

Université du Québec
INRS - Centre Eau Terre Environnement

**Effets combinés de la température et des contaminants métalliques sur la
composition des phospholipides membranaires chez des poissons d'eau
douce**

Par Mariem Fadhlaoui

Thèse présentée pour l'obtention du grade
Philosophiae doctor (PhD)
en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Examineur externe	Helga Guderley Université Laval
Examineur externe	Catherine Jumarie Université du Québec à Montréal Département des sciences biologiques
Examineur interne	Landis Hare Institut national de la recherche scientifique Centre Eau Terre Environnement
Directeur de recherche	Patrice Couture Institut national de la recherche scientifique Centre Eau Terre Environnement

À mes chers parents

À mon rayon de soleil, mon petit frère Hassen

Résumé

Dans un milieu naturel, les organismes peuvent se trouver face à plusieurs facteurs de stress naturels, comme la variation de la température, de l'oxygène ainsi que la disponibilité de la nourriture, ou d'origine anthropique, comme les contaminants métalliques. Plusieurs travaux ont traité des effets de ces facteurs séparément sur différentes espèces de poissons, alors que dans les milieux naturels, ils y sont exposés simultanément. Les effets combinés des facteurs de stress naturels et anthropiques sont encore peu étudiés. Pourtant, le stress physiologique causé par les facteurs de stress naturels peut affecter la capacité des organismes à s'acclimater aux contaminants, et vice-versa.

Dans des conditions de basses températures, les membranes cellulaires des ectothermes deviennent rigides et ils réagissent en augmentant l'insaturation de leurs phospholipides pour restaurer la fluidité membranaire. Des enzymes impliquées dans la conversion des phospholipides membranaires sont impliquées dans cette réponse physiologique. Par exemple, l'activité des désaturases est induite dans des conditions de froid, une réponse visant à rétablir la fluidité membranaire nécessaire pour préserver le fonctionnement de la cellule.

Les effets des métaux ont été largement étudiés sur différentes espèces. Il a été démontré qu'une contamination métallique induit de nombreuses pathologies. Les métaux peuvent ainsi modifier l'activité et le fonctionnement de certaines enzymes suite à une production accrue des dérivés réactifs de l'oxygène, les ERO (espèces réactives de l'oxygène). Ces derniers peuvent endommager les molécules biologiques y compris les lipides, les protéines et l'ADN et initier la peroxydation des lipides membranaires les plus polyinsaturés. En particulier, les acides gras les plus polyinsaturés, qui sont plus abondants chez les animaux acclimatés au froid, sont les plus vulnérables au stress oxydant. Une variation de la température induit aussi la production de ces ERO et peut endommager le système de défense antioxydante.

L'objectif principal de ce projet est d'examiner les effets combinés de la température et d'une exposition aux contaminants métalliques sur le plan physiologique par le suivi des modifications de la composition des acides gras des phospholipides membranaires en relation avec les capacités de défense antioxydante, la peroxydation lipidique, la capacité oxydative et la transcription de certains gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras et dans la défense antioxydante.

Pour ce projet, des expositions de huit semaines ont été faites avec deux espèces de poissons d'eau douce : la perchaude (*Perca flavescens*) et le mené à grosse tête (*Pimephales promelas*). La perchaude a été acclimatée à deux températures (9°C et 28°C) en présence ou non de cadmium (Cd) ou de nickel (Ni). Le mené à grosse tête a été acclimaté à trois températures (15°C, 25°C et 30°C), également avec ou sans Cd ou Ni. À la fin de chaque exposition les poissons ont été sacrifiés, des mesures biométriques ont été prises et le muscle et le cerveau ont été prélevés.

Chez la perchaude, des analyses ont été effectuées sur le muscle dans le but d'examiner les effets combinés de la variation de la température et des deux métaux sur la composition des acides gras des phospholipides membranaires, la capacité antioxydante (SOD, CAT, GPx, GST et GSH) et le stress oxydant, mesuré par la peroxydation lipidique en termes de concentration de malondialdéhyde (MDA). Chez les individus acclimatés à 9°C, le taux d'insaturation des acides gras membranaires était plus élevé par rapport à ceux acclimatés à 28°C, en accord avec la théorie d'adaptation homéovisqueuse qui prédit une augmentation des acides gras polyinsaturés (AGPI) dans les phospholipides membranaires pour maintenir une fluidité membranaire optimale. Cependant, suite à l'exposition au Ni et au Cd cette réponse a été altérée : à 9°C, les AGPI ont diminué (principalement les AGPI n-6) devant une augmentation en acides gras saturés (AGS). En revanche, à 28°C, les AGPI ont augmenté à des proportions même plus élevées que celles observées à 9°C. Les différentes composantes du système de défense antioxydante enzymatique (SOD, CAT, GPx et GST) et non enzymatique (GSH) ont agi en coopération pour faire face au stress oxydant pouvant induire la peroxydation lipidique.

Bien que le MDA ait été détecté dans toutes les conditions, sa concentration n'a pas été affectée par la température malgré les différences de taux d'insaturation. Cependant, chez les poissons exposés au Ni à 28°C, pour lesquels la proportion d'AGPI était la plus élevée, la concentration du MDA était faible, ce qui peut être dû à une réponse intensive du système de défense antioxydante. À notre connaissance, notre étude est la première à s'intéresser à l'effet des métaux sur la composition membranaire en acides gras.

Devant les modifications surprenantes des membranes cellulaires que nous avons observées suite à une combinaison d'un stress thermique et d'une exposition au Cd et au Ni, nous nous sommes intéressés à étudier les mécanismes qui peuvent être impliqués dans ces réponses. Donc dans le but de comprendre ces mécanismes et de réaliser une comparaison interspécifique, les expériences ont été reprises chez le mené à grosse tête en examinant la transcription des désaturases et des élongases impliquées dans le métabolisme des acides gras des phospholipides membranaires et les enzymes de défense antioxydante. Les acides gras ont été analysés dans le muscle et le cerveau. Le niveau de transcription des gènes qui codent respectivement pour les désaturases $\Delta 9$, $\Delta 5/6$ et $\Delta 4$ (*scd2*, *fads2* et *degs2*) et pour les élongases ELOVL2, ELOVL5 et ELOVL6 (*elovl2*, *elovl5* et *elovl6*) a été déterminé par RT-qPCR. Contrairement à la perchaude, la combinaison des deux températures élevées, 25°C et 30°C, à une contamination avec le Ni a été critique et a conduit à une mortalité massive des individus avant la fin de la période d'exposition. La composition membranaire différait entre les tissus, le cerveau tendant à être plus riche en AG monoinsaturés que le muscle. En outre, dans le muscle, un ajustement dans la composition des phospholipides membranaires a été observé entre les deux extrêmes de température étudiés (15 et 30°C) contrairement au cerveau, où l'ajustement s'est produit entre 15°C et 25°C mais pas à 30°C. Ceci nous mène à suggérer que 30°C est une température critique qui excède la capacité de régulation homéovisqueuse du cerveau. Ainsi, les individus acclimatés à cette température maintiennent une composition riche en AGPI, surtout en acide docosahexaénoïque (DHA), possiblement pour maintenir les différentes fonctions cérébrales. D'autre part,

les deux métaux ont agi différemment entre les deux tissus et ont affecté à des niveaux distincts la voie de biosynthèse des acides gras. Comme pour la perchaude, chez le mené à grosse tête la réponse normale d'acclimatation thermique de la composition membranaire a été modifiée en présence des métaux. En effet, à 30°C, dans le muscle, la présence du Cd a inhibé la reconstruction de la membrane. Les AGPI, spécialement les n-3 AGPI ont nettement augmenté, au point où la composition membranaire ressemblait à celle des individus à 9°C. En revanche, dans le cerveau, la présence du Cd a affecté certains acides gras qui ont été compensés par d'autres, probablement dans le but de maintenir une fluidité optimale et conséquemment les fonctions du tissu nerveux qui dépendent énormément de la composition membranaire en acides gras.

Cette étude met ainsi en évidence une différence interspécifique et inter-organe de la capacité à restaurer la composition membranaire suite à un stress thermique et métallique. En outre, puisque la transcription des gènes codant pour les élongases et les désaturases n'a pas toujours expliqué les modifications observées dans les membranes, il est probable que ces enzymes ne sont pas les seules à être impliquées dans la réponse de la composition membranaire à un stress thermique et métallique. Dans le muscle, la peroxydation lipidique mesurée en termes de MDA était élevée à 15°C et 25°C, chez les individus ayant des membranes riches en AGPI. En revanche, malgré sa richesse en acides gras insaturés, le cerveau semble être plus protégé contre la peroxydation lipidique par les enzymes de défense antioxydante. La transcription des gènes codant pour ces enzymes a été affectée par les deux facteurs de stress séparés ou combinés mais ne correspondait pas toujours aux modifications observées des activités enzymatiques.

Par ailleurs, la température ne modifie pas uniquement la composition membranaire, elle affecte aussi la capacité oxydative ainsi que l'activité de certaines enzymes y compris celles membranaires. Pour explorer les différentes modalités de réponse à un stress thermique et à une exposition au Cd, une comparaison interspécifique a été établie entre la perchaude et le mené à grosse tête pour évaluer le lien entre la modification de la capacité oxydative et la composition membranaire. Deux

enzymes indicatrices de la capacité oxydatives ont été choisies : la cytochrome C oxydase (CCO), une enzyme membranaire mitochondriale étroitement en contact avec les phospholipides membranaires et la citrate synthase (CS), une enzyme de la matrice mitochondriale. Chez les deux espèces, à de basses températures, l'augmentation de l'activité de la CCO pourrait être en relation avec le changement des AG constituant les membranes cellulaires. En revanche, la présence du Cd n'a pas affecté l'activité de la CCO chez le mené à grosse tête contrairement à la perchaude où l'activité a été inhibée. Comme il n'y avait pas de corrélation entre l'activité de la CCO et les AG membranaires chez la perchaude exposée au Cd, on suggère que la modification observée n'est pas liée directement aux changements de la structure membranaire en AG.

À notre connaissance, les résultats de cette étude soulignant une modification de la réponse normale à la température chez les poïkilothermes en présence de métaux n'ont été évoqués nulle part. Nos travaux ont permis d'émettre quelques hypothèses sur les mécanismes impliqués dans le changement de la composition membranaire en réponse à une exposition aux métaux. D'autres recherches seront nécessaires afin de mesurer directement les effets des métaux sur les activités des désaturases et des élongases et sur d'autres enzymes, comme celles impliquées dans la synthèse des AG et dans leur incorporation dans les phospholipides membranaires.

Avant propos

Mon projet de doctorat s'inscrit dans un programme de recherche financé par une subvention à la découverte du CRSNG. L'objectif général de ce programme est d'étudier les conséquences métaboliques des facteurs de stress naturels, dont la température, et les contaminants métalliques, séparément ou en combinaison, sur les poissons d'eau douce. Ce projet traitait ainsi des effets de ces facteurs de stress sur différents plans (physiologique, métabolique et génomique) en reproduisant des conditions environnementales réalistes. Toutefois, dans le but d'effectuer une comparaison interspécifique de la réponse à ces facteurs de stress, la première partie a été effectuée sur des échantillons issus d'un autre projet de notre laboratoire intitulé « Écotoxicogénomique chez la perchaude » et dont les conditions expérimentales ont reporté aussi des conditions réalistes en combinant un stress thermique et métallique.

Cette thèse s'organise donc en trois parties, une première partie dans laquelle je présente une synthèse générale du contexte de l'étude, les objectifs et l'originalité du projet. La deuxième partie comporte les principaux résultats et leur discussion. Enfin, la dernière partie est présentée sous forme d'articles qui ont été publiés ou soumis dans des revues scientifiques avec comité de lecture. Des détails de protocoles et des informations supplémentaires sont fournis en annexes.

La contribution des auteurs aux articles scientifiques est comme suit :

1. 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.

M. Fadhlaoui : Conception et réalisation du projet (expositions des menés à grosse tête, analyses de laboratoire et traitement des données) et rédaction de l'article.

P. Couture : Conception du projet, contribution à l'interprétation des résultats et à la rédaction de l'article.

2. Fadhlaoui, M., Pierron, F., Couture, P. (soumis, BBAMEM-17-65, 23-02-2017).
Temperature and metal exposure affect membrane fatty acid composition and transcription of desaturases and elongases in fathead minnow muscle and brain.

M. Fadhlaoui : Conception et réalisation du projet (expositions des menés à grosse tête, analyses de laboratoire et traitement des données) et rédaction de l'article

F. Pierron : Contribution à l'interprétation des résultats et rédaction de l'article.

P. Couture : Conception du projet, contribution à l'interprétation des résultats et rédaction de l'article.

3. Fadhlaoui, M., Pierron, F., Couture, P. (en préparation) Combined effects of temperature and aqueous cadmium exposure on oxidative stress and antioxidant capacities in fathead minnow muscle and brain.

M. Fadhlaoui : Conception et réalisation du projet (expositions des menés à grosse tête, analyses de laboratoire et traitement des données) et rédaction de l'article

F. Pierron : Contribution à l'interprétation des résultats et rédaction de l'article.

P. Couture : Conception du projet, contribution à l'interprétation des résultats et rédaction de l'article.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Helga Guderley, Catherine Jumarie et Landis Hare d'avoir accepté d'être membres du jury de ma thèse et d'évaluer ce travail.

J'exprime ma gratitude et ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse, Patrice Couture, pour sa confiance, sa patience manifestée envers moi et ses encouragements sans lesquels mon projet n'aurait pas abouti. Je tiens à remercier Fabien Pierron, chercheur à la station marine d'Arcachon, pour son aide et son amitié. Je lui en serai toujours reconnaissante. Je remercie également toute l'équipe EPOC, professeurs, techniciens et étudiants qui m'ont accueilli à bras ouverts dès la première journée.

Mes remerciements vont aussi à tous mes collègues du laboratoire, Julie, Antoine, Charles, Audrey, Isabelle, Géraldine, Ophélie et Michel pour la belle ambiance de travail. Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à tout le personnel de l'INRS, particulièrement Jean-Daniel Bourgault, pour son aide et sa sympathie, René Rodrigue, la première personne qui m'a tendu la main, Stéphane Moise, pour sa générosité et sa présence à n'importe quel moment et pour ses coups de main dans les analyses des acides gras.

Un grand merci pour mes chers parents pour leurs sacrifices et leurs encouragements durant toutes ces longues années. Malgré la distance qui nous séparait, ils ont toujours été présents et à mon écoute. Qu'ils trouvent dans ces petits mots ma sincère reconnaissance et gratitude. J'adresse aussi mes remerciements à mes chers amis, Leila, Malika, Wafa, Hamida et Alia qui ont vécu avec moi toutes les étapes de ma thèse, qui ont été là dans les moments de stress, de doute et de faiblesse. Je n'oublierai jamais nos sorties, nos voyages, nos soirées et les fous sincères ris ensemble. J'aimerais également remercier mes chers « amis de Québec », Antoine, Christina, Audrey, Mégane, Mathieu, Philo, Pierre Marc et Catherine, pour eux je n'étais qu'une tueuse de poissons. Enfin, afin de n'oublier personne, je tiens à remercier tous ceux qui ont participé, à titre professionnel ou personnel, à la réalisation de cette thèse.

Table des matières

Résumé	II
Avant propos	VIII
Remerciements.....	X
Table des matières.....	XII
Liste des figures	XV
Liste des tableaux	XVII
Liste des abréviations.....	XVIII
Synthèse bibliographique.....	II
Introduction générale	1
1. Synthèse bibliographique	5
1. 1 Les membranes biologiques : généralités	5
1. 2 Composition des membranes biologiques	6
1. 2. 1 Les lipides.....	6
1. 2. 2 Les protéines membranaires	11
1. 4 Caractéristiques des membranes biologiques	11
1. 4 Acclimatation des membranes biologiques aux variations de la température	12
1. 4. 1 Effets de la température sur la structure et les fonctions des membranes biologiques.....	12
1. 4. 2 Acclimatation des membranes aux changements de la température	14
1. 4. 3 Biosynthèse des acides gras membranaires chez les poissons	16
1. 5 Le stress oxydant et la réponse cellulaire	20
1. 6 Toxicité du cadmium et du nickel en relation avec le stress oxydant	23
1. 6. 1 Le cadmium.....	24
1. 6. 2 Le nickel	24
1. 7 Peroxydation lipidique	28
1. 7. 1 L'initiation	28
1. 7. 2 La propagation	28
1. 7. 3 La terminaison	29
1. 7. 4 Conséquences de la peroxydation lipidique sur le fonctionnement cellulaire	29
1. 8 Choix des espèces	30

2. Objectifs et originalité du projet.....	32
3. Méthodologie	37
3.1 Approche méthodologique : exposition au laboratoire	37
3.2 Analyses des échantillons biologiques	38
3.2.1 Analyse de la composition phospholipidique des membranes biologiques	38
3.2.2 Dosage des activités enzymatiques et quantification du glutathion	39
3.2.2.1 Dosage de l'activité des enzymes de défense antioxydante	39
3.2.2.2 Dosage des activités des deux enzymes mitochondriales CCO et CS	39
3.2.3 Détermination de la concentration de MDA.....	40
3.2.4 Quantification de l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras et pour les enzymes de défense antioxydante.....	40
L'analyse des niveaux d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras (désaturases et élongases) ainsi que ceux des enzymes de défense antioxydante ont été déterminés en trois étapes :	40
3.2.5 Détermination des concentrations des métaux	41
3.3 Analyses statistiques et calcul des indices	41
4. Résultats et discussion	42
4.1. La contamination métallique modifie-t-elle la réponse à un stress thermique chez la perchaude ?.....	42
4.1.1 Effets de la température et des métaux sur les acides gras membranaires	42
4.1.2 Effet de la température et des métaux sur la peroxydation lipidique et le système de défense antioxydante	46
4.2 Effet de la température et des contaminants métalliques sur la composition des phospholipides membranaires et la transcription des désaturases et des élongases chez le mené à grosse tête.....	49
4.2.1 Accumulation des métaux dans les deux tissus et paramètres morphométriques.....	49
4.2.2 Composition des membranes cellulaires en relation avec la transcription des désaturases et des élongases.....	50
4.3 Effets de la température et du cadmium sur l'activité et la transcription des gènes des enzymes antioxydantes en relation avec la peroxydation lipidique chez le mené à grosse tête.....	56
4.3.1 Réponse antioxydante et transcription des gènes codant pour les enzymes correspondantes	56
4.3.2 Effets de la température et du Cd sur la susceptibilité à la peroxydation lipidique en relation avec la capacité antioxydante	58

4. 4	La température d'acclimatation et l'exposition au Cd altèrent-elles la capacité oxydative et antioxydante en relation avec la composition membranaire ?	62
5.	Conclusion	68
5. 1	Retour sur les objectifs.....	68
5. 2	Perspectives de recherche.....	70
	Références bibliographiques	72
	Articles scientifiques	89
	Annexe	213

