les effets de la température sur les poissons font l'objet de recherches depuis un certain temps (Hazel, 1984 ; Cossins & Macdonald, 1989). Ces études ont permis de comprendre le principe d'adaptation homéovisqueuse (AHV) des membranes biologiques. Les acides gras qui composent les phospholipides des membranes sont sujets à transformation selon la température. En fait, à température dite physiologique, la bicouche lipidique se maintient dans un état appelé phase « liquide-cristalline », dans laquelle la fluidité membranaire est optimale pour maintenir son activité.

L'apport de chaleur dans le milieu augmente l'agitation thermique des molécules composant la membrane et peut altérer l'arrangement de la bicouche (Hazel, 1984). L'agitation thermique des phospholipides s'explique entre autres par la rotation des liaisons σ (liaisons simples) entre deux atomes de carbone de leur chaîne acyle. La fluidité membranaire augmente donc, et le maintien de la structure phospholipidique est menacé (Cossins & Macdonald, 1989). À l'inverse, la diminution de température entraîne le ralentissement de l'agitation thermique, au point de créer des zones de « gel » (Hazel, 1984). Une fois atteinte, la phase de gel entraîne une baisse importante de la fluidité membranaire et augmente l'ordre de la bicouche.

La chaîne carbonée des acides gras saturés étant uniquement constituée de liaisons σ , la rotation de ces dernières est assez simple et limitée. Lorsqu'on ajoute des liaisons doubles (liaisons π), autrement dit des insaturations, on augmente la capacité entropique de la molécule et la complexité des rotations possibles (Ernst *et al.*, 2016). Donc, à même température, un AGPI assurera davantage de fluidité à la membrane qu'un AGMI ou encore un AGS (Figure 1.8).

Afin de réguler les effets de la température, les poissons peuvent moduler la composition des membranes mitochondriales : c'est l'adaptation homéovisqueuse (Cossins & Macdonald, 1986). Ainsi, pour maintenir une fluidité optimale, la mitochondrie augmente la proportion d'AGPI et d'AGMI à basse température, ou augmente celle des AGS à haute température.

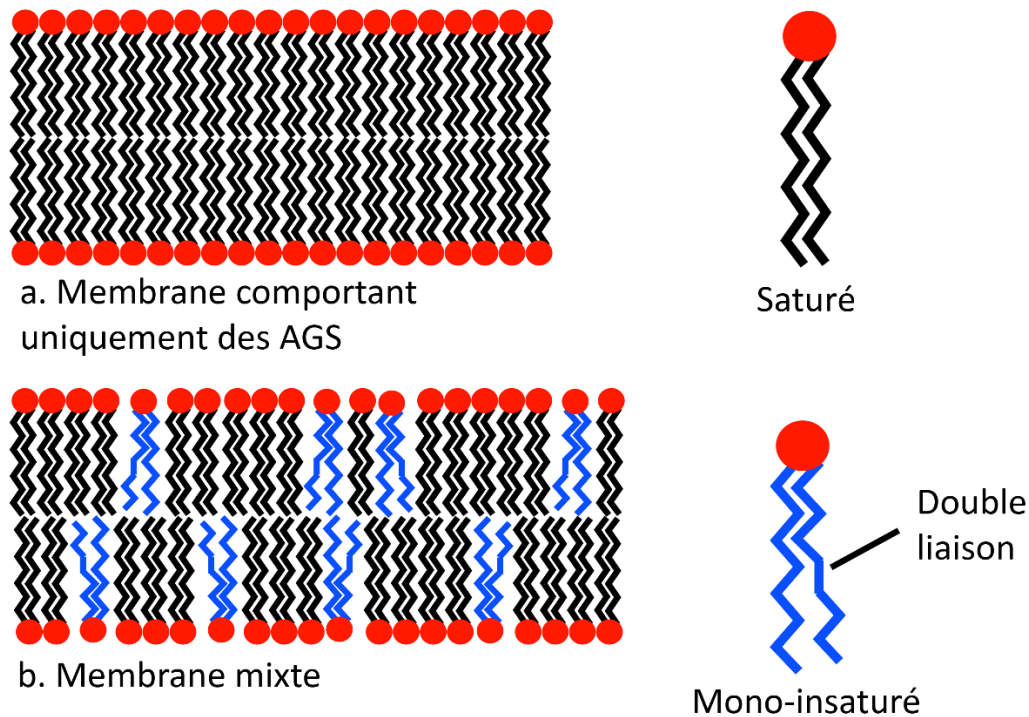


Figure 1.8 Schéma de deux membranes : a. principalement constituée d'AGPI ; b. constituée uniquement d'AGS

Source : Tirée et modifiée de Wikipedia. Image consultée le 10 janvier 2021.

https://fr.wikipedia.org/wiki/Bicouche_lipidique#/media/Fichier:Lipid_unsaturation_effect.svg

1.3.2 Effets sur les enzymes du système de transport d'électrons

Ces ajustements lipidiques ne sont pas les seuls phénomènes qui se produisent à la suite de la variation de température. En effet, les voies métaboliques mitochondriales, comme l'OXPPOS et l'ETS, sont aussi affectées. Chaque enzyme a sa propre sensibilité thermique qui dépend notamment de l'énergie d'activation des réactions associées à ces enzymes (Blier *et al.*, 2014). De plus, la structure secondaire protéique des enzymes (3D) qui dépend de liaisons faibles (non covalentes) hydrogènes ou de Van Der Waals, est aussi affectée par la température (Somero, 1995) et pourrait donc aussi influencer sur leur capacité catalytique et réactionnelle. De manière générale, des facteurs de condition de pression et de température influent grandement sur les réactions chimiques (notamment à cause de changements structuraux des molécules impliquées) comme celles liées à l'OXPPOS ou à l'ETS, mais aussi à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Blier *et al.*, 2014).

1.4 Le stress oxydant et les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Le fonctionnement de l'ETS induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais pour reactive oxygen species). La production d'ERO est liée au transfert des électrons dans l'ETS et à la réduction de l'O₂, principalement au niveau des complexes I et III (Figure 1.6). Cette production est modulée par le niveau de réduction dans le ETS et par la concentration d'O₂ (Long, 2014) :

- Lorsqu'un électron s'échappe et rentre directement en contact avec une molécule d'O₂, il va venir partiellement le réduire pour former un radical superoxyde (O₂^{•-}). Ces molécules sont extrêmement réactives étant donné leur grande capacité à accepter des électrons.
- Très vite, il est pris en charge par l'enzyme appelée superoxyde dismutase (SOD) qui va le dismuter en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).
- Le glutathion peroxydase (GPx) prendra alors le relai en dismutant à son tour le H₂O₂ en H₂O. La catalase (CAT) peut aussi catalyser la conversion H₂O₂ en H₂O (Figure 1.9). Par ailleurs, plusieurs autres mécanismes non enzymatiques existent pour détoxifier les ROS, notamment le cytochrome c, les vitamines E et C, les oligoéléments, ou encore l'ubiquinone (Long, 2014).

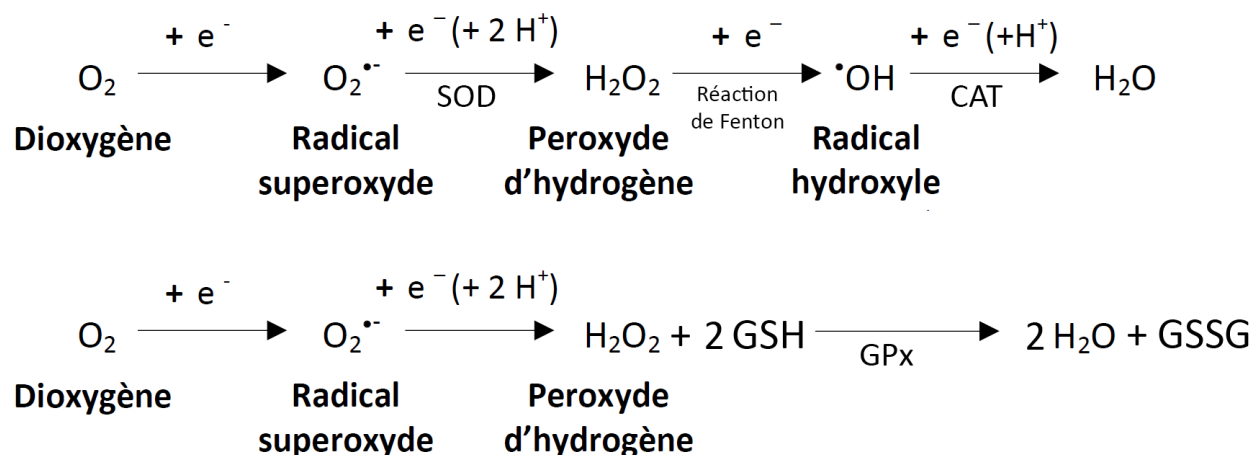


Figure 1.9 Mécanisme simplifié de détoxification du radical superoxyde O₂^{•-}

Source : Tirée et modifiée de Fadhlou, 2017.

Bien que toxiques, les ERO ont aussi un rôle signalétique redox, modulant l'activité métabolique mitochondriale, mais aussi dans le noyau cellulaire et le cytosol (Murphy, 2008). C'est lorsque l'équilibre entre les capacités antioxydantes et la production d'ERO est rompu que l'on parle de stress oxydant. En proportion trop élevée, les ERO peuvent entraîner des altérations à l'ADN et aux protéines, l'inhibition d'enzymes, ainsi que de la peroxydation lipidique. Elles peuvent même mener à l'apoptose de la cellule, en activant la perméabilisation membranaire de la mitochondrie qui laissera s'échapper des protéines telles que le cytochrome C (Murphy, 2008).

1.5 Le nickel et sa toxicité

Le Ni est un métal omniprésent dans les écosystèmes aquatiques, dont la concentration augmente du fait des activités anthropiques. C'est un nutriment essentiel aux animaux terrestres et aux plantes, sans l'être pour les organismes aquatiques. Il semblerait par contre qu'il puisse être utile aux poissons, notamment par l'homéostasie du Ni chez la truite arc-en-ciel, caractéristique propre aux métaux essentiels (Pyle & Couture, 2011). Le nickel se spécifie majoritairement en Ni^{2+} aux pH que l'on retrouve en milieu aqueux, c'est d'ailleurs sous cette forme que la majorité des études s'intéressent au Ni (Mandal *et al.*, 2002). Contrairement à des métaux plus toxiques comme le cadmium ou le cuivre, le nickel suscite moins d'intérêts en recherche : il est pourtant à l'origine de contaminations chroniques (Pane *et al.*, 2003b) qui gagnent à être étudiées, d'autant plus que la demande mondiale ainsi que l'utilisation de ce métal augmentent. On note par exemple son intérêt dans les batteries au lithium présentes dans les voitures électriques, qui représente un marché en expansion.

Des critères environnementaux sont établis pour indiquer les risques de toxicité du Ni selon une concentration maximale en environnement aquatique. Au Québec, ces valeurs varient entre 130 et 3000 $\mu g Ni/L$ (toxicité aigüe) et entre 7,4 et 170 $\mu g Ni/L$ (toxicité chronique) pour les eaux de surface, en fonction de la dureté de l'eau (MELCC, 2019). L'Agence américaine de protection de l'environnement (USEPA) préconise une concentration maximale de 470 $\mu g Ni/L$ (toxicité aigüe) et 52 $\mu g Ni/L$ (toxicité chronique)

(USEPA, 1995). En milieu contaminé, on retrouve des concentrations de Ni qui peuvent aller bien au-delà des limites fixées par les administrations, notamment autour des mines de Sudbury, en Ontario, où les activités minières sont des sources de Ni en grande quantité depuis plus de 130 ans (Gauthier *et al.*, 2006 ; Winterhalder, 1995).

Le Ni possède une cytotoxicité et une génotoxicité répertoriée (Denkhaus & Salnikow, 2002 ; Lee *et al.*, 2016) et affecte également la fonction respiratoire (Pane *et al.*, 2003b). Il a été montré que durant la détoxification de O_2^{\cdot} , en présence de cations métalliques tels que le Ni^{2+} , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 génère un radical hydroxyle ($\cdot OH$) beaucoup plus réactif et dangereux que O_2^{\cdot} , par la réaction de Fenton (Torreilles & Guérin, 1990a ; Torreilles & Guérin, 1990b).

1.6 La peroxydation lipidique (en anglais, lipid peroxydation - LPO)

Ce phénomène concerne tous les lipides en présence d'oxygène, notamment ceux en présence au niveau des membranes mitochondriales. La peroxydation lipidique peut affecter de nombreuses fonctions membranaires, telles que la fluidité, la perméabilité et l'activité des enzymes de l'ETS. On note aussi que les cardiolipides mitochondriaux oxydés peuvent servir de signaux au déclenchement de l'apoptose (Nakagawa, 2004). Les AGPI sont particulièrement sensibles à la LPO, ce qui explique que les membranes biologiques, chargées en ce type d'acides gras, soient fortement affectées (Cillard & Cillard, 2006).

Le mécanisme réactionnel de la peroxydation lipidique suit ce qu'on appelle une réaction radicalaire en chaîne. Elle est composée d'une initiation, d'une propagation et d'une terminaison (Figure 1.10) :

- I. Tout d'abord, un atome d'hydrogène (H) est arraché de l'acide gras (L) par un élément très réactif, tel que $\cdot OH$. Rappelons que les AGPI sont particulièrement vulnérables, du fait des liaisons π qui entourent le groupe C-H visé, et diminuent électroniquement la force de leur liaison. Une réorganisation des liaisons π se forme alors afin de maintenir la stabilité de la molécule.