Liste des figures

Figure 1 : Structure des membranes cellulaires selon le modèle de la mosaïque fluide. ..	5
Figure 2 : Classification des lipides	7
Figure 3 : Classification des phospholipides selon la nature de la tête polaire (Le Grand, 2012)	8
Figure 4 : Voie de biosynthèse des acides gras chez les vertébrés (Monroig et al., 2013)	17
Figure 5 : Expression des gènes codant pour des enzymes de défense antioxydante via l'activation de Nrf2.	23
Figure 6 : Design du dispositif expérimental des différentes conditions d'exposition pour la perchaude (A) et le mené à grosse-tête (B).....	38
Figure 7 : Effet de la température et des métaux (Cd et Ni) sur la composition membranaire en acides gras dans le muscle de la perchaude.....	43
Figure 8 : Variation des indices représentant les activités des désaturases et des élongases membranaires sous l'effet de la température et des deux métaux dans le muscle de la perchaude (n=8).....	45
Figure 9 : Schéma récapitulatif des effets de la température et des deux métaux sur la composition membranaires en acides gras, les composantes du système de défense antioxydante et la peroxydation lipidique dans le muscle de la perchaude	48
Figure 10 : Pourcentages de chacune des familles d'acides gras (% des acides gras totaux) dans le muscle et le cerveau du mené à grosse tête après la période d'exposition de huit semaines (n=6)). A : AGS; B : AGMI; C : AGPI.	52
Figure 11 : Schéma récapitulatif des effets de la température et de deux métaux sur la composition membranaire en acides gras et la transcription des désaturases et des élongases dans le muscle (A) et le cerveau (B) du mené à grosse tête.....	55
Figure 12 : Schéma récapitulatif des effets de la température et du Cd sur les enzymes de défense antioxydante, le niveau de transcription des gènes correspondants et la concentration de MDA dans le muscle du mené à grosse tête.....	60
Figure 13 : Schéma récapitulatif des effets de la température et du Cd sur les enzymes de défense antioxydante, le niveau de transcription des gènes correspondants et la concentration de MDA dans le cerveau du mené à grosse tête	61
Figure 14 : Activité oxydative (CCO et CS) dans le muscle de la perchaude (A) et du mené à grosse tête (B) acclimatés à deux températures et exposés au Cd.	63
Figure 15 : Analyse en composantes principales intégrant les différentes variables en relation avec la composition membranaire en AG dans le muscle de la perchaude ainsi que les deux enzymes représentant la capacité oxydative (CCO et CS). Les	

données représentées ont été obtenues à la fin de la période d'exposition et d'acclimatation à deux températures..... 65

Figure 16 : Analyse en composante principale intégrant les différentes variables en relation avec la composition membranaire en AG dans le muscle du mené à grosse tête ainsi que les deux enzymes représentant la capacité oxydative (CCO et CS). Les données représentées sont obtenues à la fin de la période d'exposition et d'acclimatation à deux températures..... 66

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition lipidique de certaines membranes biologiques.	9
Tableau 2 : Composition lipidique de quelques fractions membranaires (foie de rat) ...	10
Tableau 3 : Des désaturases et des élongases étudiées chez diverses espèces de poissons.....	19
Tableau 4 : Résumé des effets des métaux (Cd et Ni) et de la température sur les enzymes de défense antioxydante et sur la peroxydation lipidique chez différentes espèces aquatiques (LPO: Peroxydation lipidique, + : augmentation, - : diminution).	26
Tableau 5 : Les températures caractéristiques des deux espèces modèles de cette étude	31
Tableau 6 : Effets combinés de la température et du Cd sur les enzymes indicatrices de la capacité oxydative (CCO et CS) chez la perchaude et le mené à grosse tête selon l'analyse de variance à deux facteurs	64

Liste des abréviations

AG	Acide gras
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGPI-LC	Acide gras polyinsaturé à longue chaîne
AGS	Acide gras saturé
AHV	Adaptation homeovisqueuse
ARA	Acide arachidonique
CAT	Catalase
CCO	Cytochrome c oxydase
Cd	Cadmium
CL	Cardiolipine
CS	Citrate synthase
DHA	Acide docosahéxaénoïque
EPA	Acide eicosapentaénoïque
ERO	Espèce réactive d'oxygène
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GST	Glutathion S transférase
IDL	Indice de double liaison
IP	Indice de peroxydation
MDA	Malondialdéhyde
n-3 AGPI	n-3 acide gras polyinsaturé
n-6 AGPI	n-6 acide gras polyinsaturé
n-9 AGPI	n-9 acide gras polyinsaturé
Nfr2	NF-E2-related factor 2
Ni	Nickel
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
PS	Phosphatidylsérine
SOD	Superoxyde dismutase

Partie 1

Synthèse bibliographique

Introduction générale

Le changement climatique, un sujet d'actualité, est devenu une réalité aux conséquences potentiellement désastreuses. Selon le dernier rapport du groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC), les impacts devraient s'accroître et les récents modèles de prédiction prévoyaient une augmentation de 0,2°C/an au cours des deux prochaines décennies et entre 1,8 à 4°C jusqu'à 2100 (IPCC, 2007). Les écosystèmes aquatiques sont potentiellement vulnérables à cette modification surtout que la majorité des organismes sont ectothermes (Bressin and Willmer, 2000). Comme la température de leur corps change en fonction de celle du milieu externe, la température joue un rôle important dans la physiologie de ces organismes et peut influencer le taux des réactions ainsi que la stabilité des molécules biologiques (Hochachka and Somero, 2002).

D'autre part, certains milieux souffrent d'une pollution anthropique ce qui met les organismes qui y vivent face à plusieurs facteurs de stress en plus de la hausse de température résultant du réchauffement climatique. Les métaux traces sont des polluants persistants dans les milieux aquatiques, ils s'accumulent ainsi dans les organismes aquatiques et peuvent passer le long de la chaîne trophique atteignant les organismes au sommet, y compris l'Homme. Selon le dernier rapport de L'Agence pour le Registre des Substances Toxiques et des Maladies (Agency for Toxic Substances and Disease Registry ou **ATSDR**)¹, qui donne une liste des substances dangereuses pour 2015, 5 des 20 substances classées sont des métaux, dont le cadmium en 7^e position. La compréhension des mécanismes d'interaction des facteurs de stress, comme la température et la contamination métallique, est importante pour mieux prédire leurs effets sur les écosystèmes aquatiques.

Les cellules vivantes ainsi que les organites qu'elles contiennent (mitochondries, réticulum endoplasmique...) sont délimités par des membranes. Ces membranes sont

¹ https://www.atsdr.cdc.gov/spl/resources/atsdr_2015_spl_detailed_data_table.pdf

constituées de lipides dominés principalement par des phospholipides, et dans lesquels sont incrustés des protéines qui participent aux différentes fonctions cellulaires. Par conséquent, et comme pour les protéines qui ont une multitude de fonctions cellulaires, les lipides membranaires ne présentent pas un simple rôle constitutif de base, ils ont des rôles fonctionnels importants.

Les phospholipides sont les éléments structuraux et fondamentaux des membranes biologiques, ils constituent une famille de molécules très diverses (Stillwell and Wassall, 2003). Cette diversité vient de l'hétérogénéité des têtes polaires ainsi que des chaînes acyles qui constituent les espèces moléculaires et leur confèrent un caractère amphiphile. L'assemblage des phospholipides constitue une barrière séparant la cellule ainsi que les organites de leur milieu extérieur et contrôlant ainsi le déplacement des molécules entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule ou des organites. Étant donné qu'ils sont les composés majoritaires des membranes, il est donc bien évident que les caractéristiques physiques et biologiques des membranes sont influencées par leur composition en phospholipides.

Il est clair dans la littérature que les modifications de la composition lipidique des membranes jouent un rôle important dans l'acclimatation des organismes poïkilothermes aux facteurs de stress externes. Parmi ces facteurs, les variations de température peuvent d'une part altérer l'ordre des lipides membranaires et d'autre part affecter les fonctions de certaines protéines. Ces altérations, si elles ne sont pas compensées, peuvent mettre en danger le fonctionnement de la cellule en particulier et la survie de l'organisme en général (Crockett, 2008b). Les organismes dans ces conditions exploitent la diversité des phospholipides et restructurent leurs membranes en réponse aux changements de température. À de faibles températures, les membranes tendent à être plus rigides, donc les organismes répondent par une augmentation des insaturations, assurée par des désaturases qui sont induites en conditions de froid, pour maintenir la fluidité et le fonctionnement de la cellule. C'est pour cette raison que la composition des phospholipides membranaires en acides gras a

été largement étudiée pour caractériser l'acclimatation thermique des membranes biologiques.

Par ailleurs, les contaminants métalliques constituent aussi une source de stress en engendrant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui peuvent endommager les macromolécules biologiques, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN (Valko et al., 2006). Les ERO suffisamment réactives et capables d'extraire un atome d'hydrogène à partir d'une chaîne hydrocarbonée initient la peroxydation lipidique. Ce processus engendre des portions de phospholipides peroxydés dont la présence constitue un risque pour l'intégrité membranaire. Par ailleurs, les organismes vivant à de basses températures sont plus vulnérables à ce phénomène du fait que leurs membranes sont plus riches en acides gras polyinsaturés, ces derniers étant plus facilement oxydés que les acides gras saturés (Crockett, 2008b). Les cellules sont protégées contre les ERO par un système de défense enzymatique et non-enzymatique, mais dans le cas où ce dernier est excédé par les ERO, la cellule se trouve devant le risque d'un stress oxydant et d'une peroxydation lipidique (Storey, 1996).

Le stress thermique ainsi que la contamination métallique sont deux facteurs de stress qui ont été largement étudiés individuellement chez différentes espèces. Les dernières années, quelques études commençaient à examiner leurs effets combinés. Ce projet vise donc à examiner les effets combinés de la température et d'une exposition aux contaminants métalliques chez deux espèces de poissons à différents niveaux : au niveau biochimique par l'examen de la réponse du système de défense antioxydante (enzymatique et non-enzymatique) en lien avec la capacité aérobie, la lipoperoxydation et la composition des acides gras des phospholipides membranaires ; et au niveau génomique par le suivi de l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme des phospholipides membranaires et la défense antioxydante. Spécifiquement, ce projet examinera les effets d'une acclimatation à différentes températures en combinaison avec une contamination métallique par voie aqueuse sur la composition des acides gras des phospholipides membranaires totaux, la capacité aérobie, le système de défense antioxydante et la peroxydation lipidique chez deux espèces de poissons, soient la

perchaude (*Perca flavescens*) et le mené à grosse tête (*Pimephales promelas*), afin de déterminer et de comparer la réponse de ces espèces différentes dans leur tolérance aux métaux et leur capacité d'acclimatation thermique. Enfin, mon projet déterminera l'effet de ces facteurs de stress sur la composition des membranes, sur le taux de transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras des phospholipides membranaires et sur la réponse antioxydante dans le but de mieux comprendre à un niveau moléculaire les différentes réponses observées.

1. Synthèse bibliographique

1.1 Les membranes biologiques : généralités

Toutes les cellules et les organites intracellulaires sont délimités par les membranes biologiques. Il s'agit d'une matrice de lipides arrangés en deux couches avec une partie hydrophobe à l'intérieur rendant la membrane imperméable aux composés polaires et une partie hydrophile dirigée vers l'extérieur (de Kroon et al., 2013). En 1972, Singer et Nicolson ont défini la structure membranaire par « le modèle de la mosaïque fluide ». Ce modèle a été utilisé pendant longtemps comme une base pour la compréhension de la structure membranaire. Selon ce modèle, une membrane biologique est une bicouche visqueuse de lipides traversée par des protéines où les lipides sont en mouvement latéral. Les protéines sont aussi en mouvement mais plus lent par rapport à celui des lipides (Singer and Nicolson, 1972). Il s'agit d'une mosaïque de composés : lipides, protéines et glucides (Fig. 1).

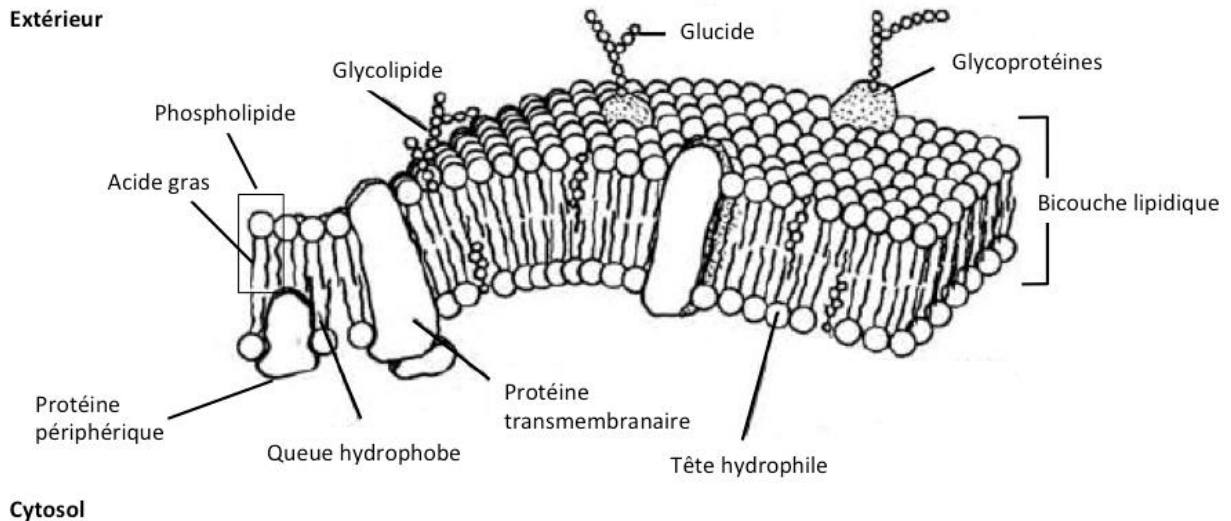


Figure 1 : Structure des membranes cellulaires selon le modèle de la mosaïque fluide.

Source : <http://www.chimix.com/an13/cap13/cap148.html> (modifié)

Dans cette structure bidimensionnelle, les lipides sont les principaux constituants et ils présentent entre 30 et 80% de la masse membranaire, le reste étant des protéines (20-60%) et des glucides (0-10%) (Catala, 2009), ces proportions variant selon le type de membrane. La fluidité des membranes facilite le mouvement des molécules à travers ou dans leur plan et contrôle ainsi de nombreuses fonctions cellulaires.

Toutefois, une nouvelle théorie a été élaborée par Hulbert and Else (1999), la « théorie du Pacemaker » qui soutient le rôle des constituants lipidiques dans le fonctionnement cellulaire et démontre que la composition en acides gras des lipides membranaires constitue un facteur déterminant du taux métabolique et que les insaturations des phospholipides membranaires sont corrélées aux activités métaboliques cellulaires. En revanche, il existe des fonctions cellulaires qui dépendent des lipides mais qui ne répondent pas aux variations globales des acides gras membranaires. De ce fait, une autre hypothèse a été évoquée et sollicite l'idée de l'existence de domaines particuliers ou microenvironnements formés entre les régions hydrophobes des protéines et des lipides membranaires conférant ainsi un fonctionnement optimal aux protéines. Cette hypothèse a été renforcée par la découverte des radeaux lipidiques (Quinn, 2010).

1. 2 Composition des membranes biologiques

1. 2. 1 Les lipides

Les lipides ont plusieurs rôles biologiques. Ils sont les éléments structuraux des membranes biologiques, des métabolites énergétiques ou des précurseurs de plusieurs messagers intra et extracellulaires. Leur structure est formée principalement par des longues chaînes hydrocarbonées pouvant contenir oxygène, phosphore, soufre ou azote. Selon leur affinité aux solvants en chromatographie liquide, ils peuvent être classés en lipides neutres, dominés par la classe des triglycérides, et lipides polaires, représentés majoritairement par les phosphoglycérides.

Les lipides polaires, les constituants des lipides membranaires, sont formés par l'association de deux ou plusieurs acides gras et sont divisés en plusieurs classes : les glycérophospholipides, les sphingolipides, les glycolipides et les stéroïdes (Fig. 2). Les glycérophospholipides avec les représentants majeurs des sphingolipides sont les espèces lipidiques les plus abondantes dans les membranes biologiques et ils sont nommés couramment phospholipides (Hochachka and Somero, 2002).

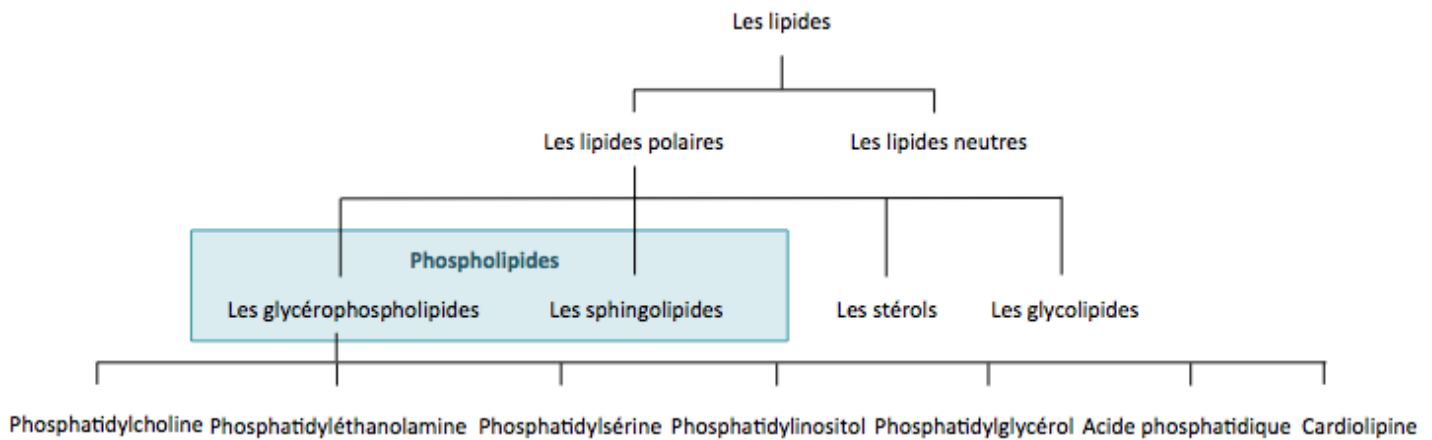


Figure 2 : Classification des lipides

1. 2. 1. 1 Les phospholipides

Les phospholipides sont constitués généralement par l'assemblage de deux chaînes acyles (diacylglycérophospholipides) estérifiées au niveau de la position *sn*-1 et *sn*-2 et un phosphate ou un phosphoryalcool estérifié au niveau de la position *sn*-3. La cardiolipine mitochondriale présente l'exception à cette forme du fait qu'elle est constituée par quatre acides gras formant une structure dimérique par l'assemblage de deux glycérophospholipides (de Kroon et al., 2013). Selon la nature de leurs têtes hydrophobes, les phospholipides sont classés en phosphatidylcholine (PC), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylglycérol (PG), acide phosphatidique (PA) et cardiolipine (CL) (Fig.3).