- II. Ensuite, le diène conjugué formé (L') va réagir avec le dioxygène O₂ pour former un radical peroxy (LOO[•]) qui, très réactif à son tour, va arracher un H au L suivant. En plus de cycliser le processus en produisant des L', les radicaux peroxy hydrogénés forment des hydroperoxydes lipidiques (LOOH) de plusieurs configurations stéréochimiques possibles.
- III. Ce cycle, qui atteint potentiellement sa vitesse maximale, finit par ralentir lorsque la proportion de produits non radicalaires augmente : la terminaison se produit donc, brisant le cycle. Certains antioxydants sont capables d'induire la terminaison de la peroxydation en s'attaquant directement aux LOO[•], ils sont appelés « chain breaking » (Cillard & Cillard, 2006).

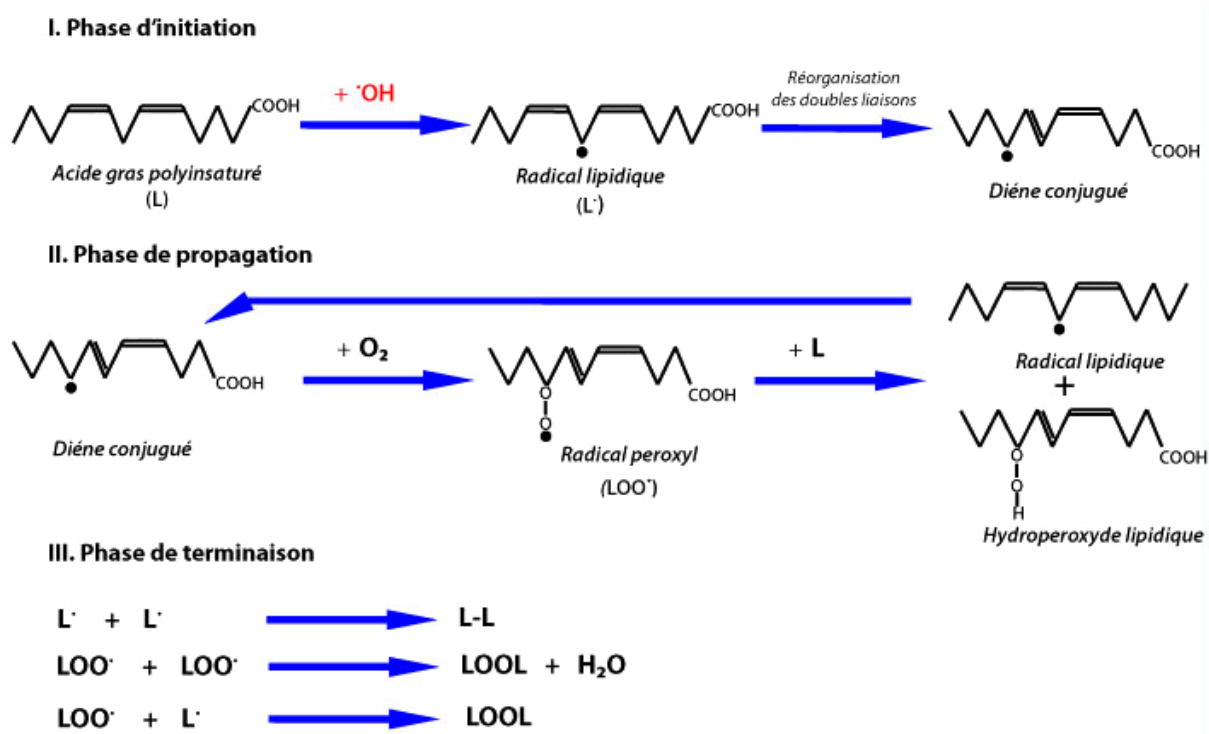


Figure 1.10 Peroxydation lipidique induite par le radical [•]OH

Source : Tirée et modifiée de Biologie de la peau. Image consultée le 10 janvier 2021.

<https://biologiedelapeau.fr/spip.php?mot152>

Les conséquences de la peroxydation lipidique sont variées. En plus des radicaux libres formés, des aldéhydes tels que la malondialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxy-2-

hexenal (4-HHE) sont produits, attaquant sélectivement les biomolécules comme les protéines ou les lipides. Dans le cas de la mitochondrie, la LPO induit des effets délétères sur la perméabilité et la fluidité membranaire, et par conséquent la perturbation de l'activité enzymatique, voire à l'induction de fuites de protons à travers la membrane.

1.7 La truite arc-en-ciel comme modèle biologique

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), appelée aussi truite argentée, est un poisson de la famille des salmonidés. De forme allongée, elle possède une grande bouche avec des dents apparentes, une bande rougeâtre sur les flancs et une nageoire caudale de forme carrée (Figure 1.11). Habitée aux eaux fraîches, la température de croissance idéale de la truite arc-en-ciel juvénile se trouve entre 15 °C et 18.6 °C. Au-delà de 24 °C, se trouve sa température maximale critique aigüe (Adams, 2020). On la retrouve principalement en rivières peu profondes et graveleuses, en lac à grande végétation ou en hautfonds marins. Son alimentation varie en fonction de sa taille et elle est exclusivement carnivore. Enfin, son cycle de reproduction s'effectue durant le printemps, parfois en automne chez certaines populations (MFFP, 2016).



Figure 1.11 Schéma d'une truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Source : Tirée de U.S. Fish and Wildlife Service. Image consultée le 10 janvier 2021.

<https://digitalmedia.fws.gov/digital/collection/natdiglib/id/27690/rec/115>

La truite arc-en-ciel, en tant que modèle biologique, a permis de comprendre les effets des métaux sur les poissons (Wood, 2001), notamment comment le Ni affecte les échanges respiratoires (Pane *et al.*, 2003a). L'importance des effets de certains métaux

sur le potentiel membranaire et la respiration mitochondriale de cette espèce est de plus en plus répertoriée (Adiele *et al.*, 2012 ; Sharaf *et al.*, 2017), cependant les études reliées au Ni restent sporadiques, voire inexistantes. L'intérêt d'utiliser la truite arc-en-ciel dans ce projet est donc d'étudier les effets structuraux des contaminants sur la mitochondrie, en situation de multi-stress, en utilisant le Ni comme facteur métallique.

1.8 Problématique, objectifs et présentation de l'article

Bien que les effets de facteurs de stress thermiques et métalliques sur les fonctions mitochondriales de poissons ont déjà été étudiés séparément (Adiele *et al.*, 2010 ; Couture & Rajotte, 2003 ; Egginton & Sidell, 1989), leurs effets combinés sont encore méconnus ; cette lacune est d'autant plus importante que leurs effets combinés pourraient être synergiques. Pour investiguer la réponse multi-stress, nous devons entre autres comprendre les interactions entre le Ni et la température sur (1) la composition phospholipidique des membranes et (2) le métabolisme énergétique mitochondrial. Nous serons par la suite en mesure de mieux appréhender comment les modifications de la composition membranaire affectent le mécanisme aérobie.

Une hypothèse générale dans ce contexte serait que l'augmentation de température ralentit le métabolisme mitochondrial, à travers la perturbation des mécanismes de respiration mitochondriale. Ainsi, l'organisme serait davantage sujet à dommages structuraux de la membrane, en lien avec le stress oxydant. À plus haute température, le Ni pourrait avoir des effets synergiques, non pas à cause de l'absorption du métal selon la température (qui reste dans la fenêtre de température idéale du poisson), mais plutôt par le mécanisme de toxicité du Ni (qui dépend de mécanismes respiratoires contrairement à d'autres métaux (Pane *et al.*, 2003a)).

Suivant cet objectif, j'ai rédigé un article qui tente de répondre à ces questions, article intitulé : *Modulation thermique de la fonction mitochondriale perturbée le nickel environnemental chez la truite arc-en-ciel (Oncorhynchus mykiss)*. L'expérimentation comprenait l'acclimatation de truites arc-en-ciel juvéniles à deux températures contrastées, puis une exposition au Ni. À la suite de cela, les foies des individus ont été échantillonnés pour en isoler les mitochondries. Après avoir dosé les concentrations de

métal selon la température, l'isolat purifié a permis d'analyser différentes enzymes du système de transport des électrons et une enzyme associée au cycle de Krebs. De plus, des profils d'acides gras phospholipidiques des membranes d'une fraction enrichie en mitochondries ont été établis, selon les différentes conditions expérimentales, afin de mieux connaître la structure de l'organite. Enfin, une étude d'un sous-produit de la peroxydation lipidique a été réalisée afin d'évaluer les dommages à la membrane mitochondriale.

Tous ces paramètres, analysés ensemble, permettront de mieux comprendre les relations entre la structure membranaire et la fonction métabolique de la mitochondrie, en présence de facteurs de stress combinés. Mon projet de recherche constitue une première étape dans l'étude écotoxicologique du Ni et de la température à l'échelle subcellulaire chez les poissons et suscitera, je l'espère, bien d'autres questionnements à l'avenir.

2 ARTICLE SCIENTIFIQUE

Thermal modulation of mitochondrial function perturbed by environmental nickel in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

*Modulation thermique de la fonction mitochondriale perturbée le nickel environnemental chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)*

Elyas Aissia¹, Pierre Blier², Mariem Fadhlou¹, Patrice Couture¹

¹ Institut National de la Recherche Scientifique – Centre Eau Terre Environnement, Québec, Québec, Canada

² Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Québec, Canada

En préparation pour *Aquatic Toxicology*

Rôles des auteurs :

Elyas Aissia

Réalisation de l'expérience, analyse et interprétation des données, rédaction

Pierre Blier

Co-direction des travaux de recherche d'Elyas Aissia, soutien technique et académique pour mener à bien les analyses enzymatiques et les isolations de mitochondrie, assistance dans l'interprétation des données

Mariem Fadhlou

Formation et soutien technique et académique à différentes techniques analytiques, notamment les profils d'acides gras phospholipidiques membranaires et le dosage de la malondialdéhyde

Patrice Couture

Direction et révision des travaux de recherche d'Elyas Aissia et contribution au soutien financier par le biais d'une subvention du CRSNG, programme à la découverte

2.1 Highlights

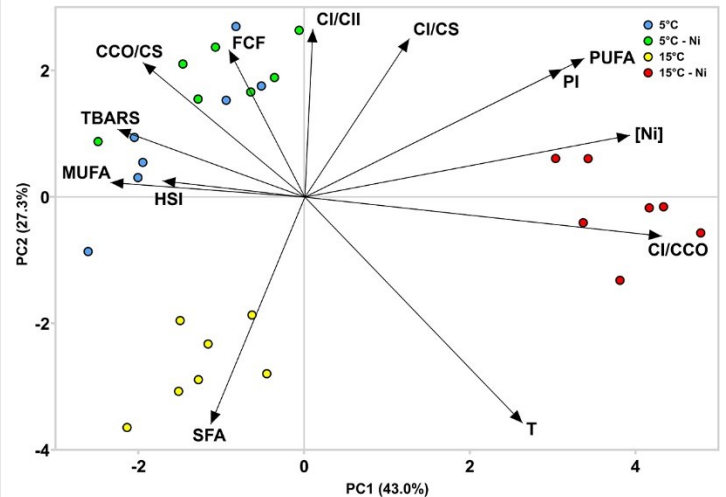
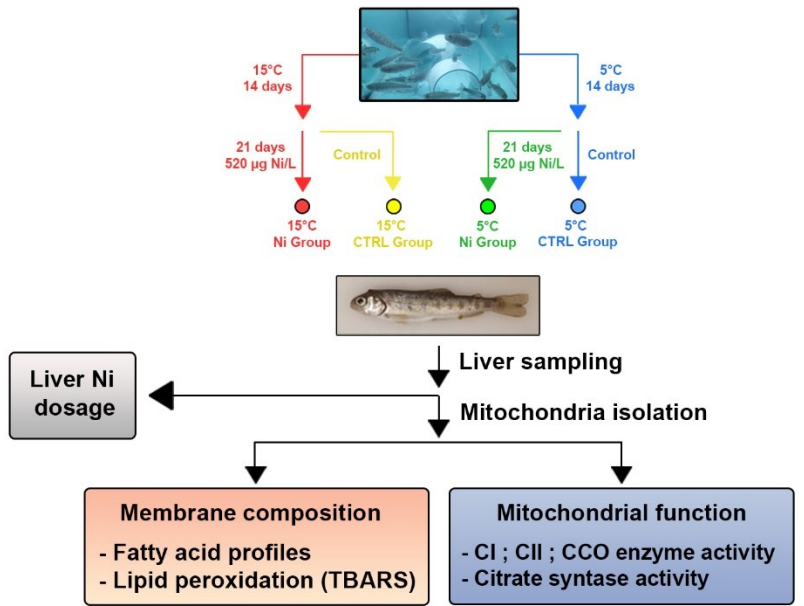
- Ni exposure affected mitochondrial membrane phospholipid fatty acid response to temperature.
- Ni and temperature acted synergistically on ETS enzymes activities.
- Ni and temperature stimulated mitochondrial ROS production by the ETS.
- PCA suggests a remodelling of mitochondrial phenotype to compensate oxidative stress induced by Ni and temperature.