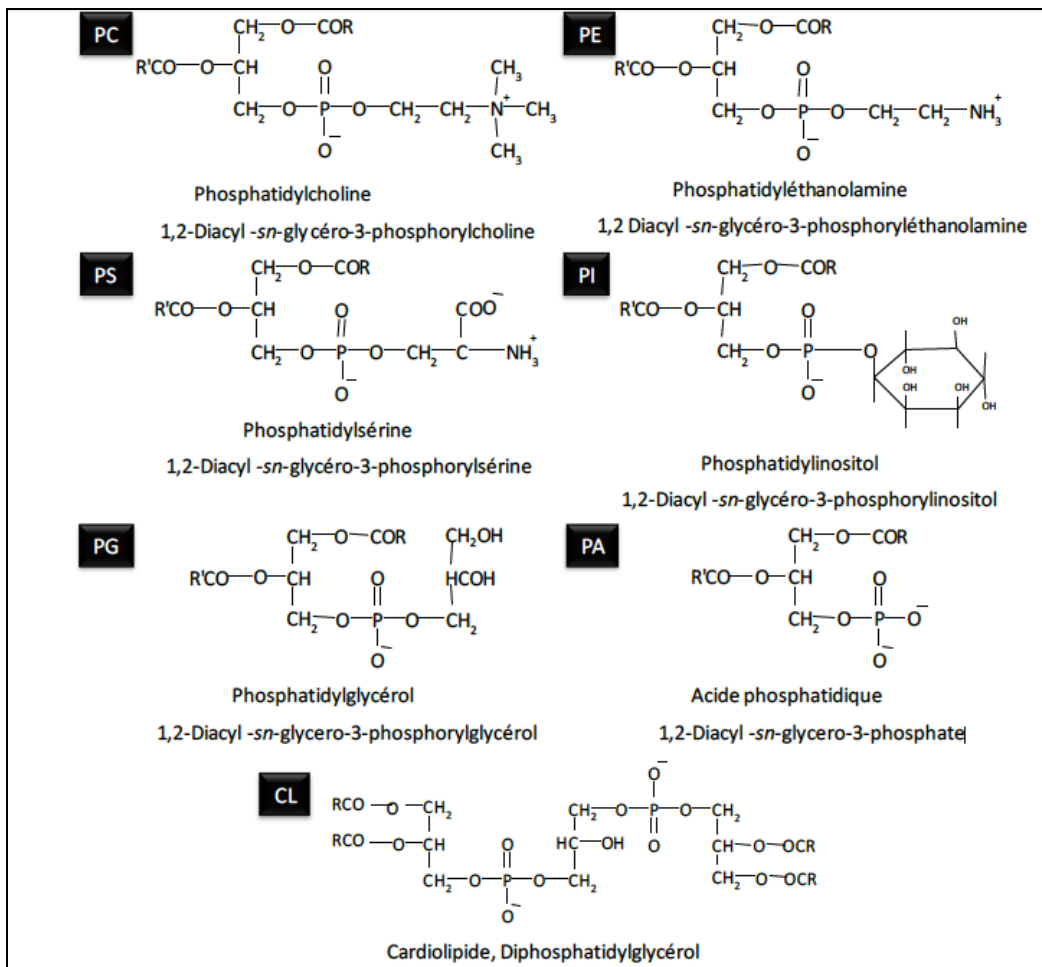


Figure 3 : Classification des phospholipides selon la nature de la tête polaire (Le Grand, 2012)

Ces phospholipides sont présents chez les organismes vivants mais l'abondance de chaque classe diffère selon les espèces, l'organe et même les organites (tableau 1). En outre, cette composition peut varier aussi selon les facteurs endogènes (sexe, état de reproduction...) et exogènes (température, salinité, diète...) (Kostetsky and Velansky, 2009). Ils constituent une matrice dans laquelle s'incrustent des protéines. En outre, ils ne sont pas distribués d'une façon aléatoire, ils sont ainsi caractéristiques des différentes organelles influençant leur forme, structure et fonction (Dowhan, 1997).

Tableau 1 : Composition lipidique de certaines membranes biologiques.

Lipides	Érythrocyte (humain)	Myéline (humain)	Mitochondrie (cœur de bœuf)	<i>E. coli</i>
PA	1,5	0,5	0	0
PC	19	10	39	0
PE	18	20	27	65
PG	0	0	0	18
PS	8,5	8,5	0,5	0
CL	0	0	22,5	12
Sphingomyéline	17,5	8,5	0	0
Glycolipides	10	26	0	0
Cholestérol	25	26	3	0

Source : C. Tanford, *The Hydrophobic Effect*. Dans (Karp, 2004).

Les valeurs sont exprimées en pourcentage du poids des lipides totaux.

PA : acide phosphatidique

PC : phosphatidylcholine

PE : phosphatidyléthanolamine

PG : phosphatidylglycérol

PS : phosphatidylsérine

CL : cardiolipine

Les membranes biologiques constituent une barrière qui protège les cellules et les organites cellulaires et qui contrôle des processus spécifiques dans certains compartiments. En effet chaque organite présente une composition bien spécifique du point de vue phospholipides ce qui influence sa forme, structure et fonction (tableau 2) (Dowhan, 1997).

Tableau 2 : Composition lipidique de quelques fractions membranaires (foie de rat)

	Mitochondrie	Réticulum endoplasmique	Lysosomes	Appareil de Golgi	Membrane plasmique
Phospholipides (mg/mg Protéines)	0,175	0,374	0,156	0,825	0,627
% des phospholipides totaux					
PC	44	60	48	51	40
PE	34	23	17	21	24
PI	5	10	6	12	8
PS	1	2	3	6	9
CL	14	1	1	1	1
AP	<1	1	1	<1	1

Source : Données prises de Daum and Vance (1997)

PC : phosphatidylcholine

PE : phosphatidyléthanolamine

PI : phosphatidylinositol

PS : phosphatidylsérine

PA : acide phosphatidique

CL : cardiolipine

1. 2. 1. 2 Les acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques de la forme (R-COOH) dont le radical R lié à un groupement carboxyle se présente sous forme d'une chaîne aliphatique dont la longueur varie selon l'acide gras. Ils se distinguent entre eux par le nombre de carbones constituant la chaîne aliphatique et le degré d'insaturation. La nomenclature est la suivante : C_n:X-Y où n est le nombre de carbones, X est le nombre de doubles liaisons et Y la position de la première double liaison qui se compte à partir de l'extrémité terminale de la chaîne. D'autres nomenclatures peuvent être utilisées comme C_n: mΔ(p, p'..) ou les séries ω, dont m et ω présentent toujours la position de la première double liaison.

Selon la présence, l'absence et le nombre de doubles liaisons, les acides gras sont classés en trois catégories : les saturés AGS (sans double liaisons), les moninsaturés AGMI (une double liaison) et les polyinsaturés AGPI (plus d'une double liaison).

1. 2. 2 Les protéines membranaires

Les membranes sont constituées par l'assemblage de lipides et de protéines par des liaisons non covalentes dans la bicouche. Les protéines membranaires participent aux différentes fonctions des membranes cellulaires, incluant la compartimentation, le transport des solutés, la réponse aux signaux de transduction externes et les interactions intercellulaires. Chaque type de cellule contient un ensemble de protéines membranaires bien spécialisées pour leur propre fonctionnement. Le ratio lipides/protéines varie en fonction du type de membrane cellulaire (plasmique, mitochondriale..), du groupe taxonomique (animal, plante, bactérie...) ainsi que du type de cellule (musculaire, rénale, hépatique...) (Karp, 2004). Selon leurs interactions avec la membrane cellulaire, les protéines membranaires sont classées en trois catégories : les protéines intrinsèques, d'ancrage et extrinsèques.

- **Les protéines intrinsèques** : intégrées ou transmembranaires, ce sont des protéines qui ressemblent aux protéines hydrosolubles du point de vue structure et composition en acides aminés.
- **Les protéines à ancrage lipidique** : sont liées par des liaisons covalentes aux lipides membranaires.
- **Les protéines périphériques** : liées indirectement à la bicouche lipidique soit par une liaison directe avec les groupements des têtes des phospholipides ou indirectement avec les protéines intrinsèques (Lodish et al., 2005).

1. 4 Caractéristiques des membranes biologiques

Les phospholipides constituant la membrane sont en mouvement latéral dans la bicouche lipidique, ce qui explique le caractère fluide des membranes. Cette mobilité a été mise en évidence par microscopie après avoir marqué les têtes polaires avec des particules fluorescentes ou de l'or (Karp, 2004). Ce caractère de fluidité dépend de plusieurs paramètres : la composition lipidique de la bicouche, la structure et la longueur des chaînes acyles des phospholipides membranaires ainsi que la température.

En effet, les phospholipides possédant de longues chaînes d'acides gras ont tendance à s'agréger et à donner un état gélifié alors que ceux avec des chaînes plus courtes forment une bicouche plus fluide à cause de leur faible surface d'interaction. Les insaturations au niveau des chaînes acyles contribuent à augmenter la fluidité des membranes, ceci est dû aux interactions de Van der Waals qui sont faibles et moins stables (Lodish et al., 2005).

Chaque type de membrane cellulaire a une composition de lipides bien spécifique qui diffère entre les cellules par le type des lipides, la nature de la tête hydrophobe ainsi que les espèces constituant les chaînes acyles. La composition ainsi que les propriétés physiques diffèrent entre les deux couches avec une viscosité plus élevée dans la couche interne. Lorsque la température change, l'asymétrie des propriétés physiques peut être maintenue contrairement à la composition chimique qui varie en fonction de la température (Devaux and Morris, 2004).

La distribution des différentes espèces lipidiques de part et d'autre des deux couches de la membrane ne se fait pas au hasard. Par exemple le PI dans la couche interne a un rôle dans le fonctionnement et le métabolisme de la cellule : le clivage de sa tête polaire par des phospholipases C produit des phosphoinositols et des diacylglycérols et ces métabolites vont participer à des voies de signalisation intracellulaires (Lodish et al., 2005).

1. 4 Acclimatation des membranes biologiques aux variations de la température

1. 4. 1 Effets de la température sur la structure et les fonctions des membranes biologiques

La température est comptée parmi les facteurs importants qui peuvent influencer la distribution biogéographique et la performance des espèces aquatiques ectothermes (Penet et al, 2007). Les membranes cellulaires présentent une sensibilité aux changements de la température qui peuvent agir sur leur composition lipidique, modifier leurs propriétés physiques et influencer les propriétés des protéines associées. En effet, une variation de la température altère la fluidité membranaire, le taux de

diffusion, la vitesse des réactions chimiques et enzymatiques et peut donc conduire au dysfonctionnement de la cellule (Penet et al, 2007).

À la température physiologique (température proche de la température d'acclimatation de l'individu), la bicouche se trouve dans un état fluide appelé « phase fluide » ou « phase liquide-cristalline ». À cette température, la rotation carbone-carbone autour d'une liaison simple se fait librement le long de la chaîne acyle des acides gras ce qui confère une fluidité membranaire optimale pour le fonctionnement de la cellule. Lorsque la température diminue par rapport à la température physiologique, le mouvement des chaînes acyles des acides gras diminue ce qui provoque un ordre élevé au sein de la bicouche et la membrane passe à la phase gel (Hazel, 1995). Le passage de l'état fluide à l'état gel se fait à une température qui s'appelle température de transition de phase (T_m) (Hazel, 1995).

Le passage des membranes de l'état fluide à l'état de gel peut présenter plusieurs menaces pour la survie de la cellule, dont le changement de la localisation de certains phospholipides membranaires qui mène à la formation d'agrégats visqueux, ce qui exclut certaines protéines intégrées dans la membrane. En outre il y aura une réduction de certaines fonctions en relation avec la diffusion facilitée par des protéines membranaires. La formation de la phase gel aussi a un effet sur la perméabilité membranaire, et peut aboutir à la création d'un flux incontrôlable d'eau et de solutés au niveau des jonctions entre les zones des deux phases fluide et gel (Hochachka and Somero, 2002).

Lorsque la température augmente par rapport à la température physiologique, le mouvement des chaînes acyles augmente et par conséquent la fluidité, ce qui conduit à la formation d'une phase appelée hexagonale inversée (Phase hexagonale II, H_{II}) et la température de ce passage est appelé T_h . À cette température, les phospholipides changent de conformation géométrique et passent de la forme conique à la forme cylindrique, ce qui rend leur incorporation et leur maintien dans la bicouche difficile (Hazel, 1995).

Donc en réponse aux changements de température et pour maintenir l'intégrité membranaire, la composition lipidique doit changer pour conserver la structure de phase et la phase fluide doit être maintenue à des températures faibles et élevées (Hochachka and Somero, 2002).

1. 4. 2 Acclimatation des membranes aux changements de la température

Les études basées sur les méthodes biochimiques et biophysiques ont montré que chez les poïkilothermes, les organismes répondent aux changements de température par la modulation de la composition des membranes cellulaires. Ce mécanisme sert à maintenir relativement constante la fluidité membranaire et à maintenir l'intégrité cellulaire (Cuculescu et al., 1995). (Sinensky, 1974) a été le premier à observer que la fluidité membranaire chez *Escherichia coli* a été conservée avec la modification de la température, d'où la théorie de l'adaptation homeovisqueuse (AHV). Depuis, plusieurs études ont investigué les effets de la température sur les différents aspects de la membrane (Hazel, 1984, 1995; Hazel and Landrey, 1988; Hazel and Williams, 1990b; Hazel et al., 1991). Le remodelage de la composition lipidique des membranes biologiques en réponse aux variations des conditions environnementales est caractérisé par un changement des têtes polaires des phospholipides et de leurs chaînes acyles ainsi que de la teneur en cholestérol (Hazel and Williams, 1990b).

Selon le sens le type de la modification produite par la variation de la température, les membranes deviennent plus ou moins fluides par des changements dans leur composition phospholipidique : s'il y a eu une augmentation de la fluidité suite à une élévation de la température, la réponse sera une diminution des insaturations des acides gras constituant les PL membranaires, et inversement dans le cas de diminution de la fluidité.

De ce fait, le changement de la composition membranaire en PL suite à une variation de la température implique une régulation du métabolisme lipidique pour adapter les propriétés physiques ainsi que l'état de phase de la membrane aux nouvelles conditions du milieu environnant. Ceci peut être une conséquence de

l'altération des produits de la biosynthèse des lipides, comme de la dégradation des lipides qui ne possèdent pas des propriétés adéquates aux nouvelles conditions (Hazel and Williams, 1990b).

La réponse à l'altération des produits du métabolisme lipidique se fait par trois sortes de stratégies :

- Les réactions métaboliques d'acides gras et d'acyl CoA, qui impliquent la synthèse *de novo*, la désaturation, l'élongation et le raccourcissement des chaînes acyles.
- La synthèse *de novo* de phospholipides qui détermine la composition des chaînes acyles ainsi que des groupements de tête des phospholipides nouvellement synthétisés.
- Les réactions de catabolisme et remodelage des phospholipides qui modifient les produits de la voie de la synthèse *de novo* (Hazel and Williams, 1990b).

Chez des poissons, dans certains tissus comme les membranes des érythrocytes de l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) (Lecklin and Nikinmaa, 1999), la membrane plasmique des spermatozoïdes de la truite arc-en-ciel (Labbe et al., 1995) et le rete mirabile du thon rouge (*Thunnus thynnus*) (Fudge et al., 1998), la variation de la température n'a pas entraîné une modification dans la composition en acides gras conforme à la théorie de l'AHV, d'où l'idée de l'adaptation homéophasique. Contrairement à l'adaptation homéovisqueuse, qui consiste en des modifications compensatoires de manière à maintenir une fluidité optimale face aux changements de température, l'adaptation homéophasique réfère à un maintien de la membrane dans un état de phase relativement constant et des différentes fonctions membranaires indépendamment de la fluidité.

1. 4. 3 Biosynthèse des acides gras membranaires chez les poissons

La biosynthèse des AGPI-LC implique une série de désaturations et d'élongations. Chez les vertébrés, deux groupes d'enzymes sont impliqués dans la synthèse des AGPI-LC : les désaturases qui incorporent des doubles liaisons au niveau des chaînes acyle et les élongases qui catalysent l'étape de condensation pendant le processus d'élongation (Jakobsson et al., 2006) (Fig. 4).

1. 4. 3. 1 L'insaturation

Les acides gras sont désaturés par deux classes d'enzymes : les stéroyl-CoA désaturases ($\Delta 9$) et les désaturases $\Delta 5$ et $\Delta 6$. Ces enzymes contribuent à la synthèse des AGI qui seront par la suite incorporés dans les membranes biologiques pour régler la fluidité. Les poissons sont incapables de synthétiser *de novo* des AGPI de la série n-3 et n-6 à partir de la diète, ils convertissent l'acide linoléique (18 :2n6) en ARA et l'acide linoléique (18 :3n6) en EPA et DHA suite à une série de désaturations et d'élongations (Tocher, 2010). Plusieurs études ont démontré que les poissons d'eau douce possèdent une capacité supérieure à accomplir les différentes étapes de la biosynthèse des AGPI-LC comparé à des espèces marines (Agaba et al., 2005; Morais et al., 2012a; Morais et al., 2009a; Tocher et al., 2006a). Cette différence des capacités de désaturation et d'élongation n'est pas encore bien expliquée, mais des études ont suggéré qu'elle peut être due à une adaptation à la richesse de la diète en AGPI (da Costa et al., 2011) chez les poissons marins ou encore résulter d'une adaptation par une régulation à la baisse de l'activité des désaturases impliquées dans la conversion des AG précurseurs (Morais et al., 2015).

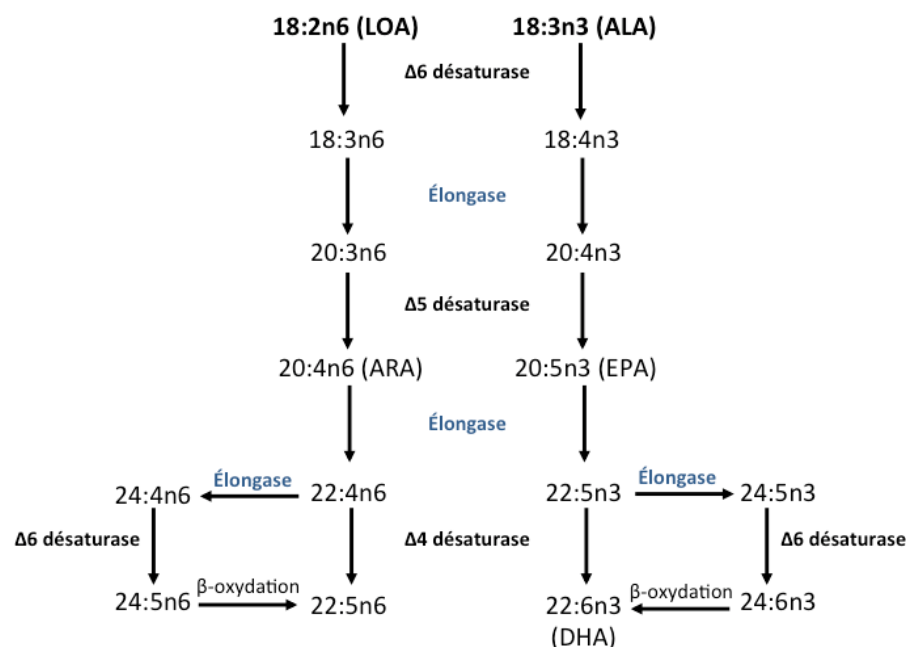


Figure 4 : Voie de biosynthèse des acides gras chez les vertébrés (Monroig et al., 2013)

La synthèse de DHA à partir de l'EPA passant par l'intermédiaire des acides gras C24 (24 :5n3 et 24 :6n3) a été démontrée initialement chez des rats (Sprecher, 2000b), puis chez des poissons. Les désaturases ont été identifiées chez plusieurs espèces de poissons (tableau 3). Une désaturase bi-fonctionnelle $\Delta 5/\Delta 6$ chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), désaturant 24 :5n3 en 24 :6n3, a été identifiée (Tocher et al., 2003). Ces études ont émis l'hypothèse que cette voie est l'unique chez les vertébrés aboutissant à la formation du DHA. Conséquemment, les auteurs ont conclu que la voie empruntant la $\Delta 4$ pour synthétiser le DHA directement à partir du 22 :5n3 n'existe pas chez les vertébrés. Cependant, une étude antérieure a démontré que la synthèse de DHA à partir du 22 :5n3 est possible chez quelques vertébrés, comme chez le sigan pintade (*Siganus canaliculatus*) (Li et al., 2010a), la sole (*Solea senegalensis*) (Morais et al., 2012a) ainsi que le poisson à tête de serpent (*Channa striata*) (Kuah et al., 2015). La FADS2 avec une activité $\Delta 6$ représente la famille la plus étudiée chez plusieurs espèces marines et d'eau douce (tableau 3).

Les études antérieures, s'intéressant aux facteurs qui peuvent affecter l'activité ou l'expression des désaturases et des élongases, ont été focalisées sur la diète

(Kennedy et al., 2006; Kuah et al., 2015; Tocher et al., 2006a) et des facteurs environnementaux, principalement la température. Comme mentionné dans la section 4, la première réponse à un stress thermique se manifeste par la modification de la composition des acides gras membranaires. Il a été ainsi rapporté chez plusieurs espèces que l'augmentation du degré d'insaturation à de faibles températures est en relation avec la désaturation et l'élongation des acides gras (Tocher et al., 2004; Wodtke and Cossins, 1991). La variation de l'activité des désaturases en réponse à la température diffère entre les tissus (Tocher et al., 2004). L'induction des désaturases $\Delta 9$ à de faibles températures a été démontrée chez plusieurs espèces (de Torrenco and Brenner, 1976; Hsieh and Kuo, 2005; Porta et al., 2013; Wodtke and Cossins, 1991). Ces auteurs ont supposé que cette induction peut être due à deux mécanismes différents, soit une activation des enzymes latentes par une régulation post-transcriptionnelle ou l'augmentation de la transcription des désaturases (Tiku et al., 1996; Trueman et al., 2000).

1. 4. 3. 2 L'élongation

L'élongation est catalysée par des élongases ELOVL (Elongation of very long chain fatty acids). Sept enzymes de la famille des élongases ont été identifiées (ELOVL 1-7) et qui diffèrent par leurs préférences aux substrats. Les ELOVL1, ELOVL3, ELOVL6 et ELOVL7 utilisent ainsi les AGS et les AGMI comme substrat alors que ELOVL2, ELOVL4 et ELOVL 5 utilisent plus les AGPI (Li et al., 2010a). ELOVL5 et ELOVL2 sont les élongases les plus importantes dans la synthèse des AGPI où ELOVL5 est impliquée dans la synthèse des AGPI de C18-C20 alors que ELOVL2 est surtout spécifique aux AGPI de C20-C22 (Leonard et al., 2004).

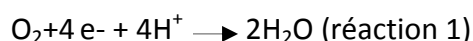
Chez les téléostéens, la première élongase ELOVL5 a été isolée pour la première fois chez le poisson zèbre. Elle possède une activité d'élongation efficace des AG C₁₈ (18 :4n3 et 18 :3n6), C₂₀ (20 :5n3 et 20 :4n6), et une plus faible activité d'élongation pour C₂₂ (22 :5n3 et 22 :4n6) (Agaba et al., 2004). Ultérieurement, des homologues ainsi que d'autres élongases avec des activités différentes ont été identifiées chez plusieurs espèces (tableau 3).

Tableau 3 : Des désaturases et des élongases étudiées chez diverses espèces de poissons.

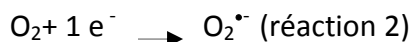
	Espèce	Nom commun	Activité correspondante	Référence
Désaturase	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truite arc-en-ciel	$\Delta 5, \Delta 6$	(Seiliez et al., 2001)
	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpe commune	$\Delta 5, \Delta 6$	(Zheng et al., 2004)
	<i>Psetta maximus</i>	Turbot		
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truite arc-en-ciel		
	<i>Sparus aurata</i>	Daurade		
	<i>Gadus morhua</i>	Morue de l'Atlantique	$\Delta 6$	(Tocher et al., 2006a)
	<i>Salmo salar</i>	Saumon Atlantique	$\Delta 6$	(Monroig et al., 2010), (Zheng et al., 2009)
	<i>Siganus canaliculatus</i>	Sigan pintade	$\Delta 4, \Delta 6, \Delta 5/6$	(Li et al., 2010a)
Élongase	<i>Danio rerio</i>	Poisson zèbre	ELOVL 4	(Monroig et al., 2010)
	<i>Thunnus maccoyii</i>	Thon rouge	ELOVL 5	(Gregory et al., 2010)
	<i>Lates calcarifer</i>	Barramundi	ELOVL 5,6	(Mohd-Yusof et al., 2010)
	<i>Salmo salar</i>	Saumon Atlantique	ELOVL 5, ELOVL 2	(Morais et al., 2009a)

1.5 Le stress oxydant et la réponse cellulaire

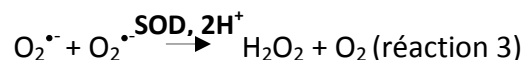
Chez les êtres vivants, l'oxygène est nécessaire pour l'oxydation des nutriments ainsi que la production de l'énergie. Pendant ces processus, il subit une réduction tétravalente, par l'addition de 4 électrons, qui conduit à la formation de l'eau, une réaction (réaction 1) catalysée par la cytochrome oxydase de la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne mitochondriale :



Cependant, les électrons s'échappant de cette chaîne de transport vont réduire partiellement l'O₂ qui donne le radical superoxyde O₂^{•-} (réaction 2), c'est la réduction monoélectrique par l'ajout d'un seul électron (Cadenas and Davies, 2000) :



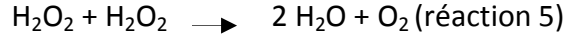
Le radical superoxyde ainsi formé est éliminé ou maintenu à une concentration très basse par la SOD qui catalyse sa dismutation (réaction 3) :



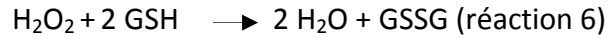
Le H₂O₂ formé peut être aussi issu de la réduction bioélectrique de l'oxygène qui se fait selon la réaction 4 :



Étant donné la toxicité du H₂O₂, des enzymes interviennent pour régler sa concentration, comme la catalase qui accélère sa réaction de dismutation (réaction 5) :

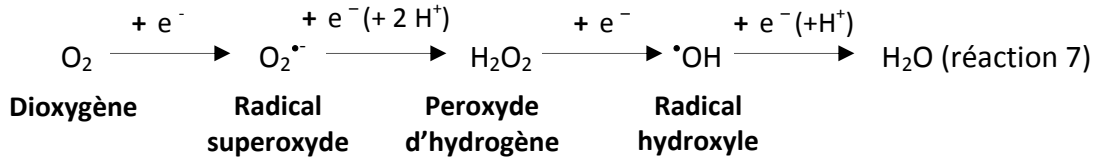


ou la glutathion peroxydase (GPx) qui catalyse l'oxydation du GSH par le H_2O_2 (réaction 6) :



En présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} et Cu^{2+} , le H_2O_2 devient capable de générer le radical hydroxyl $\cdot\text{OH}$, un radical qui endommage les molécules biologiques (Candeias et al., 1995).

Au final, la réduction de l' O_2 en eau fait intervenir des intermédiaires qui se forment suite à l'addition successive de quatre électrons sur l' O_2 (réaction 7), ce sont les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou en anglais ROS : *Reactive oxygen species*) (Gardès-Albert et al., 2003).



Plusieurs conditions environnementales ainsi que des pro-oxydants peuvent induire les enzymes antioxydantes suite à la génération des ERO, produits entre autres par l'exposition à des contaminants (organiques ou métalliques) (Fernandez et al., 2010; Ferreira et al., 2005), les facteurs endogènes ou exogènes comme l'âge (Correia et al., 2003), la diète (Berntssen et al., 2003), le cycle de reproduction (Ringwood and Connors, 2000), la température (Abele et al., 1998) et la variation de la teneur de l'oxygène dans le milieu (Abeleschger and Oeschger, 1995).

Pour minimiser les dommages cellulaires causés par les ERO, les organismes ont développé des systèmes de défense antioxydante qui peuvent être enzymatiques ou non-enzymatiques (Storey, 1996). Une production exagérée de ces radicaux libres, une

diminution du système de défense antioxydante (enzymatique et non enzymatique) ou l'association des deux, crée un déséquilibre entre la production des ERO et leur élimination par le système de défense : c'est le stress oxydant. En effet, les ERO qui ne sont pas éliminées par le système de défense induisent plusieurs dommages comme l'inactivation de certaines enzymes, la dégradation des protéines, des dommages à l'ADN et la peroxydation des lipides (Evans and Halliwell, 1999). En outre, l'augmentation de la production des ERO induit certaines enzymes antioxydantes via l'interaction avec les gènes sensibles et l'augmentation de leur transcription (Livingstone, 2003).

La complexité de la réponse à un stress oxydant reflète ainsi une complexité de la régulation soit au niveau de l'activité des enzymes déjà existantes ou de la synthèse de nouvelles molécules. En effet, plusieurs études se sont intéressées aux effets des métaux sur le niveau d'expression des gènes qui codent pour des enzymes antioxydantes. Quelques-unes ont suggéré une certaine corrélation entre la concentration du métal et l'expression des gènes (Hansen et al., 2007; Zheng et al., 2016a; Zheng et al., 2016b) tandis que d'autres ont montré que les changements à un niveau enzymatique ne reflètent pas nécessairement ceux à un niveau transcriptionnel, d'où l'intérêt d'examiner les effets sur les deux niveaux (Giuliani et al., 2013).

Il a été démontré que l'expression des gènes qui codent pour des enzymes du système de défense antioxydante est sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcription qui sont eux-mêmes activés par des ERO. Parmi ces facteurs, on trouve le Nrf2 (NF-E2-related factor 2), un régulateur de la réponse antioxydante par sa liaison à la séquence contenant des éléments de réponse antioxydante, ARE (antioxidant responsive element) au niveau de la région promotrice activant ainsi l'expression du gène en question (Osburn and Kensler, 2008). Des études ont mis en évidence l'activation de Nrf2 par des contaminants métalliques comme le Cu, le Zn et le Cd (Jiang et al., 2014; Wang and Gallagher, 2013; Zheng et al., 2016a), avec une augmentation parallèle de l'expression des gènes codant pour la SOD, la CAT et Nrf2 en présence de métaux traces et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (Giuliani and Regoli, 2014).

Le Nrf2 est régulé à son tour par la protéine Keap1 (Kelch-like ECH- associated protein 1) qui induit sa dégradation en cas d'absence de stress (Itoh et al., 1999). Les deux ensembles, Nrf2 et Keap1, agissent comme détecteurs du stress oxydant par des ERO ou des électrophiles (Kaspar et al., 2012). En cas de stress oxydant, Nrf2 n'est plus supprimé et le complexe Nrf2/Keap1 se défait permettant la translocation des Nrf2, nouvellement produits, au noyau (Ma, 2013). Une fois dans le noyau, Nrf2 se lie aux gènes contenant des ARE au niveau des régions promotrices (Itoh et al., 1999), comme les gènes codant pour la CAT, GPx et GST (Giuliani and Regoli, 2014). La transcription des gènes cibles est donc activée par Nrf2 et les protéines résultantes interviennent pour éliminer des ERO (Fig. 5) (Lau et al., 2013).

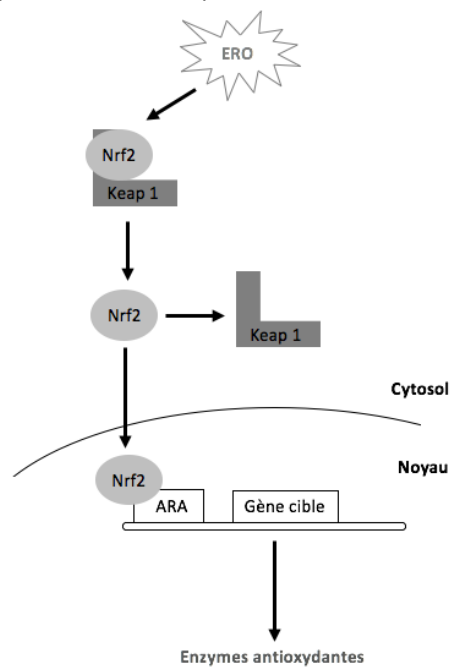


Figure 5 : Expression des gènes codant pour des enzymes de défense antioxydante via l'activation de Nrf2.

1. 6 Toxicité du cadmium et du nickel en relation avec le stress oxydant

La toxicité induite par les métaux traces a été beaucoup étudiée chez les organismes aquatiques. En outre, la température affecte la tolérance des organismes aquatiques aux métaux (Cairns et al., 1975b). Des études ont démontré que l'augmentation de la température s'accompagne par une augmentation de la prise en

charge et de la bioaccumulation des métaux (Mubiana and Blust, 2007; Yang et al., 2007), pouvant ainsi entraîner la mortalité des organismes exposés (Heugens et al., 2003).

1. 6. 1 Le cadmium

Le cadmium est un métal non essentiel. Dans les plans d'eau, il provient principalement des dépôts atmosphériques, par la pluie ou le vent, des décharges industrielles ou même du lessivage des sols agricoles. N'étant pas un métal Fenton, le Cd induit indirectement la production des ERO. Price and Joshi (1983) ont pu démontrer que le Cd peut remplacer le fer ou le cuivre dans certaines protéines cytoplasmiques et membranaires (ferritine, apoferritine) augmentant ainsi la concentration du Fe et du Cu libres qui seront capables d'induire un stress oxydant *via* la réaction de Fenton.

Le Cd est un métal très toxique, ses effets sont multiples et ont été largement étudiés sur de nombreux organismes aquatiques (tableau 5). Ils peuvent aller de la dénaturation des protéines, la peroxydation des lipides jusqu'à l'altération de l'ADN et la modification de l'expression de certains gènes (Galazyn-Sidorczuk et al., 2009; Sokolova et al., 2005; Spurgeon et al., 2004; Wu et al., 2013). En outre, le Cd peut moduler les fonctions mitochondriales, inhiber la chaîne de transport des électrons, induisant ainsi une surproduction des ERO (Miccadei and Floridi, 1993; Sokolova, 2004; Sokolova et al., 2005) ou la stimulation de la perte d'électrons à travers la membrane mitochondriale interne (Al-Nasser, 2000).

1. 6. 2 Le nickel

Le nickel est un métal largement répandu dans le milieu naturel, et il peut être d'origine naturelle ou anthropique. Les activités industrielles et minières ainsi que la combustion des carburants fossiles sont également responsables de l'introduction de quantités considérables de ce métal dans l'atmosphère qui sont éventuellement évacuées vers les milieux aquatiques (Eisler R, 1998). Certaines études ont démontré ou suggéré que le Ni est un métal essentiel pour certains organismes, incluant des bactéries, des plantes, des algues aquatiques et des poissons (Chowdhury et al., 2008;

Denkhaus and Salnikow, 2002; Schnegg and Kirchgessner, 1975; Yusuf et al., 2011). D'autres ont montré qu'il est génotoxique, immunotoxique et cancérigène (Denkhaus and Salnikow, 2002; Kasprzak et al., 2003). Il peut ainsi induire l'oxydation des macromolécules, à savoir l'ADN, les protéines et les lipides, soit directement ou en inhibant le système de défense antioxydante (Kasprzak, 1995; Klein et al., 1991). Il a été proposé que le Ni peut induire un stress oxydant suite à la formation des ERO via la réaction de Fenton/Harber-Weiss qui implique le couple redox $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$ (Torreilles and Guerin, 1990), ou résultant de l'altération du niveau de GSH suite à la formation de complexes Ni-GSH (Krezel et al., 2003), ou encore par l'inhibition des enzymes de défense antioxydante (tableau 4).

Tableau 4 : Résumé des effets des métaux (Cd et Ni) et de la température sur les enzymes de défense antioxydante et sur la peroxydation lipidique chez différentes espèces aquatiques (LPO: Peroxydation lipidique, + : augmentation, - : diminution).

Facteur de stress	Espèce	Nom commun	Organe	Effets	Référence
Cd	<i>Channa punctatus</i>	Demoiselle	Rein, branchies	+LPO, +SOD, +GST, +GPx, +GR, +GSH	(Dabas et al., 2012)
	<i>Clarias gariepinus</i>	Poisson-chat africain	Foie Rein Muscle Branchies	+SOD, +LPO	(Asagba et al., 2008a)
	<i>Japanese flounder juveniles</i>	Flet japonais	Foie	+LPO	(Cao et al., 2012)
	<i>Paralichthys olivaceus</i>		Rein Muscle Branchies	-SOD, +GST, +GPx, + LPO + LPO + LPO	
	<i>Ruditapes decussatus</i>	Palourde	Branchies	+SOD, -CAT, -GPx, + LPO	(Geret et al., 2002)
	<i>Rhamdia quelen</i>	Poisson chat	Foie Rein Branchies	+CAT, +GST, + LPO -/+LPO -CAT, -GST, + LPO	(Pretto et al., 2011)
	<i>Danio rerio</i>	Poisson zèbre	Foie, Cerveau	+ LPO	(Zheng et al., 2016b)
Ni	<i>Carassius auratus</i>	Poisson rouge	Rein Rate	-SOD, -GPx, -GR et + LPO +GPx, +GST,+ GR et+ GSH	(Kubrak et al., 2012)

	<i>Prochilodus lineatus</i>	Prochilode rayé	Foie Rein Muscle Branchies	+ LPO	(Palermo et al., 2015)
	<i>Carassius auratus</i>	Poisson rouge	Foie	-GSH, + LPO	(Zheng et al., 2014)
	<i>Rainbow trout</i>	Truite arc-en-ciel	Cerveau	SOD, +GSH et + LPO	(Topal et al., 2015)
Température	<i>Diplodus vulgaris</i>	Sar à tête noire	Muscle	-CAT, -GST	(Madeira et al., 2013)
	<i>Diplodus sargus</i>	Sar		-GST, + LPO	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Bar		+CAT, -GST, + LPO	
	<i>Gobius niger</i>	Gobie noir			
	<i>Liza ramada</i>	Mulet		+CAT, -GST, + LPO	
	<i>Carassius auratus</i>		Cerveau	+SOD, +GSH	(Lushchak and Bagnyukova, 2006a)
			Foie Rein Muscle	+SOD, + LPO +SOD, +GSH +GSH	(Lushchak and Bagnyukova, 2006b)
	<i>Percottus glenii</i>	Goujon de l'amour	Cerveau Foie Muscle	+ LPO +SOD, -CAT, + LPO + LPO	(Bagnyukova et al., 2007)
	<i>Laternula elliptica</i>		Glande digestive	+ LPO (<i>Laternula elliptica</i>)	(Ramos et al., 2002)
	<i>Mya arenaria</i>				
	<i>Zoarces viviparus</i>	La loquette	Foie	+ LPO	(Heise et al., 2007)

1. 7 Peroxydation lipidique

La peroxydation des lipides joue un rôle essentiel dans le fonctionnement de la cellule et dans plusieurs processus physiologiques (Poon et al., 2004). Par exemple, les aldéhydes produits suite à la peroxydation des AGPI n-3 et n-6 peuvent à de faibles concentrations participer à plusieurs fonctions cellulaires comme les signaux de transduction, l'expression des gènes ainsi que la prolifération des cellules (Uchida, 2003). En revanche et dans le cas où les ERO se trouvent en grandes concentrations, les produits formés suite à la peroxydation des lipides conduisent à la propagation de la formation de radicaux ayant ainsi un effet endommageant. Ce processus se déroule en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison.