2.2 Abstract

In this study, we investigated combined effects of temperature and nickel contamination on liver mitochondria electron transport system (ETS) enzymes, citrate synthase (CS), phospholipid fatty acid composition and lipid peroxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Juvenile trout were acclimated for two weeks to two different temperatures (5 °C and 15 °C) and exposed to nickel (520 µg/L) for three weeks. Using ratios of ETS enzymes and CS activities, our data suggest a higher reduction status of ETS caused by nickel's and temperature's synergistic effect. Anticipated response of phospholipid fatty acid profiles to thermal variation was altered under nickel exposure. In control conditions, saturated fatty acid (SFA) proportion was higher at 15 °C than at 5 °C while the opposite was observed in monounsaturated fatty acid (MUFA) and polyunsaturated fatty acid (PUFA) proportions. However, for nickel contaminated fish, SFA proportion was higher at 5 °C than at 15 °C while PUFA and MUFA proportions followed the opposite direction. Higher PUFA ratio is associated with higher vulnerability to lipid peroxidation. Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) content was in accordance with this theory, except for warm-acclimated fish under nickel exposure. We reported the lowest level of TBARS in that last condition and led us to suspect that interaction of nickel and temperature affected lipid peroxidation mechanism as well as aerobic energy metabolism. These results were in concordance with complex IV of ETS enzyme activity drop, suggesting that combined temperature rise and nickel exposure

can lead to an increase of metabolic demand, caused by the remodelling of mitochondrial phenotype and by alternative antioxidant mechanisms.

2.3 Graphical Abstract



2.4 Keywords

Fish; Mitochondria; Temperature; Nickel; Electron Transport System; Lipid peroxidation

2.5 Introduction

Climate change is a challenge to which fish need to adapt. Poikilothermic organisms counteract the effects of temperature variation by modulating membrane phospholipidic fatty acids as predicted by the homeoviscous theory (Hazel, 1995). This modulation induces adjustment of membrane fluidity and permeability to ensure the stability of membrane function. Among cellular functions, mitochondria stand for an important role. The thermal sensitivity of this organelle plays a key role in animal tolerance to temperature fluctuations (Blier *et al.*, 2014). Through oxidative phosphorylation (OXPHOS), aerobic organisms produce energy in mitochondria by generating adenosine triphosphate (ATP), relying on electron transport system (ETS) enzymes (Hatefi, 1985).

These complexes are located in the inner mitochondrial membrane and are dependent on its integrity to ensure proper function (Kraffe *et al.*, 2007). During OXPHOS, the production of reactive oxygen species (ROS) is a normal outcome of the process. Overproduction of ROS can lead to side effects such as DNA damage, along with enzyme inhibition and lipid peroxidation (LPO) (Murphy, 2008). Given the toxicity of ROS, various antioxidant mechanisms are present in order to detoxify these molecules. Temperature variation can affect mitochondrial lipid structure and hence disrupt ETS enzyme activity. Moreover, there is evidence that ROS production is also modulated by temperature (Blier *et al.*, 2014). Fulton's condition factor (FCF) and hepatosomatic index (HSI) are good indices to assess variations in energy storage of the fish depending on the conditions. The HSI relies on the relative weight of the liver, which is a major energy store (Chellappa *et al.*, 1995). This energy is vital for the fish, especially when resources are needed in order to respond to stressors.

Nickel (Ni) is known to be essential in microorganisms and plants, in relation with Ni-containing enzymes and proteins. While nickel essentiality has not been established for aquatic organisms, its potential importance for fish remains unknown (Pyle & Couture, 2011). There is a growing demand toward this metal around the globe, leading to an increase of nickel mining and environmental contamination from mines and smelters, but also from more diffuse sources such as municipal and industrial effluents and airborne particulate matter (Pyle & Couture, 2011). Nickel contamination of aquatic ecosystems is an issue worldwide. Ni toxicity is characterized by its genotoxicity, mutagenicity and cytotoxicity (Denkhaus & Salnikow, 2002 ; Lee *et al.*, 2016). Although its toxicity mechanisms in fish are still not clear, various studies reported that metal-exposed fish develop physiological disorders, including lower aerobic capacities, ionoregulation impairment and oxidative stress (Couture & Pyle, 2008 ; Couture & Rajender Kumar, 2003 ; McGeer *et al.*, 2000). Nickel is capable of inducing oxidative stress through ROS formation and through Haber-Weiss/Fenton reactions (Torreilles & Guérin, 1990a).

Very few studies have investigated the effects of nickel on fish mitochondrial metabolism. Experiment on goldfish liver mitochondria reported enhancements of cytochrome c oxidase (CCO) and citrate synthase activities (CS) by Ni exposure (Garceau *et al.*, 2010). However, there was no evidence of effect upon mitochondrial respiration. In the

environment, aquatic organisms are exposed to multiple stressors, such as temperature variations and metal contamination. The multistress approach is relatively recent and is gaining interest in aquatic ecotoxicology (Fadhlaoui *et al.*, 2018 ; Grasset *et al.*, 2014). To our knowledge, this is the first study to investigate the effects of Ni and temperature, separately or combined, simultaneously on mitochondrial fatty acid composition, ETS enzymes and lipid peroxidation. The main objective of our study was to assess effects of Ni and temperature on mitochondrial function and composition and determine potential synergistic or antagonistic effects. We acclimated juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to two contrasting temperatures and subsequently exposed half of them to Ni concentrations that are typical of contaminated areas (Pyle & Couture, 2011). Rainbow trout were selected based on their wide use in ecotoxicological studies and due to their low tolerance to elevated temperatures, as cold-water stenotherms. Rainbow trout can also be found around Ni mining sites, such as Sudbury, Canada area. A recent study suggested an optimal growth temperature range between 15 °C et 18.6 °C for this species (Adams, 2020), however higher latitude fish shown lower temperature tolerance (Verhille *et al.*, 2016). We measured the activity of three of the four ETS complexes. We included the determination of citrate synthase (CS) activity, as a marker of Krebs cycle overall mitochondrial content. We also measured mitochondrial membrane phospholipid fatty acid composition and TBARS concentration, an indicator of lipid peroxidation.

2.6 Materials and Methods

2.6.1 Animals

Juvenile (8-10 g) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were purchased from St-Alexis-des-Monts Fish Farm, Saint-Alexis-des-Monts, QC, Canada. Fish were acclimated for two weeks at 8 °C to aerated, dechlorinated municipal tap water and were fed *ad libitum* daily with Nutra Fry® feed. Following acclimation, 20 fish were placed in each of twelve 40 L aquaria for experimentation. Temperature was reduced in 6 aquaria and raised in 6 aquaria at a rate of 1 °C per day in order to reach their experimental temperatures: a low (5 °C) and a high (15 °C) temperature.

2.6.2 Experimental design

When desired temperatures were reached in each group, fish were acclimated to their respective temperature for 14 days. Thereafter, fish were exposed for 21 days to two different aqueous Ni concentrations: $0.2 \pm 0.01 \mu\text{g Ni/L}$ (control) and $520.6 \pm 19.04 \mu\text{g Ni/L}$ which corresponds to realistic concentrations in contaminated environments (Couture *et al.*, 2008). Experiments were made in triplicate. Fish were sacrificed by a blow to the head after 21 days of exposure, then biometric measures (total weight, liver weight, fork length) were rapidly taken and livers were flash-frozen then stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. All procedures were approved by our institutional animal care committee.

2.6.1 Trace metal analysis

Trace metal analysis was performed at the Institut national de la recherche scientifique (INRS), in Quebec City, Qc, Canada, by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (ICP-MS, Thermo Elemental, Model X-7) following (Pierron *et al.*, 2009) including modifications. Water samples were acidified by 2% of trace metal grade nitric acid. The freeze-dried liver samples were digested in 15 mL acid-washed polypropylene tubes with 1 mL of trace metal grade nitric acid for 2 days, and then heated for 2 h at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ in order to speed up the digestion process. Thereafter, 750 μL of hydrogen peroxide were added and samples were set aside for 24 h. Digests were then diluted with ultrapure MilliQ water to achieve 10% of acid. Reference materials used were lobster hepatopancreas (TORT-3) and dogfish liver (DOLT-5) (National Research Council, Canada) alongside of each set of samples. Trace nickel concentrations are expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight (dw).

2.6.2 Isolation of mitochondria

A small fraction (8-10 mg) of each liver sample was set aside for trace metal analysis before isolation. Liver mitochondria were isolated following protocols outlined in Urien *et al.*, (2018) with some modifications. Liver homogenates were centrifuged for 10

min at 600 g. Pellets were discarded and supernatants were centrifuged for 10 min at 9000 g with 10 volumes of isolation buffer. Supernatants were then discarded and pellets were resuspended with a few drops of buffer. A total of 64 fish were used for mitochondrial isolation. Sixteen fish from each of the four treatments were randomly chosen for analysis, which resulted in a total of eight liver mitochondrial samples per treatment, since livers from two individuals from the same exposure treatment were pooled in order to gather enough tissue to perform subsequent analyses.

2.6.3 Enzyme assays

All enzyme assays were performed at the Université du Québec à Rimouski (UQAR), in Rimouski, Qc, Canada, using a UV-Vis spectrophotometer (EnVision 2105 Multimode Plate Reader, PerkinElmer Inc., Waltham, USA) at room temperature (20 °C). Protein concentration was measured following to the dye-binding method (Bradford, 1976). Enzyme activities were expressed as $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of total proteins.

Complex I (EC 1.6.5.3, NADH:ubiquinone oxidoreductase; CI) activity

Complex I activity was measured following the protocol described in Spinazzi *et al.*, (2012) with some modifications. Isolated mitochondria were freeze-thawed twice in hypotonic buffer before measuring complex I activity in order to liberate the membrane-bound enzyme. Substrate and homogenate volumes were adjusted to fit in wells of a 96-well microplate. Five microliters of isolated mitochondria were added to 175 μL of distilled water in order to induce an osmotic shock. Thereafter, 25 μL of potassium phosphate buffer (0.5 M), 15 μL of BSA (50 mg/mL), 7.5 μL of KCN (10 mM), and 2.5 μL of NADH (10 mM) were added. Alongside each triplicate, a separate well containing the same volume of substrates and homogenate was prepared but including 2.5 μL of rotenone (1 mM), in order to inhibit CI activity. Then, the volume was adjusted to 248.5 μL with distilled water in each well. The baseline was read for 2 min at 340 nm. Subsequently, 1.5 μL of ubiquinone (10 mM) was added in order to initiate the reaction. NADH oxidation was

monitored at 340 nm for 2 min. Complex I activity was calculated by subtracting the rotenone-resistant activity from the total activity (extinction coefficient $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Complex II (EC 1.3.5.1, succinate:ubiquinone oxidoreductase; CII) activity

Complex II activity was measured following the protocol outlined in Spinazzi *et al.*, (2012), including adjustments in order to fit in wells of a 96-well microplate. Isolated mitochondria were freeze-thawed twice in hypotonic buffer in order to liberate the membrane-bound enzyme. Subsequently, 150 μL of distilled water, 12.5 μL of potassium phosphate buffer (0.5 M), 5 μL of BSA (50 mg/mL), 7.5 μL of KCN (10 mM), 12.5 μL of succinate (400 mM), 5 μL of isolated mitochondria, and 36 μL of DCPIP (0.015% wt/vol) were added. Again, a separate well containing the same volume of substrates and homogenate was prepared alongside each triplicate but including 2.5 μL of malonate (1 M), in order to check the specificity of CII activity. The volume of each well was adjusted to 249 μL with distilled water. The microplate was then incubated inside the spectrophotometer at 20 °C for 8 min in order to fully activate the succinate, and the baseline was read for 2 minutes at 600 nm afterwards. Thereafter, 1 μL of decylubiquinone (12.5 mM) was added in order to initiate the reaction. DCPIP reduction was monitored at 600 nm for 3 min (extinction coefficient $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Complex IV (EC 1.9.3.1, cytochrome c oxidase; CIV or CCO) activity

A total of 100 mM phosphate buffer (pH 7.0) was primarily prepared. A reduced cytochrome c solution was then prepared by dissolving a pinch of sodium dithionite in a 0.07 mM cytochrome c solution. The excess of sodium dithionite was then evaporated by injecting air for 5 min. Subsequently, a control buffer was prepared, by adding 10 μL of $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ to 990 μL of reduced cytochrome c solution. Isolated mitochondria were freeze-thawed twice in hypotonic buffer in order to liberate the membrane-bound enzyme. Thereafter, 190 μL of reduced cytochrome c solution was added in each sample well of a 96-well microplate, and 200 μL of control buffer in 3 control wells. Ten microliters of

homogenate were then added in each well in order to initiate the reaction. Cytochrome c oxidation was monitored at 550 nm for 7 min (extinction coefficient $18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Citrate Synthase (EC 2.3.3.1, CS) activity

A total of 100 mM phosphate buffer (pH 8.0) was primarily prepared. Subsequently, 170 μL of a solution containing 0.2 mM of acetyl CoA, 100 mM of Tris-HCl and 0.1 mM of 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were added in each well of a 96-well microplate. Ten microliters of homogenate were added in each well then, the baseline was read for 6 minutes at 412 nm. Thereafter, 20 μL of oxaloacetic acid solution (1.5 mM) were added in order to initiate the reaction. Formation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) is monitored at 412 nm for 6 min (extinction coefficient $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.6.1 Lipid extraction and phospholipid fatty acid analysis

The phospholipid fatty acid analysis was performed following the protocol outlined in Fadhlaoui & Couture (2016), including adjustments for mitochondrial fractions. Total lipids were extracted from 20 mg of isolated mitochondria with 15.5 μL of chloroform/methanol mix (2:1, v/v) containing 0.01% (w/v) of butylated hydroxytoluene (BHT). Fatty acid methyl esters (FAME) were analyzed using a gas chromatograph with flame ionization detector (GC-FID, Agilent Technologies, 7890D GC system).

2.6.2 Lipid peroxidation

The assay was performed at the Institut national de la recherche scientifique (INRS), in Quebec City, Qc, Canada, using a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary 100; Varian Inc., Palo Alto, USA) at room temperature (20 °C) in 96-well microplates. Lipid peroxidation was estimated by measuring thiobarbituric acid reactive species (TBARS) using an assay kit (Cat. No. 10009055, Cayman, USA). A total of 25 mg of isolated mitochondria were homogenized in 250 μL of radioimmunoprecipitation assay

buffer containing 150 mM of sodium chloride, 50 mM of Tris-HCl, 1% of Tergitol (NP-40), 0.5% of sodium deoxycholate and 0.1% SDS). Subsequently, homogenates were centrifuged at 1600 g for 10 min at 4°C and supernatants were collected. The assay was then completed as described in Fadhlaoui & Couture, (2016). TBARS was measured at 535 nm.

2.6.3 Calculation of indices and statistical analysis

The indices were calculated according to the following formulas:

Fulton's Condition Factor (FCF) = $[\text{Weight (g)} / (\text{Fish length (mm)})^3] \times 100$.

Hepatosomatic index (HSI) = $(\text{Liver weight (g)} / \text{Fish weight (g)}) \times 100$

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

Statistical analyses were performed with Prism 9.0.0 (GraphPad Software, LCC). Variance homoscedasticity of residuals were checked with Spearman's test prior to performing tests. Type I error (α) was set at 0.05. Comparisons among mean values from different stressor combinations were performed using one-way ANOVA. Interactions between Ni and temperature were determined by two-way ANOVA. *Post-hoc* pairwise comparisons of means were assessed by Tukey's HSD (honestly significant difference) test. Principal Component Analysis (PCA) was applied to evaluate the relationships among tested parameters.

2.7 Results

2.7.1 Fish condition and nickel contamination

Liver Ni concentrations (Table 2.1) were significantly elevated ($F_{1,28} = 60.9$) in both exposure conditions when compared to controls. A higher temperature clearly stimulated Ni uptake, with liver Ni concentrations in the 15 °C Ni treatment being approximately double the concentrations observed in the 5 °C treatment. However, while an increase of

temperature to 15 °C was significantly negatively correlated with HSI and FCF in both exposed and control fish, Ni appeared to have no significant effect on biometric condition indicators at either temperature tested.

Tableau 2.1 Mean of liver Ni concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight), hepatosomatic index (HSI) and Fulton's condition factor (FCF) (mean \pm SE; n = 8) of rainbow trout. Means with different superscript letters differ significantly as determined by Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$) for each row.

	5 °C		15 °C	
	Control	Ni	Control	Ni
Liver Ni	0.71 \pm 0.37 ^c	3.21 \pm 0.80 ^b	0.32 \pm 0.07 ^c	6.61 \pm 1.11 ^a
FCF	1.10 \pm 0.13 ^a	1.09 \pm 0.12 ^a	1.02 \pm 0.08 ^b	0.98 \pm 0.06 ^b
HSI	1.12 \pm 0.23 ^a	1.18 \pm 0.27 ^a	0.92 \pm 0.29 ^b	0.89 \pm 0.17 ^b

2.7.2 Mitochondrial enzyme activities

Warm acclimation and Ni exposure had various effects on mitochondrial enzymes. CI/CS activity ratio (Figure 2.1a) significantly increased under Ni exposure at both 5 °C ($p = 0.0004$) and 15 °C ($p = 0.0008$) compared to their respective control groups. The two-way ANOVA shows that Ni had a more powerful effect on CI/CS than temperature (Table 2.2). In comparison, CCO/CS activity ratio was strongly affected by temperature in both controls and Ni-exposed fish (Figure 2.1b). At 15 °C, Ni exposure induced a much lower ratio than in any other condition tested. The two-way ANOVA indicates that Ni also influenced the CCO/CS ratio. The CI/CCO activity ratio (Figure 2.1c) was drastically increased at 15 °C by Ni exposure ($p < 0.0001$). Like CI/CS, the CI/CII activity ratio (Figure 2.1d) was significantly increased under Ni exposure at both temperatures compared to control groups ($p < 0.0001$). The two-way ANOVA detected a significant interaction of temperature and Ni on CCO/CS, CI/CCO and CI/CII activity ratios (Table 2.2). Moreover, CCO activity was strongly and significantly decreased by Ni-temperature interaction ($F_{1,28} = 114$; $p < 0.0001$) (Supplementary figure 5.1).

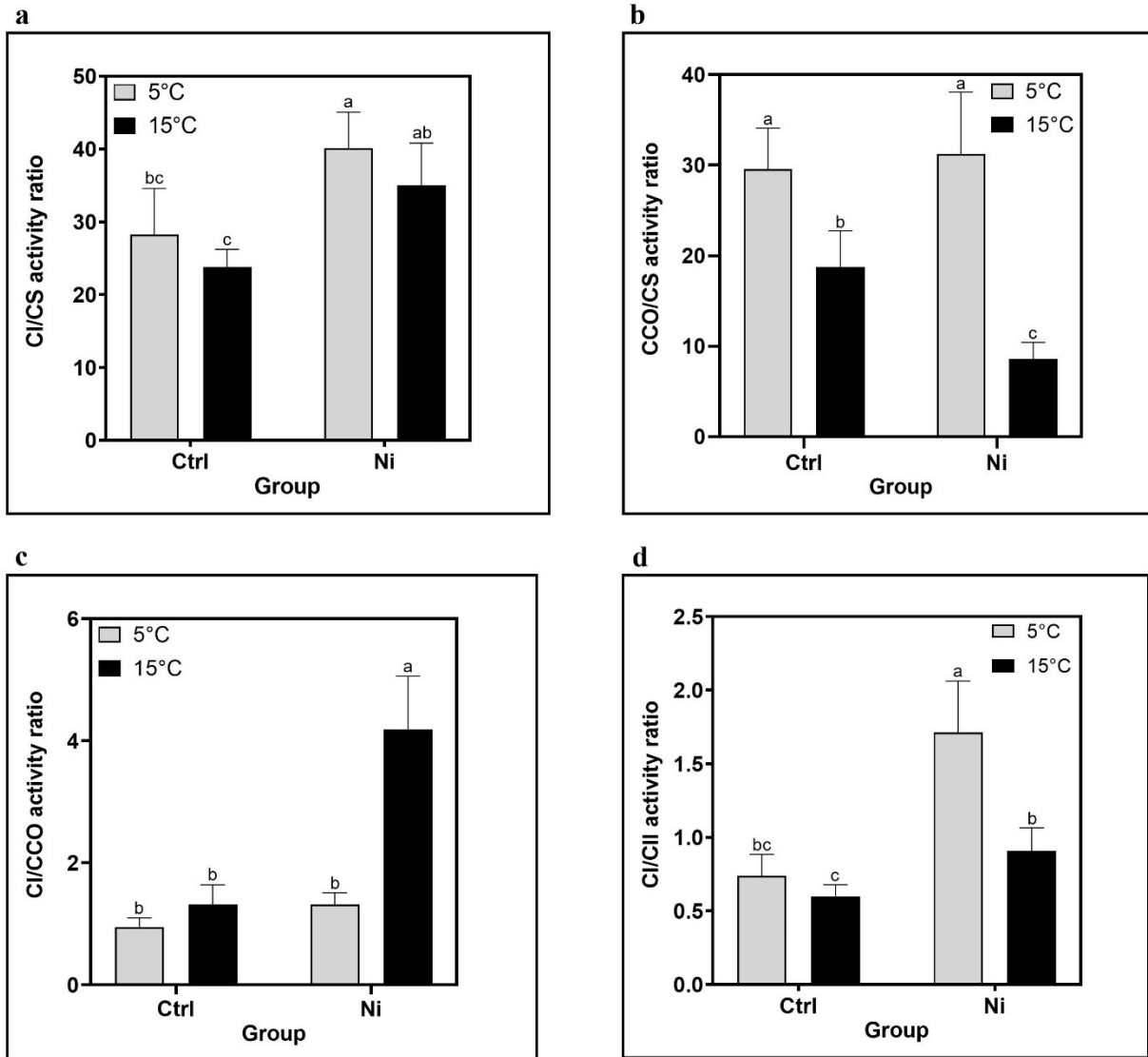


Figure 2.1 Effect of warm acclimation and Ni exposure on rainbow trout liver mitochondria enzyme activity ratios. a: complex I (CI) over citrate synthase (CS) ; b: cytochrome c oxidase (CCO) over citrate synthase (CS) ; c: complex I (CI) over cytochrome c oxidase (CCO) ; d: complex I (CI) over complex II (CII). The experimental groups are Ctrl: controls; Ni: 520.60 µg Ni/L. Bars with different letters differ significantly as determined by Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$).

Tableau 2.2 Effects of temperature, Ni and their interaction as determined by two-way ANOVA analysis of mitochondrial enzyme activity ratios (CI/CS, CCO/CS, CI/CCO, CI/CII). Values in bold represent a significant effect of temperature, Ni or their interaction ($p \leq 0.05$).

	Temperature	Ni	Interaction
CI/CS	0.0133	< 0.0001	0.8515
CCO/CS	< 0.0001	0.0155	0.0013
CI/CCO	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
CI/CII	< 0.0001	< 0.0001	0.0001

2.7.3 Fatty acid composition of membrane phospholipids

The relative abundance of fatty acids in phospholipids from isolated liver mitochondria differed among conditions (Table 2.3). Temperature alone influenced SFA, leading to a significant increase in the control group. At 5 °C, the presence of Ni significantly increased SFA, while it decreased it at 15 °C. The two-way ANOVA shows that interaction of Ni and temperature had a strong effect on SFA. In contrast, MUFA did not increase at 5 °C under Ni exposure but significantly decreased at 15°C with the same treatment, indicating a significant Ni-temperature interaction. Although PUFA increased drastically at 15 °C due to Ni (Tableau 2.3), it significantly decreased at 5 °C. The two-way ANOVA indicated that there was no significant effect of temperature on PUFA which can be explained by the very strong significance of Ni-temperature interaction. The same observation can be made for the PI, since PI and PUFA were greatly positively correlated (Table 2.4). PUFA were strongly negatively correlated to SFA and MUFA and PUFA were more abundant than the two others in all conditions.

Table 2.3 Fatty acid groups of membrane phospholipids (SFA, MUFA and PUFA) (% of total fatty acid) and peroxidation index (PI) in rainbow trout liver mitochondria from each exposure condition (mean \pm SE; n = 7). Means with different superscript letters differed significantly as determined by one-way ANOVA ($p \leq 0.05$). The significance of combined effects of temperature and Ni exposure as determined by two-way ANOVA is also reported. Values in bold represent a significant effect of temperature, Ni or their interaction ($p \leq 0.05$).

	5 °C		15 °C		Two-way ANOVA		
	Control	Ni	Control	Ni	Temperature	Ni	Interaction
SFA	24.8 \pm 4.1 ^b	27.5 \pm 1.9 ^b	33.6 \pm 1.4 ^a	25.5 \pm 2.5 ^b	0.0055	0.023	<0.0001
MUFA	14.3 \pm 1.3 ^a	14.4 \pm 1.9 ^a	13.8 \pm 1.9 ^a	9.8 \pm 0.8 ^b	0.0007	0.0069	0.0042
PUFA	60.9 \pm 4.7 ^{ab}	58.1 \pm 3.5 ^b	52.6 \pm 2.4 ^c	64.8 \pm 2.4 ^a	0.5759	0.0028	<0.0001
PI	430.8 \pm 34.7 ^{ab}	404.6 \pm 23.7 ^{bc}	366.8 \pm 14.2 ^c	454.0 \pm 19.2 ^a	0.4704	0.0057	<0.0001

2.7.4 Lipid peroxidation

Figure 2.2 shows that MDA levels varied significantly among conditions ($p < 0.0001$). Nickel strongly decreased MDA concentrations in both temperature conditions ($p = 0.0040$ at 5°C and $p < 0.0001$ at 15 °C). Temperature also strongly decreased MDA concentrations ($p < 0.0001$). According to Spearman correlations (Table 2.4), MDA levels were significantly negatively correlated to temperature and Ni. Surprisingly, there was no correlation between MDA concentrations and PI.