1. 7. 1 L'initiation

Dans une membrane biologique, l'initiation de la peroxydation commence par l'enlèvement d'un atome d'hydrogène (H) d'un groupement méthylène (-CH₂-) par un dérivé suffisamment réactif laissant un électron célibataire sur le carbone (-•CH-). Les AGPI sont les plus vulnérables à la peroxydation du fait que l'abstraction de l'atome d'hydrogène est plus facile dû à la présence de doubles liaisons qui affaiblissent la liaison carbone-hydrogène à côté du carbone porteur de la double liaison (Gutteridge, 1995).

1. 7. 2 La propagation

La réaction initiale produit un radical lipidique (L•) qui réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde (LOO•). Ce dernier va réagir avec l'acide gras adjacent par l'abstraction d'un atome d'hydrogène, pour former un hydroperoxyde lipidique (LOOH) avec un deuxième radical lipidique (Catala, 2006). Cette réaction est très rapide du fait que l'acide gras sur lequel un atome d'hydrogène a été enlevé donne un radical alkyle et va par la suite retourner dans un cycle pour générer un radical peroxyde. Cette étape donne aussi naissance à de nombreux isomères d'hydroperoxyde.

Les métaux traces induisent la production des ERO et ces derniers peuvent ainsi initier la peroxydation lipidique une fois qu'ils possèdent l'énergie suffisante pour enlever un atome d'hydrogène de la chaîne d'AG (Girotti, 1985). En outre, la variation de la température présente aussi un effet sur la peroxydation lipidique. Chez les organismes vivant à de faibles températures, la densité et le volume des mitochondries augmentent pour faciliter l'utilisation du flux d'oxygène dans cette condition (Sidell, 1998) avec une capacité oxydative plus élevée que les organismes vivant à des températures élevées (Guderley, 2004). En effet, la richesse des membranes en AGPI comme stratégie d'adaptation au froid, augmente le risque de la peroxydation lipidique (Crockett, 2008a)

1. 7. 3 La terminaison

Pendant cette étape les radicaux lipidiques se combinent pour donner des produits non radicalaires ce qui diminue la vitesse de la réaction de peroxydation. Des antioxydants appelés « chain breaking » peuvent aussi mettre fin à cette réaction par le piégeage des radicaux peroxydes (Guo et al., 2009). En présence d'un métal réduit ou d'ascorbate (sel de l'acide ascorbique), les hydroperoxydes lipidiques formés peuvent ainsi se décomposer pour donner des aldéhydes réactifs : le MDA, 4-hydroxy-2-nonal (HNE), 4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE) et l'acroléine (Esterbauer et al., 1991; Kehrer and Biswal, 2000; Lee et al., 2001; Parola et al., 1999; Uchida, 1999).

1. 7. 4 Conséquences de la peroxydation lipidique sur le fonctionnement cellulaire

La LPO est un processus dégénératif qui attaque les lipides membranaires suite à un stress oxydant (Girotti, 1998) Les effets des métaux ainsi que de la température sur la peroxydation lipidique ont été largement étudiés (Tableau 4). Les ERO ainsi produits initient la peroxydation des AGPI par une chaîne de réaction qui contribue à amplifier les dommages aux macromolécules. Les hydroperoxydes formés en se décomposant donnent plusieurs aldéhydes qui peuvent être considérés comme des messagers secondaires contribuant à augmenter la réaction initiale par les radicaux libres (Catala,

2009). La peroxydation des acides gras n-6 donne principalement le HNE, le 4-HHE et le MDA, tandis que la peroxydation des acides gras n-3 donne surtout le 4-HHE, un médiateur potentiel de la transition de la perméabilité mitochondriale (Kristal et al., 1996). L'accumulation des hydroperoxydes lipidiques formés entre les deux couches lipidiques induit des modifications de l'organisation et de la structure des constituants membranaires. Les phospholipides membranaires sont les premiers à être affectés, à cause de la perte du réarrangement des doubles liaisons avec la dégradation des chaînes acyle des acides gras. Ceci modifie les propriétés physiques et chimiques des membranes et par conséquent altère plusieurs fonctions membranaires (Mosca et al., 2011). Les conséquences de la peroxydation sont ainsi nombreuses, parmi lesquelles on retrouve des modifications structurales de la membrane cellulaire ainsi que la perte de la fluidité membranaire (Girotti, 1998), la chute du potentiel membranaire et l'augmentation de la perméabilité membranaire aux ions, ce qui conduit à la libération du contenu cellulaire (Borchman et al., 1992; Kunimoto et al., 1981; Petrescu et al., 2001). L'oxydation des phospholipides peut avoir des effets délétères sur les membranes cellulaires et sur les protéines membranaires. Plusieurs protéines membranaires sont vulnérables à une modification de leurs activités en fonction de la composition membranaire. Dans ce contexte, une diminution d'à peu près 90% de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase a été révélée suite à la peroxydation des lipides des synaptosomes (Chakraborty et al., 2003). Les protéines kinases, des enzymes dont la liaison à la membrane est fortement influencée par la composition de celle-ci, sont inhibées par l'oxydation des phospholipides membranaires (Drobnies et al., 2002).

1. 8 Choix des espèces

La perchaude (*Perca Flavescens*) est une espèce très pertinente dans les études en écotoxicologie. C'est une espèce très répandue dans le nord de l'Amérique, peuplant les milieux d'eau douce et d'eau saumâtre et pouvant tolérer de faibles teneurs en oxygène dissous dans le milieu (Scott and Crossman, 1973). En outre, cette espèce tolère bien les métaux puisqu'elle est abondante dans des milieux près des zones avec une intense activité minière surtout dans le nord du Canada (Couture and Kumar, 2003; Giguère et

al., 2006; Pyle et al., 2005b). En effet, plusieurs études l'ont pris comme modèle biologique dans le suivi de l'effet des métaux sur les systèmes d'eau douce (Couture et al., 2015; Pyle et al., 2008).

Quant au mené à grosse tête (*Pimephales promelas*), il a aussi été largement utilisé comme modèle dans les études écotoxicologiques (Ankley and Villeneuve, 2006). Son aire de répartition s'étend sur une grande partie du centre de l'Amérique du Nord (Scott and Crossman, 1973). Il préfère les petits ruisseaux à faible courant, les étangs et les petits lacs à fond vaseux (Bernatchez and Giroux, 1991). Il s'agit d'une espèce résistante caractérisée par sa capacité à tolérer différentes conditions environnementales et à survivre dans des conditions extrêmes (à l'exception d'une acidité pH<6) (Rahel and Magnuson, 1983). Les préférences thermiques des deux espèces sont différentes faisant de la perchaude une espèce préférant les eaux froides contrairement au mené à grosse tête qui apprécie les eaux plus chaudes. Dans ce contexte, une étude examinant les différentes températures caractérisant les stades de vie chez plusieurs espèces de poissons d'eau douce dans le nord de l'Amérique, y compris la perchaude et le mené à grosse tête, montre les préférences thermiques chez ces deux espèces (Hasnain et al., 2010) (tableau 5). Comme tous les poissons, ces deux espèces peuvent être exposées aux métaux directement par l'eau ou par la diète.

Tableau 5 : Les températures caractéristiques des deux espèces modèles de cette étude

Perchaude (<i>Perca flavescens</i>)						Mené à grosse tête (<i>Pimephales promelas</i>)					
TOC	PTF	TLS	Tcmax	TOF	TOD	TOC	PTF	TLS	Tcmax	TOF	TOD
25,4	17,6	25,6	35	9,1	15	25,8	26,6	31,3	34,1	19,5	25

Avec **TOC** : Température optimale de croissance
PTF : Préféréndum de la température finale
TLS : Température létale supérieure
TCmax : Température critique maximale
TOF : Température optimale de frai
TOD : Température optimale de développement des œufs

2. Objectifs et originalité du projet

Dans un milieu naturel, les organismes peuvent se trouver face à plusieurs facteurs de stress (naturels ou d'origine anthropique) et ils doivent développer des stratégies d'adaptation pour pouvoir survivre. Plusieurs travaux ont traité des effets de ces facteurs séparément sur différentes espèces de poissons, tandis que dans les milieux naturels, ces espèces ne sont pas exposées à un seul contaminant ou à un seul facteur de stress. Dans de telles conditions, où il y a une interaction entre facteurs de stress naturels et contaminants métalliques, le stress physiologique induit par les facteurs de stress naturels peut affecter la capacité de l'organisme de répondre à la contamination métallique et vice versa. Les effets combinés de ces deux types de stress sont rarement étudiés. Les effets des métaux ont été largement étudiés sur différentes espèces. Il a été démontré qu'en fonction de leur concentration, les contaminants métalliques peuvent induire de nombreuses pathologies. Les métaux peuvent ainsi modifier l'activité et le fonctionnement de certaines enzymes suite à une production accrue des ERO. Ces dernières, une fois formées, peuvent endommager les molécules biologiques y compris les lipides, les protéines et l'ADN et initier la peroxydation des lipides membranaires les plus polyinsaturés. Une variation de la température affecte la composition des membranes cellulaires, induit la production de ces ERO et peut endommager le système de défense antioxydant. C'est le cas par exemple de certaines espèces vivant dans des lacs au Canada proches des régions minières et soumises à de basses températures plusieurs mois par année. Donc, l'effet de chaque facteur a été largement étudié mais leurs effets combinés restent largement méconnus.

Dans ce projet de doctorat, j'ai sélectionné deux métaux, le Cd et le Ni, car plusieurs études en laboratoire ainsi que des investigations sur le terrain ont montré leurs effets délétères sur la physiologie des poissons. Dans notre laboratoire, ces deux métaux ont fait l'objet de plusieurs études sur différentes espèces y compris la perchaude et le mené à grosse tête dans des conditions expérimentales et sur le terrain dans divers milieux aquatiques contaminés. Il a été démontré que ces métaux à des concentrations élevées peuvent avoir plusieurs effets à savoir l'inhibition du

métabolisme mitochondrial (Garceau et al., 2010), l'augmentation du temps d'éclosion avec une mortalité élevée des menés à grosse tête dans des lacs contaminés (Gauthier et al., 2006), la modification de l'expression de certains gènes codant pour des enzymes du système antioxydant chez la perchaude (Pierron et al., 2009) avec des effets sur la condition physique générale, la capacité de nage ainsi que la capacité métabolique tissulaire (Rajotte and Couture, 2002). Dans les zones d'exploitation minière, et dû aux rejets dans l'environnement terrestre et aqueux, les concentrations de ces métaux sont encore importantes malgré les efforts pour les diminuer. Les deux régions de Sudbury (Ontario) et de Rouyn-Noranda (Québec) représentent des exemples de zones minières où les concentrations de ces métaux sont encore élevées. Par exemple dans la région de Sudbury, Gauthier et al. (2006) ont mesuré des concentrations de Ni de l'ordre de 343 µg/l (lac Kelly) et Couture et al. (2008) ont trouvé des concentrations de Cd de l'ordre de 0,52 µg/l dans la même région. Les concentrations que j'ai choisies pour mes expositions ont été sélectionnées selon les expériences antérieures faites dans notre laboratoire et elles reflètent les concentrations les plus élevées retrouvées sur le terrain dans des milieux fortement contaminés².

À notre connaissance, ce projet est le premier qui s'intéresse à l'effet des métaux traces sur la composition des phospholipides membranaires en acides gras. Son objectif général est d'examiner les effets combinés de la température et d'une exposition aux contaminants métalliques sur le plan physiologique, par l'étude des modifications de la composition des membranes cellulaires en relation avec les indicateurs de stress oxydant et leurs répercussions sur la capacité oxydative et au niveau génomique en étudiant la transcription de certains gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras des phospholipides membranaires et dans le système de défense antioxydante. L'étude génomique nous permettra de vérifier dans quelle

² <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/148>
http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/contaminants/psl1-lsp1/compounds_nickel_composes/nickel-eng.pdf

mesure les réponses observées sur le plan physiologique correspondent aux variations d'expression des gènes en question.

Ma thèse repose sur quatre objectifs spécifiques (décrits ci-dessous), dont trois ont été rédigés en articles scientifiques en anglais et un quatrième est présenté en quatrième partie de la synthèse.

Objectif 1 : Examiner les effets combinés de la variation de la température d'acclimatation et de l'exposition aux métaux sur la composition des acides gras des phospholipides cellulaires, le stress oxydant et la peroxydation lipidique chez la perchaude

Il a été démontré que les membranes cellulaires sont très sensibles à la variation de la température, et que la première réponse consiste en une modification de la composition des phospholipides en acides gras (Hazel and Williams, 1990a; Kraffe et al., 2007; Pernet et al., 2007). Cette modification physiologique a des répercussions sur la susceptibilité de lipides membranaires à la peroxydation puisqu'à des faibles températures les membranes sont plus riches en AGPI (Cosgrove et al., 1987; Wang et al., 1994). Ce risque peut aussi être amplifié à de basses températures à cause de l'augmentation de la capacité oxydative et de la prolifération des mitochondries (Egginton and Sidell, 1989; Guderley, 2004). D'autre part, la variation de la température ainsi que la contamination métallique peuvent affecter le système de défense antioxydante (tableau 5). Donc, l'objectif de cette partie consiste à examiner les effets d'une modification de la température sur les acides gras membranaires et sur la capacité antioxydante en lien avec la susceptibilité à la peroxydation lipidique.

Objectif 2 : Examiner les effets combinés de la température et des métaux traces sur la transcription des désaturases et des élongases impliquées dans le métabolisme des acides gras des phospholipides membranaires dans deux tissus différents (muscle et cerveau) chez le mené à grosse tête

Des études antérieures ont montré que les désaturases et les élongases, des enzymes impliquées dans la régulation de la composition membranaire, peuvent être influencées par la modification de la température environnante et que la régulation de l'insaturation des acides gras membranaires est contrôlée par ces enzymes (Tiku et al., 1996; Tocher et al., 2004; Trueman et al., 2000; Wodtke and Cossins, 1991). Le but de cette partie consistera à déceler les effets combinés de la température et des métaux traces sur la transcription des gènes codant pour les désaturases et les élongases au niveau du muscle et le cerveau du mené à grosse tête, afin de mieux comprendre les modifications observées au niveau de la composition des acides gras des phospholipides membranaires. En effet, cette partie nous permettra de déterminer si la restructuration des membranes cellulaires et les modifications observées sous l'effet de la combinaison des deux facteurs de stress sont liées à une modification de la transcription de ces gènes.

Objectif 3 : Examiner la relation entre l'activité des enzymes du système de défense antioxydante et l'expression des gènes codant pour ces enzymes suite à une variation de la température et à une exposition au Cd chez le mené à grosse tête.

Le Cd et la température sont connus pour leurs effets sur le système de défense antioxydante (tableau 4). Les réponses à un stress thermique ou métallique ont été souvent évaluées à un niveau enzymatique et/ou moléculaire à savoir l'activité des enzymes en question ou l'expression des gènes qui les encodent (McClelland et al., 2006; Vergauwen et al., 2013; Wang et al., 2015). Les analyses moléculaires ont souvent été utilisées pour déterminer le lien entre la réponse des enzymes et l'expression des

gènes De nombreuses études se sont intéressées aux effets des métaux traces sur le niveau d'expression des gènes et l'activité des enzymes du système de défense antioxydante (Craig et al., 2007; Giuliani and Regoli, 2014; Zheng et al., 2016a) et ces études ont souligné que les réponses au niveau enzymatiques ne sont pas toujours cohérentes avec l'expression des gènes. Toutefois, rares sont les études qui ont investigué les effets combinés de la température et du Cd sur le système de défense antioxydante de point de vue enzymatique et moléculaire. L'objectif de cette partie est de déterminer les effets des deux facteurs de stress désignés sur le système de défense antioxydante et sur l'expression des gènes de ces enzymes en relation avec le taux de peroxydation lipidique exprimé en termes de concentration de MDA.

Objectif 4 : Comparer les effets de la variation de la température et d'une exposition au Cd sur la capacité oxydative en relation avec la composition membranaire chez la perchaude et le mené à grosse tête.

Comme mentionné dans le premier objectif, les poikilothermes, en réponse à une baisse de la température, restaurent la composition en acides gras de leur membranes cellulaires en diminuant les AGS en faveur des AGPI ce qui rend les membranes plus vulnérables à la peroxydation lipidique. Comme les poissons maintenus à de faibles températures ont une capacité oxydative plus élevée (Guderley, 2004) ce risque de peroxydation peut être amplifié. D'autre part, le Cd est connu pour sa capacité à inhiber la chaîne de transport des électrons augmentant ainsi la production des ERO (Belyaeva et al., 2001; Miccadei and Floridi, 1993). Donc, dans cette partie on s'intéressera aux effets combinés de la température et du Cd sur la capacité oxydative en suivant l'activité de la cytochrome C oxydase (CCO, une enzyme mitochondriale membranaire) et de la citrate synthase en relation avec la composition membranaire.

3. Méthodologie

3.1 Approche méthodologique : exposition au laboratoire

La première partie de mon expérience a été réalisée sur des échantillons produits en 2012 par deux doctorants de mon laboratoire, Julie Grasset et Michel Amery Defo, au cours d'une expérience faite au LARSA (Laboratoire de Recherche en Sciences Aquatiques de l'Université Laval) avec la perchaude. Pour cette raison, le design du présent projet (Fig. 6 A et B) est inspiré du leur, dans le but d'établir par la suite une comparaison interspécifique avec le mené à grosse tête.

Les protocoles d'hébergement et les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux (protocole CIPA 1310-01 et 1301-02).

Pour les expositions du mené à grosse tête, les poissons ont été achetés de Aquatic Research Organisms au New Hampshire. Ils ont été hébergés dans des aquariums qui ont été mis en marche deux mois avant leur arrivée et contenant de l'eau reconstituée à partir de l'eau déminéralisée dont la composition figure à l'annexe 1. Arrivés au laboratoire les poissons ont été maintenus à 25°C, par la suite la température a été diminuée ou augmentée à raison de 2°C/jour pour atteindre 15 et 30°C. Dans cette étude les expositions ont été faites par voie directe et les deux métaux ont été ajoutés progressivement, après avoir atteint les températures finales, jusqu'à l'obtention d'une concentration de 6 µg/l de Cd et 450 µg/l pour le Ni.