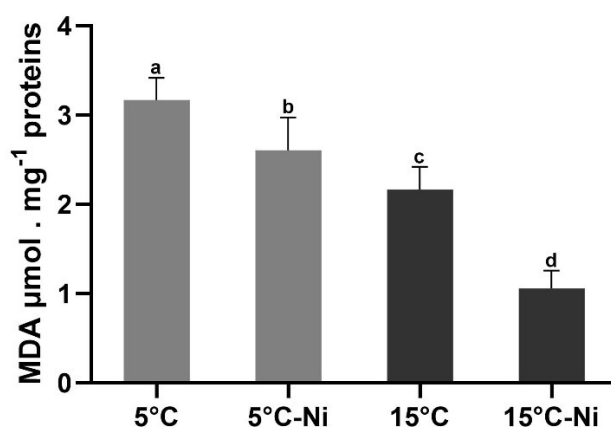


Figure 2.2 Lipid peroxidation level expressed as MDA content in rainbow trout liver mitochondria among exposure conditions. Data expressed as mean \pm SE (n = 7).

2.7.5 Relationships among parameters

The spearman correlation table (Table 2.4) indicates that PUFA and PI had a positive correlation with Ni concentration ([Ni]), while having a strong negative correlation with SFA and MUFA. CI/CII and CI/CS were negatively correlated to SFA while having a positive correlation with PUFA. On the other hand, CI/CCO had a strong negative correlation with MUFA and MDA while the opposite pattern was observed with CCO/CS.

Table 2.4 Spearman correlations among biometric (HSI, FCF) and biochemical (CI/CII, CI/CCO, CI/CS, CCO/CS, SFA, MUFA, PUFA, PI and MDA) parameters in rainbow trout from the various exposure conditions combined (n = 28). Numbers in bold indicate significant correlations. Asterisks denote the significance level of the correlations: *0.05; **0.01; ***0.001.

	[Ni]	HSI	FCF	CI/CII	CI/CCO	CI/CS	CCO/CS	SFA	MUFA	PUFA	PI
HSI	-0,4228*	1									
FCF	-0,1598	0,2016	1								
CI/CII	0,6774***	-0,0389	0,2917	1							
CI/CCO	0,6720***	-0,4636*	-0,3153	0,3487	1						
CI/CS	0,6424***	-0,0323	0,1767	0,7586***	0,3640	1					
CCO/CS	-0,3368	0,4795**	0,4720*	0,1724	-0,7800***	0,2217	1				
SFA	-0,5868**	0,0871	-0,2615	-0,5350**	-0,1440	-0,4545*	-0,0890	1			
MUFA	-0,5249**	0,4452*	0,2957	-0,1090	-0,5832**	-0,0821	0,6224***	0,2488	1		
PUFA	0,7047***	-0,3034	0,0647	0,4595*	0,3472	0,4031*	-0,1859	-0,8964***	-0,6241***	1	
PI	0,6731***	-0,2797	0,0600	0,3700	0,2611	0,3476	-0,1494	-0,8078***	-0,4863**	0,8883***	1
MDA	-0,4735*	0,3679	0,4175	-0,0859	-0,7743***	-0,1366	0,7231***	0,0764	0,5918***	-0,2999	-0,2162

A Principal Component Analysis (PCA) was performed in order to investigate further correlations among variables (Figure 2.3). The first two components accounted for 70.3% of the total variability. The PCA ordination yielded three distinct clusters. Group 1 consisted of fish acclimated at 5°C, with and without Ni exposure. Group 2 consisted of fish acclimated at 15°C without Ni exposure. Group 3 consisted of fish acclimated at 15°C under Ni exposure.

The first principal component (PC1) explained 43.0% of total variance and was composed by high loadings of CI/CCO, [Ni], PI and PUFA that were correlated positively, and CCO/CS, MDA, MUFA and HSI that were correlated negatively. This axis seemed to be associated with the Ni-temperature interaction, as Group 3 appeared to be on the right, and groups 1 and 2 on the left. CI/CCO showed the highest loading (0.92) on this axis,

although all aforesaid parameters indicated high loadings. High CI/CCO ratio, PUFA abundance and PI were related to Ni exposure under high temperature while CCO/CS, MDA, MUFA and HSI were not. The second component (PC2) explained 27.3% of total variance and was composed by CI/CII, CI/CS and FCF, correlated positively, and temperature (T) and SFA that were correlated negatively. Overall, this analysis highlights that Ni and temperature were associated with several effects, while interaction of Ni and temperature had the strongest effect on those parameters.

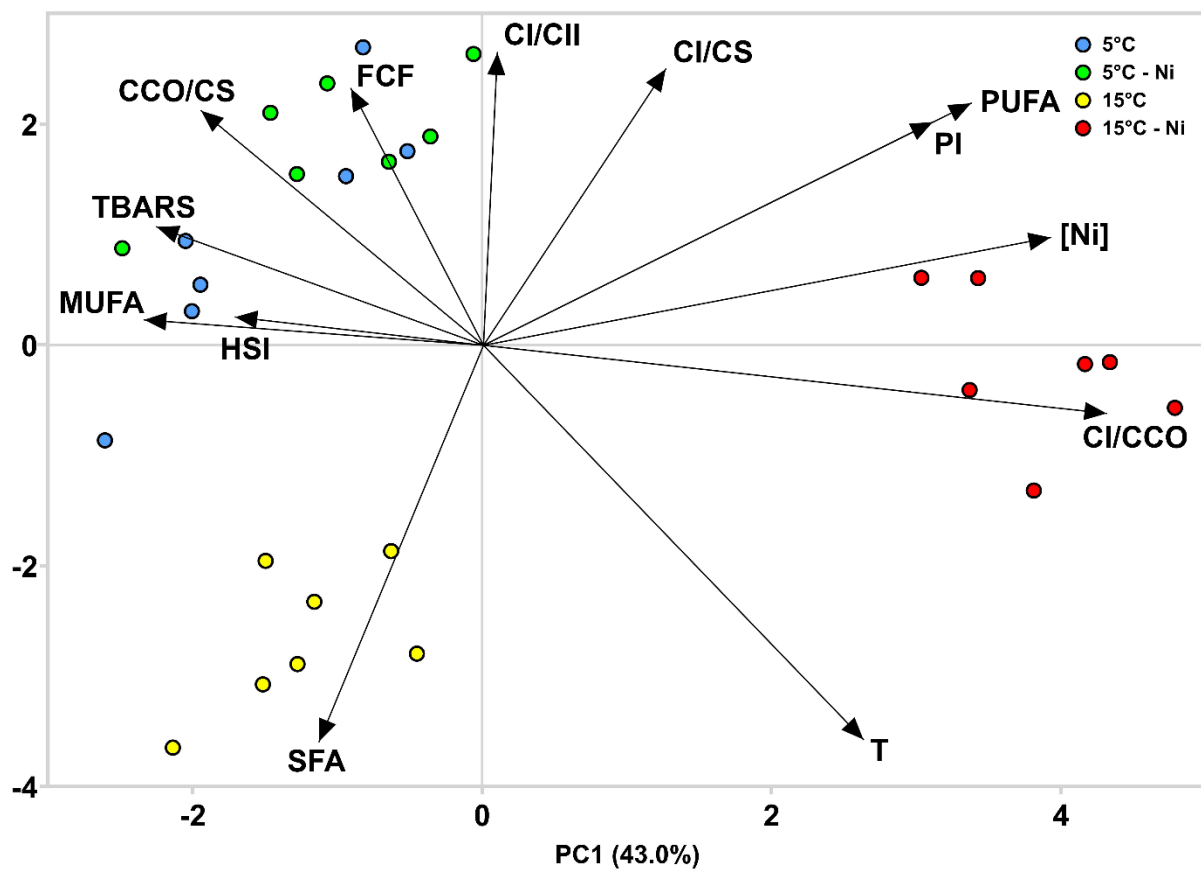


Figure 2.3 Principal component analysis (PCA) of biometric (HSI, FCF) and biochemical (CI/CII, CI/CCO, CI/CS, CCO/CS, SFA, MUFA, PUFA, PI and MDA) parameters among all conditions. Each point represents an individual fish. Blue points represent 5 °C condition; green points represent 5 °C + Ni condition ; yellow points represent 15 °C condition ; red points represent 15 °C + Ni condition

2.8 Discussion

2.8.1 Ni accumulation, temperature, and biometric indices

Juvenile rainbow trout globally strongly responded to temperature variation and Ni exposure. We reported strong interactions among these stressors. No mortality was observed whatsoever, indicating that even the most stressful experimental conditions were sublethal. Increasing temperature from 5 °C to 15 °C decreased HSI and FCF of juvenile rainbow trout, in agreement with other studies on different species (Fadhlaoui *et al.*, 2018 ; Grasset *et al.*, 2014). In our experimental conditions, Ni accumulation had no impact on FCF, but we noticed a negative correlation between liver Ni concentration and HSI. A lower HSI suggests a lower energy status of the fish, and therefore less available energy to respond to stressors. Our data suggests that temperature was also a more important stressor than Ni. The aforementioned studies reported that variation of temperature in fish causes adaptative thermal responses, including an increased liver size of cold-acclimated fish in order to counterbalance decreases in enzyme activities. Our HSI and FCF data suggest that 5 °C is closer to an optimal temperature for the growth of these fish. This observation contradicts a previous study on Australian rainbow trout, which was indicating an optimal growth temperature range between 15 °C and 18.6 °C (Adams, 2020), suggesting intraspecific variations of thermal tolerance.

Thermal acclimation influenced metal uptake in our rainbow trout liver. We reported a two-fold increase in hepatic Ni concentration at 15 °C compared to fish acclimated at 5 °C and exposed to the same aqueous Ni concentration. The higher Ni concentration does not seem to be associated with a reduction of liver size since fish were exposed to Ni after thermal acclimation. We hypothesize that the increase of Ni uptake could be due to increased respiration rate at higher temperature, in agreement with previous investigations on rainbow trout (Black *et al.*, 1991). Their study reported a linear relationship between O₂ consumption and toxicant accumulation, alongside with a correlation between toxicant uptake efficiency and oxygen uptake efficiency. Another study supports our hypothesis and reported that nickel uptake and toxicity were directly correlated to a respiratory mechanism, unlike metals like cadmium or copper (Pane *et al.*, 2003a).

2.8.2 Effects of Ni and temperature on mitochondrial enzymes

Our study revealed that ETS complexes and CS respond differently to temperature and Ni exposure in rainbow trout. The ratio of CI over CS showed an increase induced by Ni exposure at each acclimation temperature, suggesting a rise of mitochondrial capacity to reduce NADH relative to the Krebs cycle oxidation potential under Ni exposure. The increase of CI over CCO ratio at 15 °C with Ni exposure was very large, suggesting a strong decrease of ETS reducing capacity. The CCO/CS ratio indicated an interaction of Ni and temperature on ETS reducing capacity relative to the Krebs cycle oxidation potential, with a strong decrease induced by Ni at 15 °C when compared to 5 °C. Prior investigations have reported on the effects of temperature on ETS complex activities (Blier *et al.*, 2014 ; Hunter-Manseau *et al.*, 2019). These studies notably highlighted greater CI/CCO ratio at higher temperature. Those indicators lead us to hypothesize a higher reduction state of the ETS, associated with a synergistic effect of temperature and Ni. This higher reduction status of ETS could lead to an increase of ROS production, as reported in a previous study (Christen *et al.*, 2018). Our data also revealed a higher CI over CII ratio in Ni exposed fish compared to control groups, especially for cold-acclimated fish. Complex II links the respiratory chain with the Krebs cycle, because of its dependence of the cycle metabolites. A prior study depicts CII as a modulator of ROS production by CI, considering CI is a main source of ROS (Dröse, 2013). Hence, a decrease of CII activity could lead to decreased ROS production by CI through reverse electron transport. Data from our study suggest that the combined variations of CI, CIV and CS enzyme activities caused by Ni and temperature could stimulate multiple sources of ROS production while the relative decrease of CII could counteract to compensate this capacity of overproduction. Prior investigations also reported that Ni can induce ROS production through NADPH oxidases in addition to mitochondrial oxidative stress (Das *et al.*, 2008 ; Zheng *et al.*, 2014 ; Zorov *et al.*, 2014) . Further analyses could link NADPH enzyme complex activities with ETS and reinforce the case for correlations between Ni contamination and mitochondrial ROS production. Moreover, a higher CCO/CS ratio at the lower acclimation temperature suggests an increase of IMM surface relative to mitochondrial volume. Greater IMM surface density has been correlated to colder acclimation temperature, facilitating oxygen flux within mitochondria (St-Pierre *et al.*,

1998). Following this reasoning, Ni exposure did not affect IMM relative surface area at 5 °C, but led to a major decrease at 15 °C, suggesting that thermal acclimation of mitochondrial structure and function are affected by Ni contamination, and hence affects redox capacities of mitochondria.

2.8.3 Effects of Ni and temperature on the mitochondrial membrane

Our study is the first to investigate the response of mitochondrial membrane composition to combined temperature and Ni exposure in fish. The proportions of PUFA and MUFA were lower at the higher acclimation temperature, in agreement with the homeoviscous adaptation theory (Hazel *et al.*, 1991 ; Miranda & Hazel, 1996). Clearly though, Ni affected the normal adjustments of mitochondrial membrane phospholipid composition with temperature variations. The PUFA ratio in warm-acclimated fish appeared to be higher under Ni exposure than in the control group, while in cold-acclimated fish PUFA ratio tended to be lower than controls. We also observed a significant temperature-Ni interaction on fatty acid composition, likely involving modulation of either expression or activity of desaturases and elongases, involved in fatty acid synthesis. The same tendency was observed in a previous study in yellow perch (*Perca flavescens*) muscle cell membranes (Fadhlaoui & Couture, 2016). In their study, the authors reported that Ni exposure decreased estimated Δ 5-desaturase and ELOVL2 elongase activities of cold-acclimated fish, while Δ 6-desaturase estimated activity increased in warm-acclimated fish. Cadmium exposure down-regulated the *FADS2* desaturase gene at higher temperature in fish muscle (Fadhlaoui & Couture, 2016), while *ELOVL2* elongase gene has been correlated with dietary Cd exposure (Ferain *et al.*, 2021). PUFA is principally composed by DHA, which is formed from successive elongations and is therefore affected by *FADS2* and *EVOLV2* gene expression (Tocher *et al.*, 2003). However, evidence of direct impacts of Ni on elongase/desaturase expression remains to be reported.