Pendant l'exposition, la photopériode était de 8/16h (N/J), le pH a été maintenu à 7,6. Chaque aquarium de 45 litres était muni d'un système de circulation d'eau en filtration continue (physique, chimique et biologique). Durant les expositions (8 semaines), la qualité de l'eau a été suivie en continu par des tests de pH, de teneurs de nitrites, nitrates et ammoniacque avec un nettoyage et un changement d'eau hebdomadaire. Les poissons ont été nourris quotidiennement avec la même quantité d'artémies congelées (*Artemia salina*, Ocean Nutrition). À la fin de la période d'exposition, les paramètres biométriques ont été pris (longueur à la fourche, poids total, poids du foie), les poissons ont été sacrifiés et les tissus ciblés (muscle chez la

perchaude et muscle et cerveau chez le mené à grosse tête) ont été conservés jusqu'au moment de l'analyse (annexe 2). Les échantillons destinés à l'analyse des acides gras membranaires, des essais enzymatiques et de la quantification des protéines ainsi que la MDA ont été immédiatement mis (dans des tubes cryogéniques) dans l'azote liquide puis transférés à -80°C , alors que ceux destinés à l'étude de la transcription des gènes ont été conservés dans une solution RNAlater (la composition est présentée en annexe 5) à 4°C .

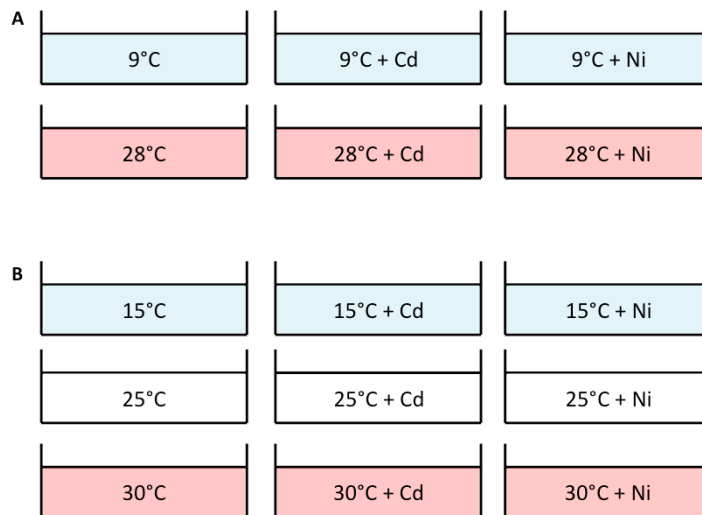


Figure 6 : Design du dispositif expérimental des différentes conditions d'exposition pour la perchaude (A) et le mené à grosse-tête (B).

3. 2 Analyses des échantillons biologiques

3. 2. 1 Analyse de la composition phospholipidique des membranes biologiques

La composition en acides gras des phospholipides membranaires a été déterminée en quatre étapes :

- L'extraction des lipides totaux
- La séparation des lipides polaires et des lipides neutres
- La méthylation des acides gras

- L'analyse des esters méthyliques d'acides gras par CPG-FID (Chromatographie en Phase Gazeuse avec Détecteur à Ionisation de Flamme).

Les détails de la méthode sont présentés dans l'article 1.

3. 2. 2 Dosage des activités enzymatiques et quantification du glutathion

3. 2. 2. 1 Dosage de l'activité des enzymes de défense antioxydante

Les homogénats obtenus (tissu en question avec 9 volumes du tampon d'homogénéisation (pH=7,5, 20 mM HEPES, 1mM EDTA et 1% Triton®X-100) avec un homogénéisateur rotor-stator (Janke Kunkel Ultra Turrax® T25, IKA-Labortechnik, Staufen Allemagne)), ont été divisés en deux parties, la première pour des analyses le jour même pour la CCO, CS, GST et GSH et la deuxième qui a été conservée à -80°C pour les analyses ultérieures de SOD, CAT et GPx sur le muscle et le cerveau chez le mené à grosse tête et sur le muscle uniquement chez la perchaude.

Toutes les activités enzymatiques et les concentrations ont été quantifiées à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible muni d'un lecteur de microplaque (Cary 50 Varian Inc. Walnut Creek, Californie, É-U) avec une dilution spécifique pour chaque enzyme (les mélanges réactionnels et les substrats sont présentés en annexe 4). Les essais ont été réalisés à la température ambiante de la pièce autour d'une moyenne de $24^{\circ}\text{C} \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ étant donné que celle de l'appareil ne peut pas être réglée.

Les détails des protocoles de dosage des activités des enzymes antioxydantes, de la concentration de GSH ainsi que de la concentration des protéines sont présentés dans l'article 1.

3. 2. 2. 2 Dosage des activités des deux enzymes mitochondriales CCO et CS

L'activité de la CCO (E.C.1.9.3.1) a été déterminée selon la méthode de Pelletier et al. (1994) en suivant la diminution de la coloration entraînée par l'oxydation du cytochrome C à une longueur d'onde de 550 nm avec un coefficient d'extinction de 19,1

$\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'activité de la CS a été déterminée par le suivi du changement de l'absorbance de trinitrobenzène (NTB) suite au clivage de l'acide 5,5' dithiobis 2 nitrobenzoïque (DTNB) par le groupement thiol du coenzyme A à une longueur d'onde de 412 nm et un coefficient d'extinction de $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3. 2. 3 Détermination de la concentration de MDA

La concentration de MDA a été déterminée selon la méthode proposée par le Kit no. 10009055 de Cayman Chemical TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) pour évaluer la peroxydation lipidique. Ce dosage vise à déterminer la concentration de MDA suite à sa dérivation avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Il s'agit donc d'une quantification du complexe formé suite à l'association du MDA avec le TBA en conditions acides et à forte température (90°C - 100°C). Les chromophores formés sont absorbants à une longueur d'onde de 530 nm. Il est à noter ici que les homogénats utilisés sont extraits avec le tampon RIPA de Cayman Chemical.

3. 2. 4 Quantification de l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras et pour les enzymes de défense antioxydante

L'analyse des niveaux d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras (désaturases et élongases) ainsi que ceux des enzymes de défense antioxydante ont été déterminés en trois étapes :

- L'extraction des ARN totaux
- Rétro-transcription
- PCR quantitative en temps réel
 - Dénaturation de l'ADN
 - Fixation des amorces pour la fixation du SyberGreen
 - L'élongation par la *Taq* polymérase

Le protocole est détaillé dans les articles 2 et 3.

3. 2. 5 Détermination des concentrations des métaux

Les concentrations du Cd et du Ni ont été suivies en premier lieu dans les eaux des aquariums afin de maintenir aux niveaux désirées, ensuite dans les tissus en question (les reins pour la perchaude et le muscle et le cerveau pour le mené à grosse tête). La quantification a été faite à l'aide d'un ICP-MS (Thermo Elemental, Model X-7). Les détails sont présentés dans les articles 1, 2 et 3.

3. 3 Analyses statistiques et calcul des indices

Les différents indices ont été calculés selon les formules suivantes :

Indice de condition (**CI**) = [Poids (g) / (Longueur du poisson (mm))³] x 100.

Indice hépatosomatique (**IHS**) = (poids du foie (g) / poids du poisson (g)) x 100

Indice de double liaison (**IDL**) est la somme des % des acides gras insaturés multipliés par leur nombre de doubles liaisons (= Σ MUFA + Σ UFAx2 + Σ 3UFAx3 + Σ 4UFAx4 + Σ 5UFAx5 + Σ 6UFAx6).

Indice de peroxydation (**IP**) = 0,025 x (% monoïque) + 1 x (% diénoïque) + 2 x (% triénoïque) + 4 x (% tétraénoïque) + 6 x (% pentanoïque) + 8 x (% hexaénoïque)

Les acides gras monoïques, diénoïques, triénoïques, tétraénoïques, pentanoïques et hexaénoïques sont des acides gras ayant respectivement 1, 2, 3, 4, 5 et 6 doubles liaisons (Almaida-Pagan et al., 2012).

Les indices représentant les activités des désaturases (produit / précurseur) :

Δ 9-désaturase = stearoyl-CoA-desaturase = [16:1 (n-7)/16:0] et [18:1 (n-9)/18:0]

Δ 5-désaturase = 20:5n3/20:4n3

Δ 6-désaturase = 20:4n3/18:3n3

Elongase 22:2n6/20:2n6 et 22:5n3/20:5n3

Les comparaisons des valeurs moyennes obtenues avec des différentes combinaisons de facteurs de stress ont été effectuées par l'analyse de variance (ANOVA), après vérification de la normalité des données (Kolmogorov-Smirnov) et homogénéité (Levene). Si les données n'étaient pas distribuées selon la loi normale, un test Wilcoxon / Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis été appliqué. Dans le cas inverse, le

test HSD de Tukey-Kramer a été appliqué ($p = 0,05$). Des corrélations de Spearman ont été réalisées pour étudier les corrélations entre les différentes variables. Les effets combinés de la température et des métaux sur la composition d'acide gras membranaires, sur le niveau de transcription des différents gènes ainsi que sur les enzymes de défense antioxydante, ont été déterminés par l'analyse de variance à deux facteurs (two-way ANOVA). Des analyses en composantes principales (ACP) ont été effectuées pour mettre en évidence les variables corrélées entre elles.

Les analyses statistiques ont été effectuées avec JMP 11.0.0 (SAS Institute Inc.).

4. Résultats et discussion

4. 1. La contamination métallique modifie-t-elle la réponse à un stress thermique chez la perchaude ?

Dans cette partie les perchaudes ont été acclimatées à deux températures (9 et 28°C) en présence ou absence des deux métaux, Ni et Cd (Fig. 6). Les différentes analyses ont été ainsi effectuées dans le muscle.

4. 1. 1 Effets de la température et des métaux sur les acides gras membranaires

Chez les poïkilothermes, une des premières réponses suite à une variation de la température consiste en une modification de la composition des AG des PL membranaires, soit par la diminution ou par l'augmentation des insaturations selon le sens de la variation.

Dans mon étude sur la perchaude, les individus acclimatés aux deux températures 9°C à 28°C présentent dans leur muscle des profils différents en AG. En effet, l'augmentation de la température s'est accompagnée par une augmentation du pourcentage d'AGS totaux et une diminution des AGMI ainsi que des AGPI (Fig. 7).

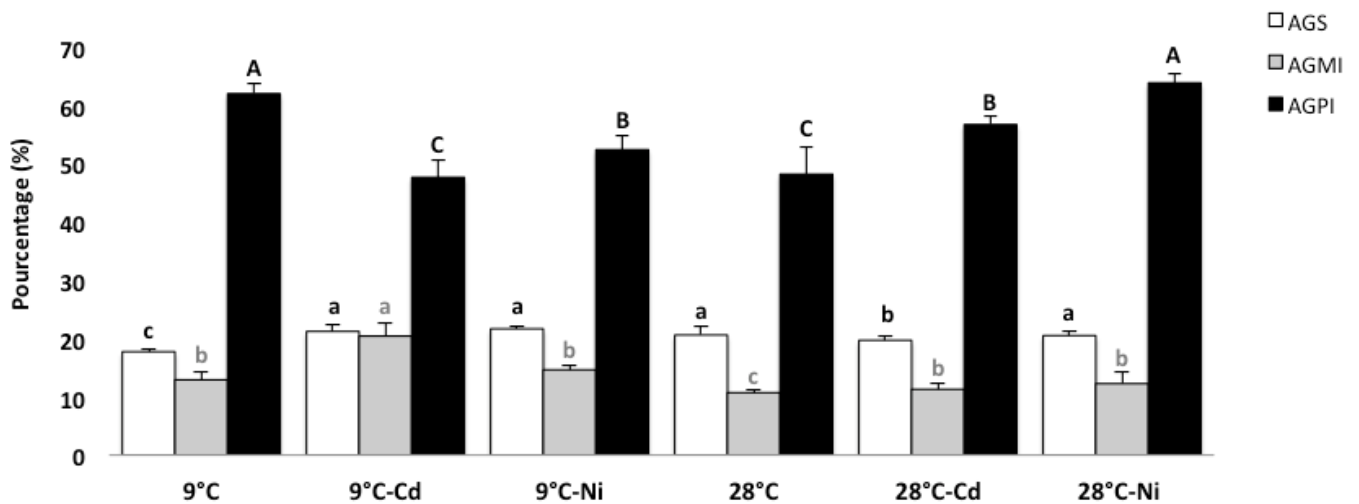


Figure 7 : Effet de la température et des métaux (Cd et Ni) sur la composition membranaire en acides gras dans le muscle de la perchaude.

Les données sont exprimées en termes de moyenne \pm SEM (n=8)

Les barres de même couleur n'ayant pas les mêmes lettres sont significativement différentes.

* Seuls les acides gras majoritaires ont été inclus dans les calculs.

Ces modifications sont conformes à la théorie d'adaptation homéovisqueuse caractérisée par une augmentation des insaturations à des faibles températures (Hazel, 1984, 1995; Kraffe et al., 2007; Logue et al., 2000; Pernet et al., 2006). De plus, l'indice de double liaison chez les individus acclimatés à 9°C est plus élevé que celui chez les individus à 28°C, principalement à cause du 22:5n3 (EPA) et du 22:6n3 (DHA) dont les pourcentages sont corrélés positivement à cet indice (ρ de Spearman_{EPA} = 0,64, $p < 0,0001$, ρ de Spearman_{DHA} = 0,85, $p < 0,0001$). Chez le pétoncle *Placopecten magellanicus* acclimaté à une faible température, le DHA est corrélé à la fluidité membranaire qui elle aussi augmente dans cette condition (Hall et al., 2002). Le DHA est le plus abondant des AG dans les membranes biologiques. La présence des six doubles liaisons dans sa chaîne carbonée lui confère une grande flexibilité (Feller et al., 2002) qui le rend impliqué dans plusieurs propriétés membranaires à savoir la perméabilité

membranaire, la fusion membranaire ainsi que la formation de vésicules (Stillwell and Wassall, 2003). En outre, il a été démontré que les espèces moléculaires contenant du DHA sont importantes dans le contrôle de la fluidité membranaire (Logue et al., 2000).

À une température de 9°C et en présence de deux métaux (Ni et Cd), il y a eu une augmentation des AGS contrairement aux AGPI qui ont diminué (Fig. 7). Cela suggère que la réponse normale à l'acclimatation au froid impliquant les désaturases a été modifiée. Ces résultats génèrent deux hypothèses alternatives : soit que les métaux inhibent directement les désaturases, ou encore ils modifient les propriétés des bicouches de phospholipides et la réponse observée reflète un ajustement compensatoire de leur composition afin de maintenir la fonction membranaire.

À la température la plus élevée, les niveaux d'AGS mesurés en présence de Ni étaient les mêmes que ceux chez les poissons contrôle (Fig. 7). En revanche, pour les AGMI, une augmentation significative a été observée, pour les poissons exposés aux deux métaux. Les pourcentages des AGPI étaient plus élevés chez les individus se trouvant à une forte température en présence du Cd comme du Ni. Dans des conditions de température élevée, et pour maintenir une fluidité optimale des membranes, l'organisme répond normalement en diminuant le nombre d'insaturations dans les PL. En présence du Ni à 28°C, le contraire a été observé, comme si le Ni avait stimulé les désaturases impliquées dans la régulation des AG membranaires.

Selon la figure 8, les indices calculés représentant l'activité de la désaturase $\Delta 9$ (D9D) ainsi que de l'élongase ELOVL2 ont diminué avec la diminution de la température contrairement à $\Delta 5$ et 6 qui n'ont pas été influencées par la température. La présence des métaux n'a pas affecté la désaturase $\Delta 9$. En revanche, la $\Delta 5$ a diminué chez les poissons exposés au Ni à 9°C contrairement à la $\Delta 6$ qui a nettement augmenté aux deux températures. Quant à l'élongase ELOVL2 elle été différemment affectée par les métaux entre les deux températures. Elle a diminué à 9°C sous l'effet des métaux, en revanche, elle a augmenté à 28°C surtout en présence du Cd (Fig. 8).

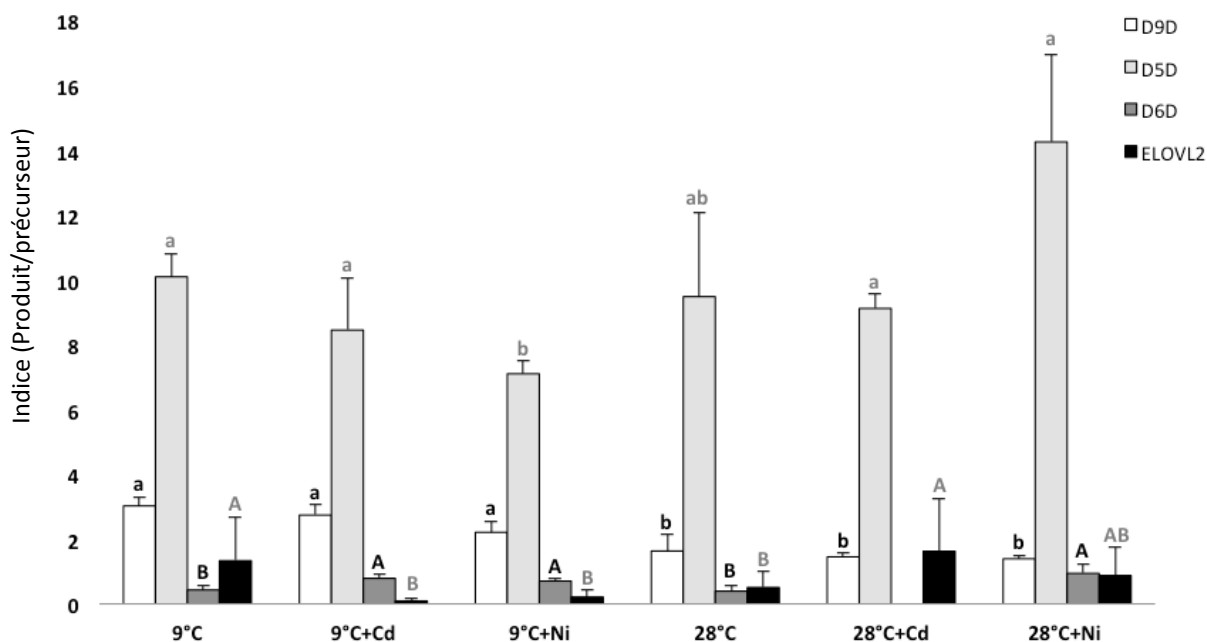


Figure 8 : Variation des indices représentant les activités des désaturases et des élongases membranaires sous l’effet de la température et des deux métaux dans le muscle de la perchaude (n=8).
Les barres n’ayant pas les mêmes lettres sont significativement différentes.

La diminution de l’ELOVL2 à 9°C chez les individus exposés au Cd s’est accompagnée par une diminution des AGPI, dominé par le DHA. Ce dernier est un acide gras à longue chaîne synthétisé par la succession de deux élongations (Morais et al., 2009b; Tocher et al., 2003). À la lumière de ces observations, j’ai initialement proposé que la diminution des AGPI est due à l’inhibition des élongases par le Cd. Cependant, la concentration de ce métal, comme pour le Ni, était plus élevée à 28°C (tableau 1, article 1), et étonnamment les AGPI ont augmenté à des valeurs comparables à celles des individus maintenus à 9°C. Les métaux ont eu des effets différents sur les désaturases et les élongases, contrairement à ce qui été démontré chez des diatomées (*Asterionella glacialis*) exposées aux Cd où les désaturases ont été inhibées suite à une formation de complexes Cd-thiol dans les enzymes impliquées dans la synthèse des lipides (Jones et al., 1987).

4. 1. 2 Effet de la température et des métaux sur la peroxydation lipidique et le système de défense antioxydante

Le système de défense antioxydante enzymatique et non-enzymatique a été différemment modifié par la température et les contaminants métalliques. L'activité de la SOD, qui constitue la première ligne de défense, n'a pas été touchée par l'augmentation de la température. Bagnyukovaa et al. (2007) ont également rapporté que l'activité de la SOD demeurerait inchangée chez le poisson rouge (*Carassius auratus*) acclimaté à deux températures (3 et 23°C). En revanche, en présence des deux métaux, l'activité a changé chez les perchaudes. Elle a significativement diminué à 9°C et à 28°C chez les individus exposés au Ni. À l'opposé, une augmentation significative a été observée chez les individus exposés au Cd à 28°C contrairement à ceux à 9°C (Fig. 2, Article 1). En outre, la forte corrélation positive entre l'activité de cette enzyme et la concentration du Cd (ρ de Spearman= 0,60, $p < 0,0001$) montre que la réponse de la SOD au Cd dépend de la température (F value (ANOVA à deux facteurs) $< 0,001$) contrairement au Ni. Les études antérieures examinant les effets de la température et des contaminants métalliques présentaient différentes réponses. Dans une étude menée par Grasset et al. (2016) sur le foie de la perchaude exposée aux mêmes conditions, la SOD a significativement diminué contrairement à mes observations dans le muscle. Il est donc clair que la réponse enzymatique à la température ou aux métaux est une réponse spécifique qui dépend des tissus et des métaux en question. Comme pour la SOD, l'activité de la GPx et de la GST ainsi que la concentration de GSH ont été seulement affectées par les métaux mais pas par la température. Cependant, la CAT a significativement diminué à 28°C. Il s'avère donc que le stress thermique ainsi que les deux métaux ont affecté différemment les composantes du système de défense antioxydante. En outre, à travers les corrélations établies entre les différentes enzymes, les concentrations de GSH, de MDA et de métaux (tableau 6, article 1), il est bien clair qu'elles agissent d'une manière coopérative pour minimiser les dégâts des ERO (Fig. 9).

La concentration en MDA, utilisée comme indicateur de peroxydation lipidique (Fig. 6, article 1), ainsi que l'indice de peroxydation (IP) (tableau 2, article 1), un indice qui

reflète la susceptibilité à la peroxydation, n'ont pas été influencés par l'augmentation de la température. En revanche, à 28°C, chez les poissons exposés au Ni, la concentration de la MDA a significativement diminué devant une augmentation de l'IP. Cependant, comme démontré dans la section 4.1.1, la réponse normale au stress thermique a été modifiée en présence du Ni à 28°C. Dans cette situation, les membranes étaient plus riches en AGPI, surtout pour le ARA, EPA et DHA, des acides gras hautement polyinsaturés, ce qui explique la valeur élevée de l'indice de peroxydation. D'autre part, la faible concentration de la MDA peut être en relation avec le système de défense antioxydante, notamment la GPx qui a augmenté chez ces poissons. La peroxydation lipidique est une conséquence de la présence d'oxygène et les produits qui en résultent, y compris le MDA, ont plusieurs fonctions biologiques (Brigelius-Flohe, 1999; Kagan et al., 2004; Kühn and Borchert, 2002), ce qui explique sa présence dans toutes les conditions expérimentales. Cependant, à 28°C, la présence du Ni semble déclencher une réponse massive du système de défense antioxydante ou encore d'antioxydants lipidiques non mesurés dans mon étude, réduisant ainsi la peroxydation des lipides membranaires malgré leur richesse en AGPI.

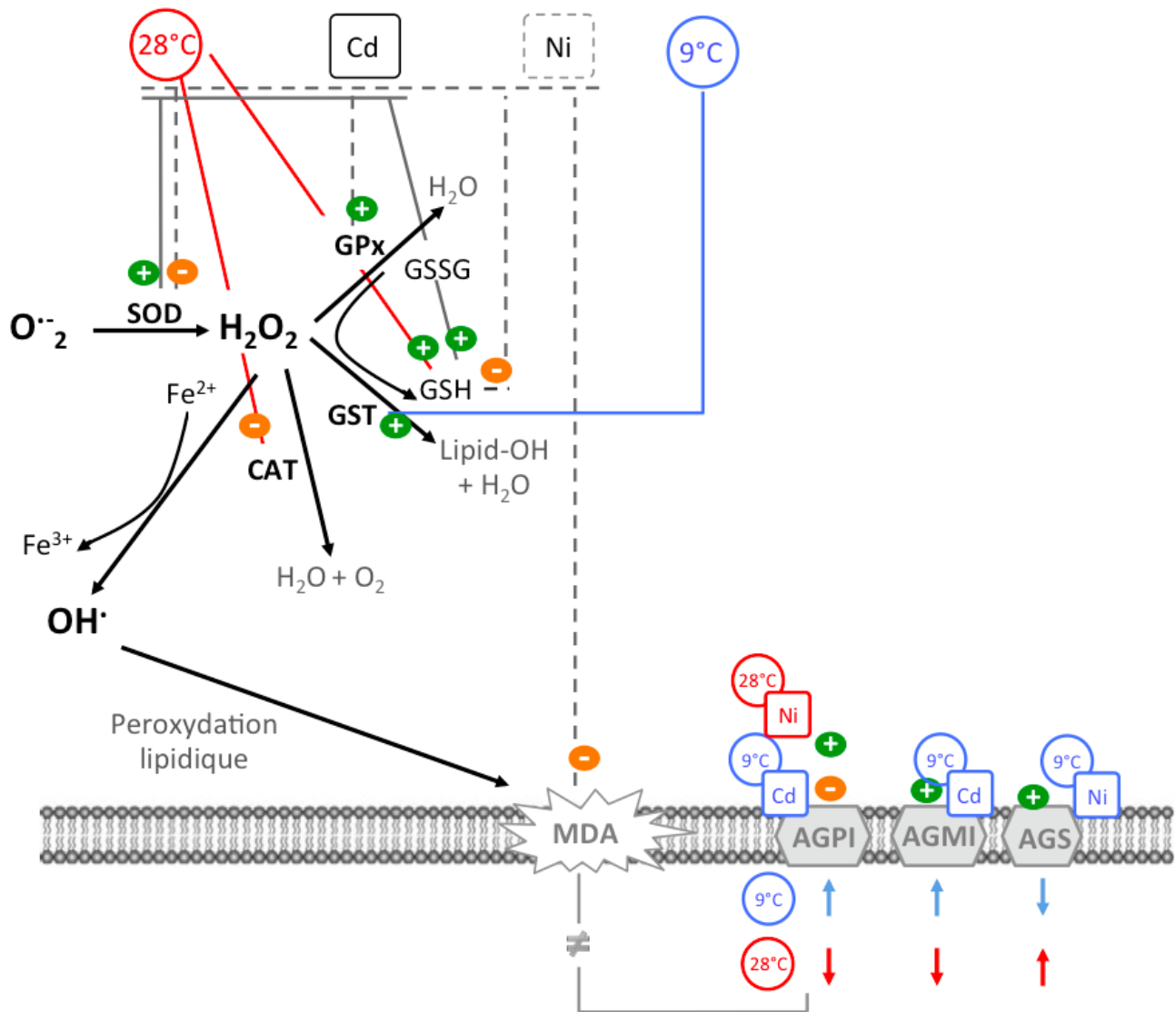


Figure 9 : Schéma récapitulatif des effets de la température et des deux métaux sur la composition membranaires en acides gras, les composantes du système de défense antioxydante et la peroxydation lipidique dans le muscle de la perchaude

4. 2 Effet de la température et des contaminants métalliques sur la composition des phospholipides membranaires et la transcription des désaturases et des élongases chez le mené à grosse tête

Dans cette partie, les menés à grosse tête ont été acclimatés pendant huit semaines à trois températures différentes (15, 25 et 30°C) en présence d'une contamination métallique au Ni ou Cd. Donc pour chaque température, il y avait trois conditions : témoin sans métal, avec Ni ou avec Cd (Fig. 6). À la fin de la période d'exposition, la composition membranaires en AG et les taux de transcription des désaturases (*fads2*, *degs2* et *scd2*) et élongases (*elovl2*, *elovl5* et *elovl6*) ont été analysés dans le muscle et le cerveau.

4. 2. 1 Accumulation des métaux dans les deux tissus et paramètres morphométriques

Pendant toute la période d'exposition, aucune mortalité n'a été observée dans les aquariums contaminés avec le Cd. En revanche, l'ajout du Ni dans les aquariums après la période d'acclimatation a provoqué une mortalité excessive des poissons allant à 100% très tôt avant la fin de la durée d'exposition à 25 et 30°C. De ce fait, la comparaison de l'effet du Ni et du Cd ne sera présentée qu'à 15°C. De plus, l'interaction de la température avec les métaux n'a été examinée que pour le Cd. Une étude menée par Hasnain et al. (2010), qui a déterminé les températures caractéristiques de différents stades de vie de certaines espèces de poissons d'eau douce, a fixé 31,1°C comme une température létale pour les menés à grosse tête. Alors devant la mortalité massive, je suppose que le Ni réduit la capacité de tolérance thermique chez cette espèce et par conséquent la température létale. En outre, dans ma précédente étude, la perchaude a été exposée à des concentrations semblables de métaux, mais aucune mortalité n'a été observée ce qui met en évidence la différence entre les deux espèces et montre que la perchaude est plus résistante que le mené à grosse tête.

Dans le muscle, la concentration du Cd a augmenté avec l'augmentation de la température (Fig. 4, article 2), une observation conforme avec plusieurs études (Cherkasov et al., 2007; Grasset et al., 2016; Mubiana and Blust, 2007; Nichols and

Playle, 2004). En revanche, dans le cerveau, la concentration du Cd a été uniquement élevée à 25°C (Fig. 4, article 2). Il a été démontré que les métaux peuvent franchir la barrière hémato-encéphalique (Rouleau et al., 2003) et que les poissons acclimatés à de basses températures réduisent le flux sanguin vers le cerveau pour maintenir les différentes fonctions cérébrales (van den Burg et al., 2005). Dans ce cas, je suggère que la modification du flux sanguin avait un rôle dans la diminution de l'accumulation du Cd. En outre, l'augmentation de la température s'est accompagnée d'une diminution des deux indices morphométriques, mais l'exposition aux métaux n'a affecté ni l'un ni l'autre (Figs. 2 et 3, article 2). Ces modifications sont ainsi conformes à plusieurs études de notre laboratoire qui se sont intéressées aux effets de la température et des métaux sur différentes espèces de poissons et ont montré que le stress thermique affecte plus ces indices que les contaminants métalliques (Fadhlaoui and Couture, 2016; Grasset et al., 2016; Lapointe et al., 2011). Comme dans ma précédente étude sur la perchaude (Fadhlaoui and Couture, 2016), les indices morphométriques étaient clairement plus élevés à de basses températures et mes données suggèrent que 15°C est la température optimale de croissance du mené à grosse tête.

4. 2. 2 Composition des membranes cellulaires en relation avec la transcription des désaturases et des élongases

Dans le muscle des menés à grosse tête, la composition membranaire était significativement différente entre 15 et 30°C. Chez les poissons acclimatés à la plus faible température, les membranes étaient plus riches en AGPI, spécifiquement en n-3 AGPI, comparé à ceux acclimatés à 30°C où le pourcentage en AGS était plus élevé (Fig. 10). Ces modifications sont ainsi conformes à la théorie d'AHV et en accord avec ma première étude menée sur la perchaude acclimatée à deux températures différentes (Fadhlaoui and Couture, 2016). Toutefois, la reconstruction de la composition membranaire n'était pas en accord avec les modifications du taux de transcription des désaturases et des élongases (Figs. 5 et 6, article 2). Dans ce cas, les modifications observées peuvent être le résultat d'une induction de certaines enzymes en latence comme démontré par des études antérieures chez des poissons à des faibles

températures afin de restaurer la fluidité membranaire (Tiku et al., 1996; Trueman et al., 2000).

À 15°C, chez les poissons exposés au Ni, la voie de biosynthèse des n-6 AGPI dans le muscle a été inhibée (tableau 2 et 3, article 2) mais la transcription de *degs2* ainsi que *elov15* a été induite (Figs. 5 et 6, article 2). Il semble donc que le Ni a inhibé directement l'activité enzymatique des désaturases et des élongases. Quant au Cd, il a nettement modifié la réponse normale à un stress thermique surtout chez les poissons acclimatés à la plus haute température et un effet combiné de l'interaction des deux facteurs de stress a été bien distingué sur les AGS et les AGPI, surtout les n-3 (tableau 6, article 2). En effet, à 30°C, la réponse normale a été inversée et les AGPI ont augmenté pour atteindre des valeurs semblables à celle chez les poissons à 15°C (Fig. 10). Contrairement aux AGPI, les *fads2*, *degs2*, *scd2* et *elov16* ont significativement diminué en présence du Cd à 30°C (Figs. 5 et 6, article 2). Cet ajustement semble donc être effectué par un mécanisme inconnu ou encore par une stimulation du cycle d'acylation-réacylation, responsable de l'incorporation des AG dans les PL membranaire au cours du remodelage des membranes cellulaires (Hazel, 1984) (Fig. 11 A). D'autre part, la présence du Cd a provoqué une diminution des AGS chez les individus exposés à 30°C (Fig. 10) et qui est due principalement à la diminution des 16:0 de 50% par rapport aux individus contrôle (tableau 2, article 2). Des études antérieures ont montré qu'une exposition au Cd altère le métabolisme des lipides en inhibant l'activité de l'acide gras synthase, une enzyme primordiale dans la synthèse *de novo* des acides gras dont le 16 :0 (Liu et al., 2016; Yang et al., 2013).

Dans le cerveau, la composition des membranes cellulaires était différente de celle du muscle. Les AGMI étaient plus abondants (Fig. 10), principalement le 18 :1n-9 (tableau 4, article 2). En outre, la transcription des gènes qui encodent pour les désaturases et les élongases était aussi plus importante dans le cerveau (Figs. 7 et 8, article 2), en accord avec plusieurs études qui ont évalué le niveau de transcription de ces gènes dans différents tissus (Aliyu-Paiko et al., 2013; Tocher et al., 2006a; Xue et al., 2014).

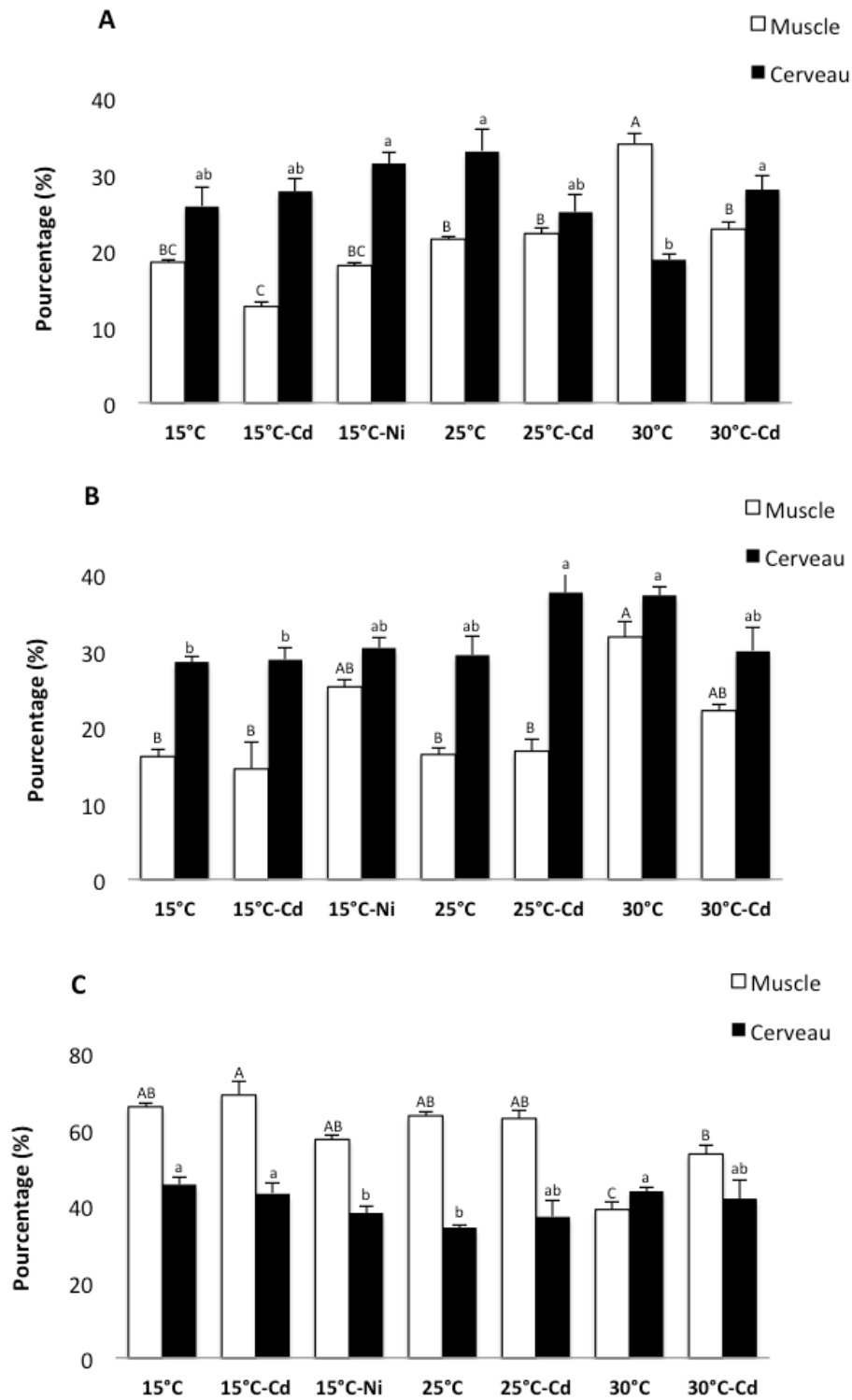


Figure 10 : Pourcentages de chacune des familles d'acides gras (% des acides gras totaux) dans le muscle et le cerveau du mené à grosse tête après la période d'exposition de huit semaines (n=6). A : AGS; B : AGMI; C : AGPI. Les barres portant des lettres différentes sont statistiquement différentes (p<0,05).