In this study, we assessed the effects of Ni and temperature on lipid peroxidation by measuring TBARS, a good proxy of lipid peroxidation products (MDA). Various studies highlighted the effects of Ni exposure on fish MDA levels (Kubrak *et al.*, 2012 ; Kubrak *et al.*, 2013 ; Zheng *et al.*, 2014), principally reporting that Ni increases MDA concentration. In our study, TBARS decreased with both temperature and Ni exposure. Those results are in sharp contradiction with the above studies. Our condition factor values were higher in cold-acclimated fish, suggesting that defense mechanisms in our fish work better at colder temperatures. Moreover, the PI was higher at 15 °C under Ni exposure. The PI positively correlated with PUFA proportions, a class of FA which are known to be more sensible to peroxidation because of their double bonds (Cillard & Cillard, 2006). The strong positive correlation that we observed between MDA levels and CCO/CS ratio allows us to hypothesize that both warm acclimation and Ni exposure induce changes in mitochondrial phenotype and that their combination acts synergistically, leading to a drop of ROS production and consequently of lipid peroxidation. It is also possible that the decrease of TBARS is also partly due to a decrease of CI/CII and an increase in the activity of antioxidant enzymes like GPx and CAT, counterbalancing ROS production but at a high metabolic cost. MUFA, which proportion was positively correlated to MDA level, also participate to changes in membrane fluidity, at a lower metabolic cost than PUFA (Kraffe *et al.*, 2007). This corroborates the idea that temperature can affect the metabolic cost of Ni-induced ROS elimination, and that there are thus more aspects of membrane composition that can influence mitochondrial function, other than fatty acid order itself (Miranda & Hazel, 1996).

2.8.4 Relationships between mitochondrial membrane and enzymes

Mitochondrial membrane composition affects its permeability and fluidity, which is known for modulating membrane-bound enzymes, including ETS enzymes. ROS first cause damage to the immediate surroundings of their production site, suggesting more effects on mitochondrial membranes, where the ETS is located (Paradies *et al.*, 2000). Inner mitochondrial membranes contain a high proportion of cardiolipin which is principally composed of PUFA. A previous study highlighted that CCO activity was

correlated with the presence of intact cardiolipin (Paradies *et al.*, 2000). Considering that this lipid is particularly vulnerable to lipid peroxidation, we first hypothesized that the drop in CCO activity at 15 °C under Ni exposure could be related by a lower cardiolipin content in the membrane. Our observation that PUFA content was higher while MDA concentration was lower in this condition seems to refute this hypothesis.

We previously hypothesized that overcompensation of antioxidant mechanisms targeting ROS production increases the metabolic cost of ROS elimination and therefore affects ETS enzyme activity ratios. In addition, our data indicated a higher reducing status of the ETS in warm-acclimated fish under Ni exposure. This statement goes along with the positive correlation of TBARS levels and CCO over CS ratio, which is associated with a higher proportion of IMM, and therefore a higher oxidizability of mitochondria. A higher level of TBARS may not directly reflect ROS production. Variations of ETS and CS activities explain part of the mechanism. Complex II, for instance, is associated with ROS production, but also with its elimination. Complexes I and complex III are the main sources of ROS in the ETS, hence assessing CIII activity, which we were unable to measure in this study, could provide further insight about mitochondrial ROS production in fish under thermal and metal stress.

2.9 Conclusion

This study provided new evidence about the combined effects of Ni and temperature on fatty acid composition, lipid peroxidation and electron transport system enzymes. The response to Ni exposure was affected by the increase of temperature, implying that there was a synergistic effect of temperature and nickel on mitochondrial function. The indicators of ROS production and elimination that we examined shed light on the relationships between mitochondrial membrane lipid composition and the activity of membrane-bound enzymes. While Ni or temperature alone had significant effects on PUFA, MUFA and SFA proportions, our study supports synergistic effects of those stressors on fatty acid composition. However, while Ni- and temperature-induced changes in PUFA suggested that fish exposed to Ni at warmer temperature would be

more vulnerable to LPO, we observed the opposite. This allowed us to understand that, considering the decrease of TBARS despite of the increase of PUFA, ROS detoxification mechanisms operate, including remodeling of mitochondrial phenotype, *de facto* increasing the energetic demand. The production and elimination of ROS are modulated by ETS enzymes and fatty acid composition, along with other mitochondrial enzymes such as GPx and CAT. Investigations of fatty acid elongases and desaturases in fish exposed to our experimental conditions should bring more evidence on the importance of the membrane fluidity and permeability on mitochondrial function. Fish metabolism adapts under the synergistic stress of nickel and temperature during this experiment. Nevertheless, the higher metabolic cost begotten can affect fish condition under longer exposure. Combined effects of Ni exposure and temperature augmentation lead to the remodulation of ETS, in concordance with oxidative stress markers, independently of single stress exposure. These results presume the importance of mitochondrial phenotype flexibility to respond to these environmental stressors, considering growing mining activity in a climate change context.

2.10 Acknowledgements

This study was funded by a Discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to P. Couture and P. Blier.

3 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

3.1 Nickel et température, ensemble on est plus forts

Cette étude a permis de présenter les effets du nickel et de la température sur la mitochondrie d'un poisson sténotherme d'eau froide sous le prisme du multistress. Globalement, nous avons pu comprendre que la structure lipidique membranaire de la mitochondrie est effectivement modulée par la température, mais que le nickel perturbe la réponse d'acclimatation de cette membrane. Les proportions relatives d'AGPI et AGMI vis-à-vis des AGS varient dans le sens contraire chez les poissons exposés au Ni par rapport aux groupes contrôles. Ces observations ont déjà été rapportées chez une autre espèce de poissons dans les cellules musculaires (Fadhlaoui & Couture, 2016). La membrane se retrouve donc dotée d'une fluidité différente de ce qu'elle est supposée adopter selon les conditions thermiques. Cela lui confère des propriétés thermochimiques alternatives, perturbant sa perméabilité, la stabilité des enzymes qu'elle contient, mais aussi les mécanismes de défense contre certains stress locaux, comme la peroxydation lipidique.

En s'attardant sur les enzymes du système de transport des électrons et la citrate synthase, on s'aperçoit que l'activité des enzymes est influencée par le nickel, la température, mais également par l'interaction des deux. En effet, les ratios enzymatiques que nous avons calculés donnent d'importants indices sur l'accumulation d'électrons au sein de la membrane mitochondriale. L'environnement très réducteur peut perturber l'équilibre électrochimique des molécules présentes dans la membrane, telles que les lipides ou les enzymes elles-mêmes. L'interdépendance du cycle de Krebs et de l'ETS nous permet de suggérer une réduction accrue du milieu mitochondrial en présence de Ni à haute température : l'accumulation électronique favorise la production de ROS, pouvant créer un effet de boucle. L'équilibre réactionnel associé à certaines enzymes peut être dirigé dans le sens de la formation de ROS, libérant davantage d'électrons dans la mitochondrie. Une précédente étude soulignait l'importance de l'équilibre entre la production des ROS et leur élimination par les mitochondries : les ROS ont un rôle signalétique important dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'homéostasie (Ray *et al.*, 2012).

3.2 La réponse au stress métallique, modulée par la température

À basse température, l'exposition au nickel entraîne une réaction antioxydante normale de la mitochondrie. La quantité d'AGPI tend à diminuer en lien avec la peroxydation lipidique et on observe une augmentation du potentiel oxydatif du complexe I par rapport au complexe II. A haute température, on observe une perturbation de ces mécanismes. L'induction de Ni semble entraîner une chute de la peroxydation lipidique alors que la proportion d'AGPI est à son taux le plus élevé. On note également une activité de l'ETS marquée par l'inhibition de CCO/CI, reliée au statut réduit de l'ETS. L'accumulation d'électrons favorise la production de ROS, suggérant une intense pression de ces stressseurs sur le métabolisme mitochondrial.

De plus, la hausse de température semble diminuer le ratio CI/CII en présence de Ni. Rappelons que le complexe II est impliqué dans l'induction des ROS. Cet indicateur suggère une diminution du taux de réduction de CI (à travers le flux d'électrons inverse), et entraîne donc une diminution de la production de ROS par CII à plus haute température. Étonnamment, le niveau mesuré de TBARS était le plus bas lorsque les poissons étaient exposés aux deux stress combinés. L'hypothèse selon laquelle la surcompensation des enzymes antioxydantes sur la production de ROS diminue la peroxydation lipidique se tient, et pourrait être en partie expliquée par l'augmentation du coût métabolique de l'élimination des ROS par ces processus. On peut toutefois suggérer que parmi les mécanismes de détoxification des ROS qui interviennent, un remodelage du phénotype mitochondrial prend un rôle important. De plus, les dommages à la membrane sont complexes et localisés, et il serait intéressant de les mesurer. La plasticité mitochondriale face à la température provoque des changements structuraux, qui sont déjà répertoriés : la composition phospholipidique membranaire s'ajuste pour mieux perméabiliser la membrane aux électrolytes tout en maintenant une fluidité optimale aux fonctions enzymatiques (Hazel *et al.*, 1991). La quantité de mitochondries varie également en fonction de la température pouvant ainsi compenser les besoins énergétiques liés à la baisse de productivité des mitochondries à chaud.

Nous pouvons spéculer sur la capacité de résistance des truites au Ni face au stress thermique. La PCA permet de faire des liens de corrélation sur les différents groupes. On observe une démarcation diagonale entre les groupes de températures, principalement composée des indices biométriques, des TBARS et du rapport CCO/CS. Cela suggère la corrélation négative de la température sur la surface de la membrane interne, diminuant notamment l'activité du complexe IV et favorisant l'accumulation d'électrons dans l'ETS de la mitochondrie. La ségrégation du groupe acclimaté à froid exposé au Ni (en vert), par rapport au groupe contrôle (en bleu), se tient principalement sur le rapport CI/CII et la proportion de AGS (Figure 2.3). La forte augmentation du ratio CI/CII suggère une diminution du stress oxydant induit par le Ni, compensé par la peroxydation lipidique, en lien avec la diminution d'AGPI.

L'axe horizontal est davantage lié aux effets du Ni sur le métabolisme mitochondrial. Le groupe exposé au Ni à haute température se démarque alors des autres groupes, notamment par l'augmentation de la proportion en AGPI, la diminution des indices biométriques, du rapport CCO/CS, et de la concentration en TBARS. Là encore, l'hypothèse selon laquelle la diminution de la peroxydation lipidique n'est pas la conséquence directe de la diminution de production de ROS se tient. En effet, l'activité de CI augmente par rapport à la CCO, en lien avec la production de ROS alors que les TBARS sont à leur plus bas niveau.

L'étude combinée de la structure membranaire et enzymatique de la mitochondrie a permis de répondre à certaines questions concernant les effets individuels et combinés du Ni et de la température. Premièrement, nous avons statué sur le caractère synergique de ces deux facteurs. Sans avoir été en mesure de faire des liens de causalité entre la structure lipidique et l'activité enzymatique de l'ETS, nous avons été capables de mettre en évidence des corrélations entre l'augmentation de la production de ROS et la composition de l'ETS et du cycle de Krebs. L'étude de la structure membranaire a permis de mettre en lumière l'importance de CII et des enzymes antioxydantes telles que la CAT ou la GPx dans la détoxification des ROS lorsque le mécanisme de peroxydation lipidique est perturbé. Enfin, nous avons pu souligner l'acclimatation structurale de la mitochondrie induite par ces stress, notamment avec le remodelage phénotypique et phospholipidique mitochondrial.

Les truites arc-en-ciel semblent démontrer une adaptation face au stress synergique induit par la température et le nickel. Sans être en situation de perte de contrôle, les processus alternatifs de détoxification permettent de réduire le stress, à un coût métabolique possiblement plus élevé. Notre analyse n'a pas souligné des indices de conditions plus faibles en présence de nickel à cette durée d'exposition, mais il serait intéressant de répéter cette expérience en prolongeant le contact avec le Ni afin d'observer de potentiels effets physiologiques sur le poisson.

Cette étude révèle que la combinaison d'une exposition au Ni et aux températures élevées entraîne une réponse de remodelage de l'ETS relié aux marqueurs de stress oxydant, et ce indépendamment des réponses à chacun des stress individuels. Ces résultats présument de l'importance de la flexibilité du phénotype mitochondrial pour répondre à ces stress environnementaux.

3.3 Une note à toi, futur étudiant écotoxicologue

Ce projet contient évidemment certaines limites. Nous n'avons pas été en mesure de mesurer l'activité du complexe III de l'ETS. Cette enzyme est intrinsèquement liée à la production de ROS par l'ETS et l'analyser pourrait ajouter de la connaissance sur le mécanisme de production de ROS liés au métabolisme énergétique aérobie. Dans l'idée de développer les données rapportées dans ce mémoire, il serait très intéressant de mesurer l'activité des quatre complexes de l'ETS grâce à la respiration mitochondriale. Cette méthode permet une approche plus précise du fonctionnement des enzymes de l'ETS. En parallèle, réaliser une étude génomique comparative sur les élongases et désaturases à l'origine de la modulation de la membrane mitochondriale permettrait de mieux comprendre les effets du Ni et de la température sur l'adaptation homéovisqueuse et viendrait combler les limites de ce projet. Enfin, si on veut aller plus loin, mesurer l'activité des enzymes liées aux mécanismes antioxydants comme la CAT, la SOD ou encore la GPx pourrait apporter des informations sur la corrélation entre la production de ROS par l'ETS et les dommages effectifs à la membrane.

3.4 Conclusion

Suite au dernier rapport du GIEC et aux activités anthropiques grandissantes, la pression humaine sur les communautés aquatiques est plus forte qu'elle ne l'a jamais été dans l'histoire de l'humanité. L'augmentation de température n'est qu'un facteur parmi tant d'autres qui affectent les poissons. À travers ce projet, nous avons tenté d'appréhender comment la composition membranaire perturbe le mécanisme aérobie chez la truite arc-en-ciel juvénile, en la confrontant aux stress thermique ou métallique, seuls ou combinés. Il est à la fois intéressant et inquiétant de constater les effets synergiques de ces deux facteurs. Cette étude constitue une première étape dans la recherche écotoxicologique multifactorielle sur les mitochondries de poissons, et soulève de nouvelles questions :

Quels sont les effets à plus long terme sur la physiologie du poisson ? Une acclimatation thermique en présence de plusieurs métaux aurait-elle aussi un effet synergique ?

Toutes ces questions sont pertinentes et méritent notre attention particulière si l'on veut, un jour, appréhender notre empreinte sur cette planète et l'avenir des générations futures.

4 BIBLIOGRAPHIE

- Adams O (2020) *Thermal acclimation potential of Australian rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss**. Master of Science - MSc (University of British Columbia). <http://hdl.handle.net/2429/74157>
- Adiele RC, Stevens D, Kamunde C (2010) Reciprocal enhancement of uptake and toxicity of cadmium and calcium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver mitochondria. *Aquat Toxicol* 96(4):319-327.
- Adiele RC, Stevens D, Kamunde C (2012) Features of cadmium and calcium uptake and toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mitochondria. *Toxicol In Vitro* 26(1):164-173.
- Akoh CC (2017) *Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Fourth Edition*.
- Angilletta Jr MJ, Niewiarowski PH, Navas CA (2002) The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of thermal Biology* 27(4):249-268.
- Black MC, Millsap DS & McCarthy JF (1991) Effects of Acute Temperature Change on Respiration and Toxicant Uptake by Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Physiological Zoology* 64(1):145-168.
- Blewett TA, Wood CM, Glover CN (2016) Salinity-dependent nickel accumulation and effects on respiration, ion regulation and oxidative stress in the galaxiid fish, *Galaxias maculatus*. *Environmental Pollution* 214:132-141.
- Blier PU, Lemieux H, 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.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1-2):248-254.
- Chellappa S, Huntingford FA, Strang RHC & Thomson RY (1995) Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology* 47(5):775-787. Christen F, Desrosiers V, Dupont-Cyr BA, Vandenberg GW, Le François NR, Tardif JC, Dufresne F, Lamarre SG, Blier PU (2018) Thermal tolerance and thermal sensitivity of heart mitochondria: Mitochondrial integrity and ROS production. *Free Radic Biol Med* 116:11-18.
- Ciccarone F, Di Leo L, Ciriolo MR (2019) TCA Cycle Aberrations and Cancer. *Encyclopedia of Cancer (Third Edition)*, Boffetta P & Hainaut P (Édit.) Academic Press, Oxford . p 429-436.
- Cillard J & Cillard P (2006) Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL* 13(1):24-29.
- Colette C & Monnier L (2011) Acides gras : classification, fonction et équilibre entre les différentes familles. *Médecine des Maladies Métaboliques* 5(3):237-245.
- Cossins AR & Macdonald AG (1986) Homeoviscous adaptation under pressure. III. The fatty acid composition of liver mitochondrial phospholipids of deep-sea fish. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 860(2):325-335.
- Cossins AR & Macdonald AG (1989) The adaptation of biological membranes to temperature and pressure: fish from the deep and cold. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 21(1):115-135.

- Couture P, Busby P, Gauthier C, Rajotte JW, Pyle GG (2008) Seasonal and Regional Variations of Metal Contamination and Condition Indicators in Yellow Perch (*Perca flavescens*) along Two Polymetallic Gradients. I. Factors Influencing Tissue Metal Concentrations. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 14(1):97-125.
- Couture P & Pyle G (2008) Live Fast and Die Young: Metal Effects on Condition and Physiology of Wild Yellow Perch from along Two Metal Contamination Gradients. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 14(1):73-96.
- Couture P & Rajender Kumar P (2003) Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* 64(1):107-120.
- Couture P & Rajotte JW (2003) Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: a review. *J Environ Monit* 5(2):216-221.
- Danielli JF & Davson H (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 5(4):495-508.
- Das KK, Das SN, Dhundasi SA (2008) Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian J Med Res* 128(4):412-425.
- de Kroon AI, Rijken PJ, De Smet CH (2013) Checks and balances in membrane phospholipid class and acyl chain homeostasis, the yeast perspective. *Prog Lipid Res* 52(4):374-394.
- Defo MA, Gendron AD, Head J, Pilote M, Turcotte P, Marcogliese DJ, Houde M (2019) Cumulative effects of cadmium and natural stressors (temperature and parasite infection) on molecular and biochemical responses of juvenile rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 217:105347.
- Denkhaus E & Salnikow K (2002) Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Crit Rev Oncol Hematol* 42(1):35-56.
- Dröse S (2013) Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827(5):578-587.
- Egginton S & Sidell BD (1989) Thermal acclimation induces adaptive changes in subcellular structure of fish skeletal muscle. *Am J Physiol* 256(1 Pt 2):R1-9.
- Ernst R, Ejsing CS, Antony B (2016) Homeoviscous Adaptation and the Regulation of Membrane Lipids. *Journal of Molecular Biology* 428(24, Part A):4776-4791.
- Fadhlaoui M (2017) *Effets combinés de la température et des contaminants métalliques sur la composition des phospholipides membranaires chez des poissons d'eau*. Doctorat en sciences de l'eau (Institut national de la recherche scientifique, Québec). 213 p. <http://espace.inrs.ca/id/eprint/6517>
- Fadhlaoui M & Couture P (2016) Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquat Toxicol* 180:45-55.
- Fadhlaoui M, Pierron F, Couture P (2018) Temperature and metal exposure affect membrane fatty acid composition and transcription of desaturases and elongases in fathead minnow muscle and brain. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148:632-643.
- Ferain A, Delbecque E, Neefs I, Dailly H, De Saeyer N, Van Larebeke M, Cornet V, Larondelle Y, Rees J-F, Kestemont P, De Schamphelaere KAC, Debier C (2021) Interplay between

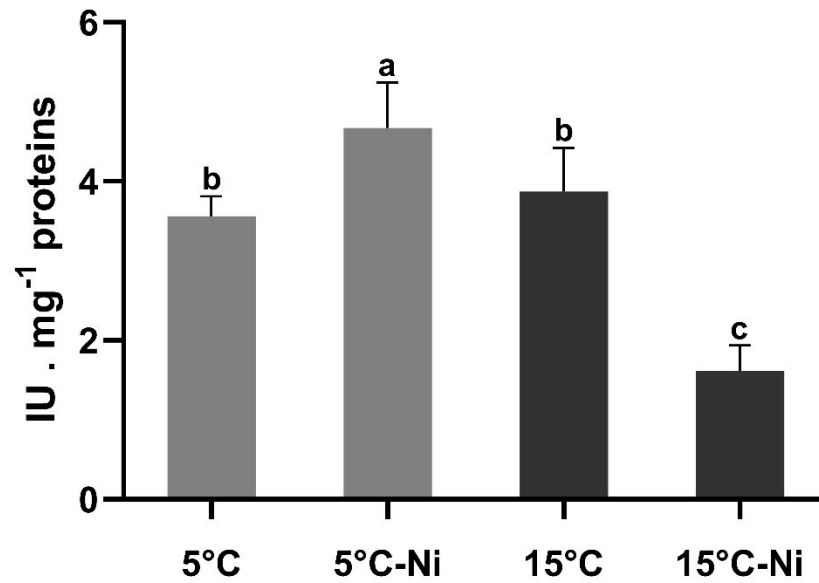
- dietary lipids and cadmium exposure in rainbow trout liver: Influence on fatty acid metabolism, metal accumulation and stress response. *Aquatic Toxicology* 231:105676.
- Garceau N, Pichaud N, Couture P (2010) Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquatic Toxicology* 98(2):107-112.
- Gauthier C, Couture P, Pyle GG (2006) Metal effects on fathead minnows (*Pimephales promelas*) under field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 63(3):353-364.
- Grasset J, Bougas B, Campbell PGC, Bernatchez L, Couture P, MacLatchey D (2014) Temperature, oxygen, and diet modulate gene transcription and metabolic capacities in yellow perch. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 71(11):1635-1641.
- Gray MW, Burger G & Lang BF (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biology* 2(6):reviews1018.1011.
- Green DE & Tzagoloff A (1966) Role of lipids in the structure and function of biological membranes. *J Lipid Res* 7(5):587-602.
- Hatefi Y (1985) THE MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION SYSTEM. *Annual Review of Biochemistry* 54(1):1015-1069.
- Hazel JR (1984) Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Am J Physiol* 246(4 Pt 2):R460-470.
- Hazel JR (1995) Thermal Adaptation in Biological Membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation? *Annual Review of Physiology* 57(1):19-42.
- Hazel JR, Williams EE, Livermore R, Mazingo N (1991) Thermal adaptation in biological membranes: Functional significance of changes in phospholipid molecular species composition. *Lipids* 26(4):277-282.
- Horvath SE & Daum G (2013) Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res* 52(4):590-614.
- Houtkooper RH & Vaz FM (2008) Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol Life Sci* 65(16):2493-2506.
- Hunter-Manseau F, Desrosiers V, Le François NR, Dufresne F, Detrich HW, Nozais C, Blier PU (2019) From Africa to Antarctica: Exploring the Metabolism of Fish Heart Mitochondria Across a Wide Thermal Range. *Frontiers in Physiology* 10(1220).
- Iyer SS, Tripathy M, Srivastava A (2018) Fluid Phase Coexistence in Biological Membrane: Insights from Local Nonaffine Deformation of Lipids. *Biophys J* 115(1):117-128.
- Karp G, Iwasa J, Marshall W (2020) *Karp's Cell and Molecular Biology*. Wiley, 9th Edition. 944 p
- Kraffe E, Marty Y, Guderley H (2007) Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. *Journal of Experimental Biology* 210(1):149-165.
- Kubrak OI, Husak VV, Rovenko BM, Poigner H, Kriews M, Abele D, Lushchak VI (2013) Antioxidant system efficiently protects goldfish gills from Ni²⁺-induced oxidative stress. *Chemosphere* 90(3):971-976.
- Kubrak OI, Husak VV, Rovenko BM, Poigner H, Mazepa MA, Kriews M, Abele D, Lushchak VI (2012) Tissue specificity in nickel uptake and induction of oxidative stress in kidney and spleen of goldfish *Carassius auratus*, exposed to waterborne nickel. *Aquatic Toxicology* 118-119:88-96.

- Lee Y-J, Lim S-S, Baek BJ, An J-M, Nam H-S, Woo K-M, Cho M-K, Kim S-H, Lee S-H (2016) Nickel(II)-induced nasal epithelial toxicity and oxidative mitochondrial damage. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 42:76-84.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (2013) *Lehninger principles of biochemistry*, W.H. Freeman and Company, 6th Edition
- Mandal R, Hassan NM, Murimboh J, Chakrabarti CL, Back MH, Rahayu U, Lean DR (2002) Chemical speciation and toxicity of nickel species in natural waters from the Sudbury area (Canada). *Environ Sci Technol* 36(7):1477-1484.
- McGeer JC, Szebedinszky C, McDonald DG, Wood CM (2000) Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology* 50(3):231-243.
- McMurchie EJ & Raison JK (1979) Membrane lipid fluidity and its effect on the activation energy of membrane-associated enzymes. *Biochim Biophys Acta* 554(2):364-374.
- MELCC (2019) *Exemples de critères de qualité de l'eau pour les métaux dont la toxicité varie avec la dureté au Québec*. http://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/criteres_eau/annexe_12.htm (Consulté le 5 février 2021)
- MFFP (2016) *Truite arc-en-ciel*. <https://mffp.gouv.qc.ca/faune/peche/poissons/truite-arc-ciel.jsp> (Consulté le 5 février 2021)
- Miranda EJ & Hazel JR (1996) Temperature-induced changes in the transbilayer distribution of phosphatidylethanolamine in mitoplasts of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Journal of Experimental Zoology* 274(1):23-32.
- Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191:144-148.
- Murphy Michael P (2008) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 417(1):1-13.
- Nakagawa Y (2004) Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. *Ann N Y Acad Sci* 1011:177-184.
- Pane EF, Richards JG, Wood CM (2003a) Acute waterborne nickel toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) occurs by a respiratory rather than ionoregulatory mechanism. *Aquatic Toxicology* 63(1):65-82.
- Pane EF, Smith C, McGeer JC, Wood CM (2003b) Mechanisms of Acute and Chronic Waterborne Nickel Toxicity in the Freshwater Cladoceran, *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology* 37(19):4382-4389.
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2000) The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Letters* 466(2-3):323-326.
- Pierron F, Bourret V, St-Cyr J, Campbell PG, Bernatchez L, Couture P (2009) Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). *Ecotoxicology* 18(5):620-631.
- Pyle G, Busby P, Gauthier C, Rajotte J, Couture P (2008) Seasonal and Regional Variations in Metal Contamination and Condition Indicators in Yellow Perch (*Perca flavescens*) along

- Two Polymetallic Gradients. II. Growth Patterns, Longevity, and Condition. *Human and Ecological Risk Assessment - HUM ECOL RISK ASSESSMENT* 14:126-145.
- Pyle G & Couture P (2011) Nickel. *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*, (Fish Physiology: 10.1016/s1546-5098(11)31005-9. p 253-289.
- Ray PD, Huang BW & Tsuji Y (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24(5):981-990.
- Sharaf MS, Stevens D, Kamunde C (2017) Zinc and calcium alter the relationship between mitochondrial respiration, ROS and membrane potential in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver mitochondria. *Aquat Toxicol* 189:170-183.
- Sherwood S, Webb MJ, Annan JD, Armour K, Forster PM, Hargreaves JC, Hegerl G, Klein SA, Marvel KD, Rohling EJ (2020) An assessment of Earth's climate sensitivity using multiple lines of evidence. *Reviews of Geophysics* 58(4):e2019RG000678.
- Singer SJ & Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175(4023):720-731.
- Sokolova IM & Lannig G (2008) Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research* 37(2-3):181-201.
- Somero G (1995) Proteins and Temperature. *Annual Review of Physiology* 57(1):43-68.
- Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C (2012) Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc* 7(6):1235-1246.
- St-Pierre J, Charest PM, Guderley H (1998) Relative contribution of quantitative and qualitative changes in mitochondria to metabolic compensation during seasonal acclimatisation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Experimental Biology* 201(21):2961-2970.
- Tocher DR, Agaba MK, Hastings N, Teale AJ (2003) Biochemical and molecular studies of the polyunsaturated fatty acid desaturation pathway in fish.
- Torreilles J & Guérin M-C (1990a) Nickel (II) as a temporary catalyst for hydroxyl radical generation. *FEBS Letters* 272(1):58-60.
- Torreilles J & Guérin MC (1990b) Nickel (II) as a temporary catalyst for hydroxyl radical generation. *FEBS Lett* 272(1-2):58-60.
- Tzagoloff A (2012) *Mitochondria*. Springer Science & Business Media,
- Urien N, Cooper S, Caron A, Sonnenberg H, Rozon-Ramilo L, Campbell PGC, Couture P (2018) Subcellular partitioning of metals and metalloids (As, Cd, Cu, Se and Zn) in liver and gonads of wild white suckers (*Catostomus commersonii*) collected downstream from a mining operation. *Aquat Toxicol* 202:105-116.
- USEPA (1995) *National Recommended Water Quality Criteria - Aquatic Life Criteria table*. <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table#main-content> (Consulté le 5 février 2021)
- Verhille CE, English KK, Cocherell DE, Farrell AP, Fangue NA (2016) High thermal tolerance of a rainbow trout population near its southern range limit suggests local thermal adjustment. *Conservation physiology* 4(1):cow057-cow057.

- VijayaVenkataRaman S, Iniyar S,Goic R (2012) A review of climate change, mitigation and adaptation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16(1):878-897.
- von Heijne G (2006) Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(12):909-918.
- Wei P, Liu Q, Xue W,Wang J (2020) A Colorimetric Assay of Citrate Synthase Activity in *Drosophila Melanogaster*. *J Vis Exp* 10.3791/59454(155).
- Winterhalder K (1995) Early history of human activities in the Sudbury area and ecological damage to the landscape. *Restoration and Recovery of an Industrial Region*, New York, Springer Ed. p 17-32.
- Wood CM (2001) Toxic responses of the gill. *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*, CRC Press, London, 1 Ed10.1201/9781315109244. p 89.
- Yeagle PL (2016) Membrane Proteins. *The Membranes of Cells*, 10.1016/b978-0-12-800047-2.00010-3. p 219-268.
- Zhang L & Granick S (2005) Slaved diffusion in phospholipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26):9118-9121.
- Zheng G-H, Liu C-M, Sun J-M, Feng Z-J,Cheng C (2014) Nickel-induced oxidative stress and apoptosis in *Carassius auratus* liver by JNK pathway. *Aquatic Toxicology* 147:105-111.
- Zorov DB, Juhaszova M,Sollott SJ (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 94(3):909-950.

5 ANNEXE I



Supplementary figure 5.1 Effect of warm acclimation and Ni exposure on rainbow trout liver mitochondria CCO activity. Bars with different letters differ significantly as determined by Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$).

6 ANNEXE II

	5°C	5°C - Ni	15°C	15°C - Ni
C14:0	0,8±0,2	0,7±0,3	1,5±0,2	0,8±0,2
C15:0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,7±0,1	0,2±0,0
C16:0	13,8±1,4 ^{ab}	12,3±1,1 ^b	14,3±1,2 ^a	15,6±1,2 ^a
C17:0	0,4±0,1	0,3±0,1	0,4±0,4	0,4±0,1
C18:0	7,5±2,6 ^c	12,1±0,5 ^a	9,6±0,3 ^b	6,2±1,8 ^c
C20:0	0,4±0,1 ^b	0,3±0,1 ^b	2,4±0,4 ^a	0,2±0,0 ^b
C21:0	0,3±0,2 ^b	0,2±0,1 ^b	2,1±0,6 ^a	0,1±0,0 ^b
C22:0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,6±0,1	0,1±0,0
C24:0	1,3±0,2	1,3±0,1	2,1±0,4	1,9±0,3
C14:1n5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
C15:1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
C16:1n7	1,7±0,2	1,5±0,2	1,4±0,3	1,5±0,2
C17:1	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0
C18:1n9	11,0±1,2 ^a	11,4±1,8 ^a	10,7±1,9 ^a	7,0±0,9 ^b
C20:1n9	0,7±0,1	0,7±0,1	0,7±0,3	0,6±0,0
C22:1n9	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
C24:1n9	0,7±0,2	0,7±0,2	0,9±0,6	0,6±0,2
C18:2n6	2,6±0,2	2,8±0,3	2,1±0,6	3,0±0,5
C20:2n6	0,4±0,1	0,3±0,0	0,3±0,2	0,2±0,0
C22:2n6	1,2±0,6	0,8±0,3	0,5±0,3	0,4±0,2
C18:3n6	0,2±0,1	0,2±0,2	0,2±0,1	0,2±0,1
C18:3n3	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,1	0,2±0,1
C20:3n6	0,3±0,0	0,4±0,1	0,4±0,4	0,2±0,1
C20:3n3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,1	0,0±0,0
C20:4n6	2,9±0,4	3,4±0,5	3,6±0,4	4,1±0,5
C20:5n3	4,7±0,9 ^b	5,6±1,0 ^{ab}	5,1±1,3 ^b	7,4±1,6 ^a
C22:6n3	48,5±3,9 ^a	44,4±2,6 ^b	40,0±1,9 ^c	49,0±3,0 ^a

Supplementary table 6.1 Fatty acids of membrane phospholipids (% of total fatty acids) in rainbow trout liver mitochondria from each exposure condition (mean ± SE ; n = 7). Different superscript letters within a row indicate significant differences between conditions (p ≤ 0.05).

7 ANNEXE III

CITRATE SYNTHASE (CS)

Solutions

- Tampon homogénéisation, pH 7,5, se conserve plusieurs mois

M.W. (g/mol)	Chemical	CONC (mM)	Vol (L)	Wt (g)
276,4	HEPES	20	1	5,52800
292,2	EDTA	1	1	0,29220
	TRITON X- 100	0,10%	1	1ml

- Tampon phosphate, 0,1M (pH 7.0 et 8.0), se conserve plusieurs mois
Phosphate Buffers - For LDH, CCO and CS

M.M. (g/mol)	Chemical	Conc (M)	Vol (mL)	Wt (g)
136,1	KH ₂ PO ₄	1	200	27,22000
174,2	K ₂ HPO ₄	1	200	34,84000

	K ₂ HPO ₄ (1M)	KH ₂ PO ₄ (1M)
Desired pH	mL	mL
8	94	6

Compléter à 1L pour avoir une concentration finale en phosphate de 100mM

Case bleue : entrer le volume en fonction du nombre d'échantillons à faire. Calculer pour des triplicats et un peu d'extra

Case jaune : entrer la masse exacte pesée pour chaque réactif

<u>Sol. CS</u>	M.M. (g/mol)	Produit	Conc. (mM)	Vol. (mL)	Masse (g)	Pesée (g)	Vol. corrigé
	157,6	Tris-HCl	100	5	0,07880		0,00
	396,3	DTNB	0,1	10	0,00040		0,00
	809,57	Acétyl CoA	0,2	10	0,00162		0,00

<u>Sol. Oxaloac.</u>	M.M. (g/mol)	Produit	Conc. (mM)	Vol. (mL)	Poids (g)	Pesée (g)	Vol. corrigé
	132,1	Oxaloacétate	1,5	10	0,00198		0,00

Taux initial: 170 uL solution CS + 10 uL d'homogénat
Mesurer l'absorbance à 412 nm pendant 6 minutes

Taux réaction: + 20µL solution Oxaloacétate
Mesurer l'absorbance à 412 nm pendant 6 minutes

- 1) Calculer le nombre de mL de solutions que l'on a besoin en fonction du nombre d'échantillons
- 2) On ajoute 9 volumes de tampon d'homogénéisation dans le tube (dilution finale 1/10 (p/v)). 1 gramme de tissus frais = 9 ml de tampon d'homogénéisation. Puis on redilue selon la dilution optimisée ($c_1 * v_1 = c_2 * v_f$)
- 3) On utilise notre homogénat selon le tableau ci-dessus.

8 ANNEXE IV

CYTOCHROME C OXYDASE - COMPLEXE IV (CCO)

Solutions

- Tampon homogénéisation, pH 7,5, se conserve plusieurs mois

M.W. (g/mol)	Chemical	CONC (mM)	Vol (L)	Wt (g)
276,4	HEPES	20	1	5,52800
292,2	EDTA	1	1	0,29220
	TRITON X- 100	0,10%	1	1ml

- Tampon phosphate, 0,1M (pH 7.0 et 8.0), se conserve plusieurs mois
Phosphate Buffers - For LDH, CCO and CS

M.M. (g/mol)	Chemical	Conc (M)	Vol (mL)	Wt (g)
136,1	KH ₂ PO ₄	1	200	27,22000
174,2	K ₂ HPO ₄	1	200	34,84000
		K ₂ HPO ₄ (1M)	KH ₂ PO ₄ (1M)	
	Desired pH	mL	mL	
	7	61,5	38,5	

Compléter à 1L pour avoir une concentration finale en phosphate de 100mM

Case bleue : entrer le volume en fonction du nombre d'échantillons à faire. Calculer pour des triplicats et un peu d'extra

Case jaune : entrer la masse exacte pesée pour chaque réactif

<u>Sol. CCO</u>	M.M. (g/mol)	Produit	Conc. (mM)	Vol. (mL)	Poids (g)	Pesée	Vol. corrigé
	12327	Cyt. C	0,07	12	0,01035		0,000

Avec une pincée de **Sodium Dithionite** puis faire buller pour 5 minutes

<u>Sol. K₃Fe(CN)₆</u>	M.M. (g/mol)	Produit	Conc. (mM)	Vol. (mL)	Poids (g)	Pesée	Vol. corrigé
	329,26	K ₃ Fe(CN) ₆	0,33% (P/V)	1	0,33333		0,000

1. Ajouter une pincée de **Sodium Dithionite** dans la sol. CCO puis faire buller pour 5 minutes (une pincée par 10 mL)
2. Mesurer l'absorbance à 550nm et à 565nm dans une cuvette de 1 mL. Le ratio 550/565 doit être > 9.
3. Ajouter 10µL de sol. K₃Fe(CN)₆ à 990 µL de sol. CCO (dans eppendorf) ce mix devient le tampon contrôle
4. Agiter et remplir 200 uL de tampon contrôle dans 3 puits de référence.
5. Ajouter dans chaque puits 190 uL de sol. CCO + 10 uL d'homogénat
6. Mesurer l'absorbance des puits de réf. et ceux avec échant. à 550 nm pendant 7 minutes

Calcul des mL : $n \times 3 \times 190$ "+ 1000 + 990"

- 4) Calculer le nombre de mL de solutions que l'on a besoin en fonction du nombre d'échantillons
- 5) On ajoute 9 volumes de tampon d'homogénéisation dans le tube (dilution finale 1/10 (p/v)). 1 gramme de tissus frais = 9 ml de tampon d'homogénéisation. Puis on redilue selon la dilution optimisée ($c_1 \times v_1 = c_2 \times v_f$)
- 6) On utilise notre homogénat selon le tableau ci-dessus.