L'abondance des AGMI et AGPI dans le cerveau s'explique par l'importance de ces espèces moléculaires pour les différentes fonctions cérébrales. Le 18 :1n-9, un acide gras résultant d'une désaturation de l'acide stéarique (18:0) par la désaturase $\Delta 9$ (*scd2*), joue un rôle important dans le contrôle des propriétés physiques des membranes (Zabelinskii et al., 1995). Le DHA joue plusieurs rôles, particulièrement pour le maintien de l'intégrité et de la fluidité membranaire (Buda et al., 1994; Mohrhauer and Holman, 1963). Contrairement au muscle, la réponse des AG membranaires n'a été observée qu'entre 15 et 25°C, Les AGPI ont varié entre ces deux températures, mais les AGMI n'ont pas été affectés par les trois températures (Fig. 10). Les modifications observées sont en effet en accord avec des études antérieures qui ont montré dans le cerveau, que l'acclimatation au froid s'est accompagnée d'une augmentation des AGPI tandis que les AGMI restent inchangés (Logue et al., 2000). D'anciennes études ont rapporté que certaines fonctions membranaires, dépendantes de la composition membranaire, peuvent être perturbées à des températures élevées (Cossins et al., 1978; Friedlander et al., 1976). Il paraît donc que 30°C représente une température critique pour les menés à grosse tête qui les a poussé à modifier la composition membranaire de leur cerveau pour maintenir les différentes fonctions qui dépendent de la structure des PL en AG. En ce qui concerne la transcription des gènes, les *fads2*, *degs2* et *elov15* ont diminué à 25°C par rapport à 15°C (Figs. 7 et 8, article 2) reflétant ainsi les modifications des AG membranaires et en accord avec plusieurs études qui ont souligné une up régulation de la transcription des gènes qui encodent pour ces enzymes (Mellery et al., 2016; Ren et al., 2013; Xu et al., 2015). En revanche, à 30°C la transcription des désaturases et des élongases a diminué contrairement à ce qui a été observée dans la membrane (Fig. 10). Il s'avère donc que la transcription des gènes tend à suivre la réponse normale à un stress thermique caractérisée par une diminution des AGPI à des températures élevées. Il est donc probable que pour maintenir les fonctions des membranes cérébrales à la température critique de 30°C, il y a eu une régulation post-transcriptionnelle des désaturases et des élongases ou encore un autre mécanisme qui n'implique pas

directement ces enzymes, comme le transport des AG vers le cerveau ou encore l'incorporation des PL synthétisés qui impliquent un autre ensemble d'enzymes.

À 15°C, l'exposition au Cd n'a pas affecté la composition membranaire en AG du cerveau (Fig. 10). Contrairement au muscle, les AGPI, notamment les n-3 AGPI, ont diminué en présence du Ni (tableau 7, article 2). Bien que le 20:5n-3 et le 22:5n-3 n'aient pas été affectés par le Ni, le DHA a nettement diminué par rapport aux individus contrôle (tableau 6, article 2). Ces modifications suggèrent ainsi une inhibition de l'activité de la désaturase $\Delta 4$ responsable de la désaturation de 22:5n-3 en 22:6n-3 (DHA). À 25°C, malgré l'accumulation significative du Cd, la composition membranaire n'a pas été modifiée. En revanche, comme pour le muscle, la diminution du 16:0 (tableau 6, article 2) suggère une inhibition de l'acide gras synthase. À 30°C, bien que la concentration cérébrale de Cd était faible, les AGS ont significativement augmenté pour atteindre des valeurs proches des individus à 15°C (tableau 6, article 2). En outre, l'analyse de variance à deux facteurs (ANOVA-two way) a montré un effet d'interaction de la température et du Cd sur les AGS et n-9 AGPI, mais devant la faible concentration de ce métal mesurée dans le cerveau des poissons acclimatés à 30°C, je suggère que le Cd a affecté le processus de lipogénèse dans un autre organe ou encore le transport vers le cerveau. Autant que dans le muscle, le niveau de transcription des désaturases ainsi que des élongases n'a pas été affecté par le Cd sauf pour la *fads2* dont la diminution n'a pas reflété la composition membranaire (Fig. 11 B)

Enfin, à notre connaissance, cette étude et la précédente sont les premières à examiner les effets des métaux sur les membranes cellulaires. Il s'est avéré que les deux facteurs de stress avaient des effets différents sur les deux tissus. Les modifications observées au niveau de la transcription des désaturases et des élongases n'ont pas été toujours en accord avec celles de la structure des membranes ce qui suggère l'implication d'autres mécanismes dans les réponses observées.

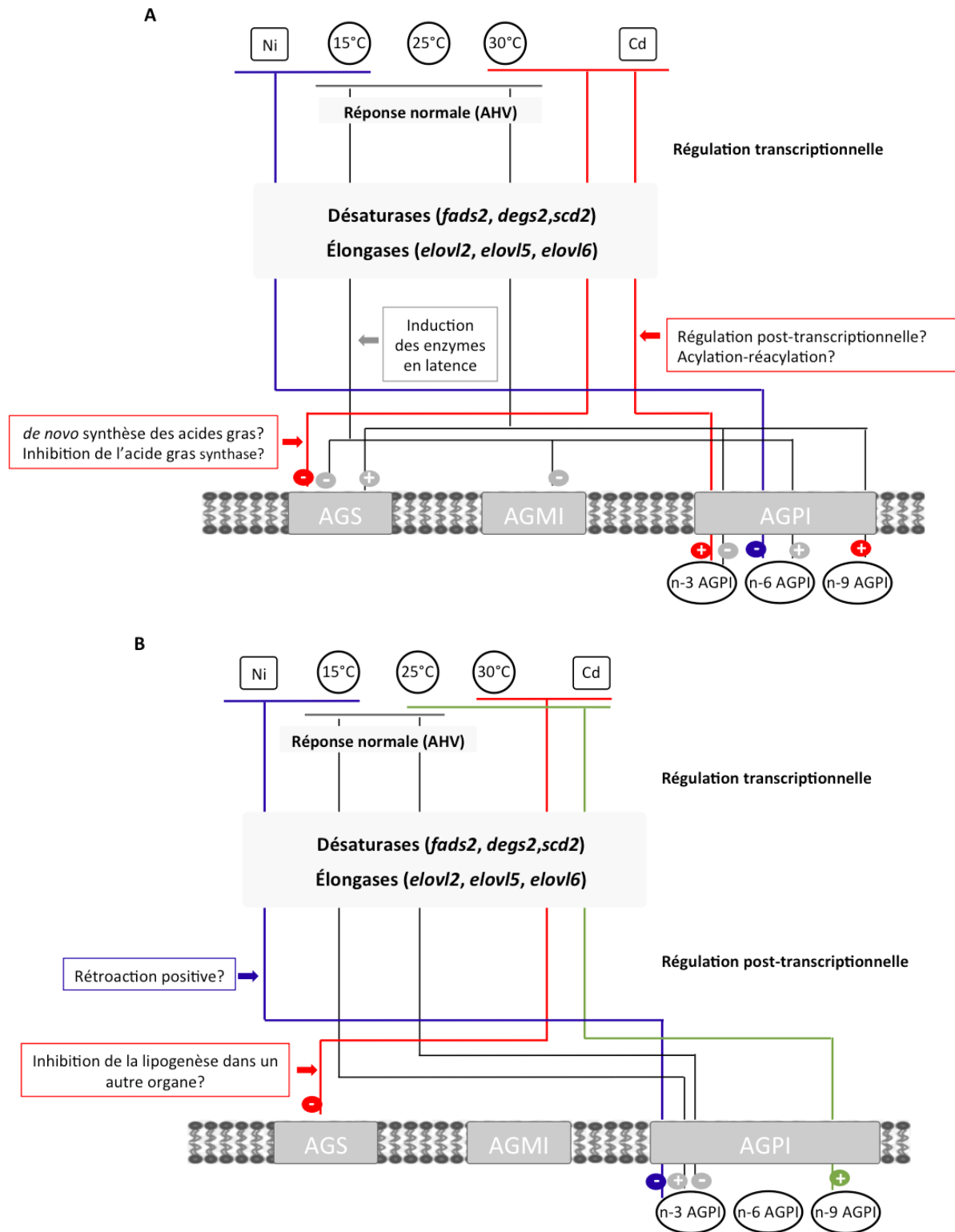


Figure 11 : Schéma récapitulatif des effets de la température et de deux métaux sur la composition membranaire en acides gras et la transcription des désaturases et des élongases dans le muscle (A) et le cerveau (B) du mené à grosse tête.

4. 3 Effets de la température et du cadmium sur l'activité et la transcription des gènes des enzymes antioxydantes en relation avec la peroxydation lipidique chez le mené à grosse tête

Les poissons dans cette partie sont issus de la précédente exposition (Section 4.2). Les mêmes échantillons (muscle et cerveau) ont été utilisés pour effectuer les analyses des activités des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx et GST), le taux de transcription des gènes qui encodent pour ces enzymes (*sod-1*, *cat*, *gpx* et *gst*) ainsi que la concentration de MDA. Cependant, vu la petite taille des cerveaux, la transcription des gènes a été effectuée sur un lot de poissons différent de ceux utilisés pour les enzymes et le MDA. Les conditions d'exposition consistent en trois différentes températures en présence ou absence de Cd, soit : 15°C, 15°C-Cd, 25°C, 25°C-Cd, 30°C et 30°C-Cd.

4. 3. 1 Réponse antioxydante et transcription des gènes codant pour les enzymes correspondantes

La température et le Cd ont différemment affecté les enzymes du système de défense antioxydante dans les deux tissus. Dans le muscle, l'augmentation de la température n'a pas eu d'effet sur la SOD, contrairement à la CAT et à la GPx qui ont augmenté à 30°C alors que la GST a diminué à 30°C. En revanche, l'exposition au Cd n'a eu un effet que sur les activités de la SOD et la GPx (Fig. 2, article 3). Des études antérieures portant sur l'effet de la température (Fadhlaoui and Couture, 2016; Grim et al., 2010; Madeira et al., 2013) et du Cd (Asagba et al., 2008b; Brucka-Jastrzebska, 2010; Cao et al., 2012; Cherkasov et al., 2006; Soares et al., 2008) chez des poikilothermes ont montré que ces deux facteurs de stress peuvent induire un stress oxydant. Dans mon étude sur le mené à grosse tête, l'analyse de variance à deux facteurs (ANOVA two-way) (tableau 2, article 2) a révélé un effet combiné des deux facteurs de stress sur la SOD et la GPx qui ont respectivement diminué à 25 et 30°C chez les individus exposés au Cd. L'inhibition de l'activité de ces enzymes peut être due à une altération de leur structure suite à l'augmentation de la concentration du Cd à des températures élevées. Dans leur étude, Wang et al. (2015) ont suggéré que le Cd peut altérer le repliement des enzymes

inhibant ainsi leur activité. La transcription des gènes qui encodent pour ces enzymes a été aussi affectée par la température et le Cd mais n'a pas été toujours conforme aux activités observées (Fig. 4, article 3). Plusieurs études ont aussi démontré que la température peut induire ou inhiber la transcription des gènes des enzymes de défense antioxydante (Habte-Tsion et al., 2016; Malek et al., 2004a; Zhou et al., 2010). De ce fait, cette différence entre le niveau moléculaire et enzymatique peut être en relation avec une régulation post-transcriptionnelle, avec une dégradation des ARNm, ayant des demi-vies très courtes (Fan et al., 2002), ou encore à une altération de la structure des enzymes. Ces résultats sont ainsi conformes à ceux de plusieurs récentes études qui ont démontré une induction de la transcription de gènes qui encodent pour des enzymes de défense antioxydante suite à un stress métallique. En effet, ces gènes sont contrôlés par le facteur de transcription Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2) (Giuliani et al., 2013; Lau et al., 2013; Moi et al., 1994). Ce dernier est activé suite à l'altération du complexe formé avec Keap1/Cul3 (Kelch-like ECH-associated protein 1 Cullin 3) (Ma, 2013). Une fois libéré, il se lie à la région promotrice des gènes contenant les éléments de réponse antioxydante (ARE) (Itoh et al., 1999). L'augmentation de la transcription des gènes peut être due à une induction de Nrf2 en présence du Cd (Zheng et al., 2016a; Zheng et al., 2016b).

Dans le cerveau, les activités des enzymes de défense antioxydante étaient plus élevées, dans la majorité des conditions, par rapport au muscle. Étant affectées uniquement par la température (Fig. 2, article 3), cette différence entre les deux tissus souligne la spécificité de la réponse antioxydante et suggère que le cerveau, vu sa richesse en AGPI, semble être mieux protégé afin de minimiser les risques de peroxydation. Comme dans le muscle, la transcription des gènes a été affectée par l'augmentation de la température et par le Cd. En revanche, les modifications au niveau moléculaire n'étaient pas en accord avec les modifications au niveau enzymatique. En effet, à 25°C, sous l'effet de la concentration élevée de Cd, la diminution de *sod-1* et *gpx* n'a pas affecté l'activité des enzymes correspondantes (Fig. 2 et 4, article 3). Dans ce cas, je suggère que les produits des réactions catalysées par ces deux enzymes puissent

être impliqués au niveau de la transcription, par une rétroaction négative, pour diminuer la surproduction de ces enzymes (Fig. 13). Les résultats issus de mon étude ont montré que les modifications transcriptionnelles des gènes qui encodent pour les enzymes de défense antioxydante ne correspondent pas nécessairement à des changements des activités des enzymes correspondantes. Plusieurs études antérieures sont en accord avec ces observations et certaines ont suggéré que les observations sur la transcription des gènes et les activités catalytiques devraient être soigneusement interprétées lors de l'évaluation de certains facteurs de stress (Giuliani et al., 2013; Regoli et al., 2011; Zheng et al., 2016a).

4. 3. 2 Effets de la température et du Cd sur la susceptibilité à la peroxydation lipidique en relation avec la capacité antioxydante

La peroxydation lipidique, évaluée en termes de concentrations de MDA, était seulement affectée par la température dans le muscle et les individus acclimatés à la plus haute température avaient les teneurs les plus faibles (Fig. 3, article 3). En outre, comme discuté dans la section 4.2, l'analyse de la composition membranaire en AG dans le muscle des menés à grosse tête issues de la même expérience a révélé une différence de profil en acides gras, les individus acclimatés à 15 et 25°C ayant des membranes plus riches en AGPI, surtout en DHA (20:6n3), EPA (20:5n3) et ARA (20:4n6), (tableaux 3 et 7, article 2). Avec l'appui des différentes corrélations établies entre la concentration en MDA et les AG membranaires, je suggère que la richesse des membranes cellulaires en AGPI les a rendues plus vulnérables à la peroxydation. En revanche, à 30°C, mon étude a démontré que la réponse normale à la hausse de la température a été modifiée chez les individus exposés au Cd et que les AGPI ont augmenté dans les membranes, mais étonnamment, la concentration de MDA est restée faible. Ces résultats suggèrent ainsi qu'à haute température, d'autres composantes intrinsèques sont impliquées dans la protection des membranes contre la peroxydation, comme la vitamine E (Niki et al., 1989). La PCA (Fig. 5. article 3) regroupant les activités des enzymes antioxydantes, le niveau de transcription des gènes correspondants, la concentration de MDA et du Cd, a montré que le MDA, *gpx* et *sod-1* ont été inclus dans le même groupe. Il est donc

possible que le MDA puisse être impliqué dans la transcription de certains gènes qui encodent pour les enzymes de défense antioxydante, comme suggéré dans l'étude de (Lushchak and Bagnyukova, 2006a) (Fig. 12).

Dans le cerveau, malgré sa richesse en AGPI et en AGMI (tableaux 6 et 7. article. 2) la concentration de MDA était remarquablement plus faible par rapport au muscle (Fig. 3, article 3). Il semble que les enzymes du système de défense antioxydante agissaient d'une façon coopérative, soulignée par les différentes corrélations entre CAT et SOD, CAT et GPx ainsi que GST et GPx, afin de minimiser les risques de peroxydation particulièrement des AGPI hautement polyinsaturés, qui sont indispensables pour les fonctions cérébrales.

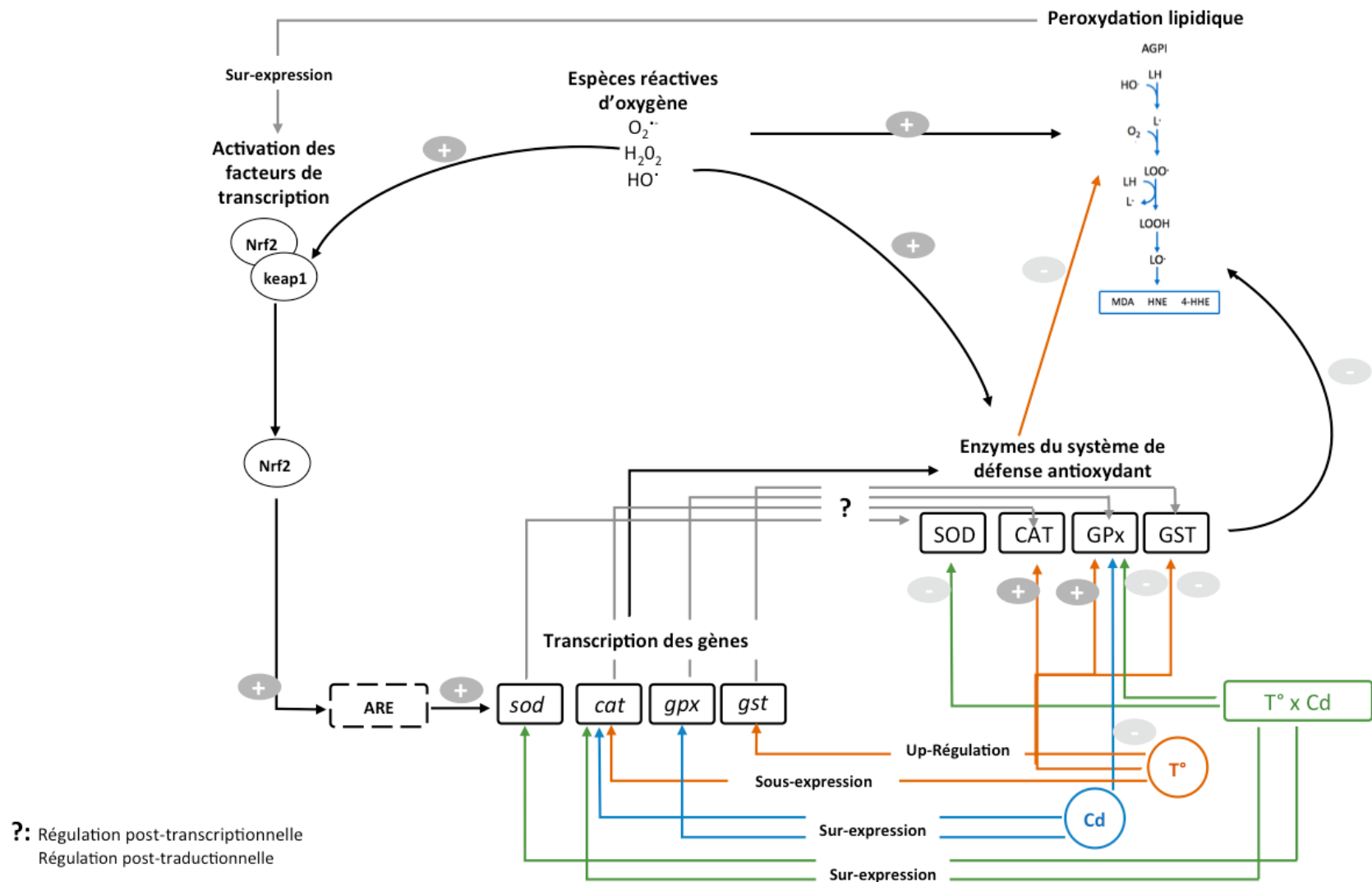


Figure 12 : Schéma récapitulatif des effets de la température et du Cd sur les enzymes de défense antioxydante, le niveau de transcription des gènes correspondants et la concentration de MDA dans le muscle du mené à grosse tête.

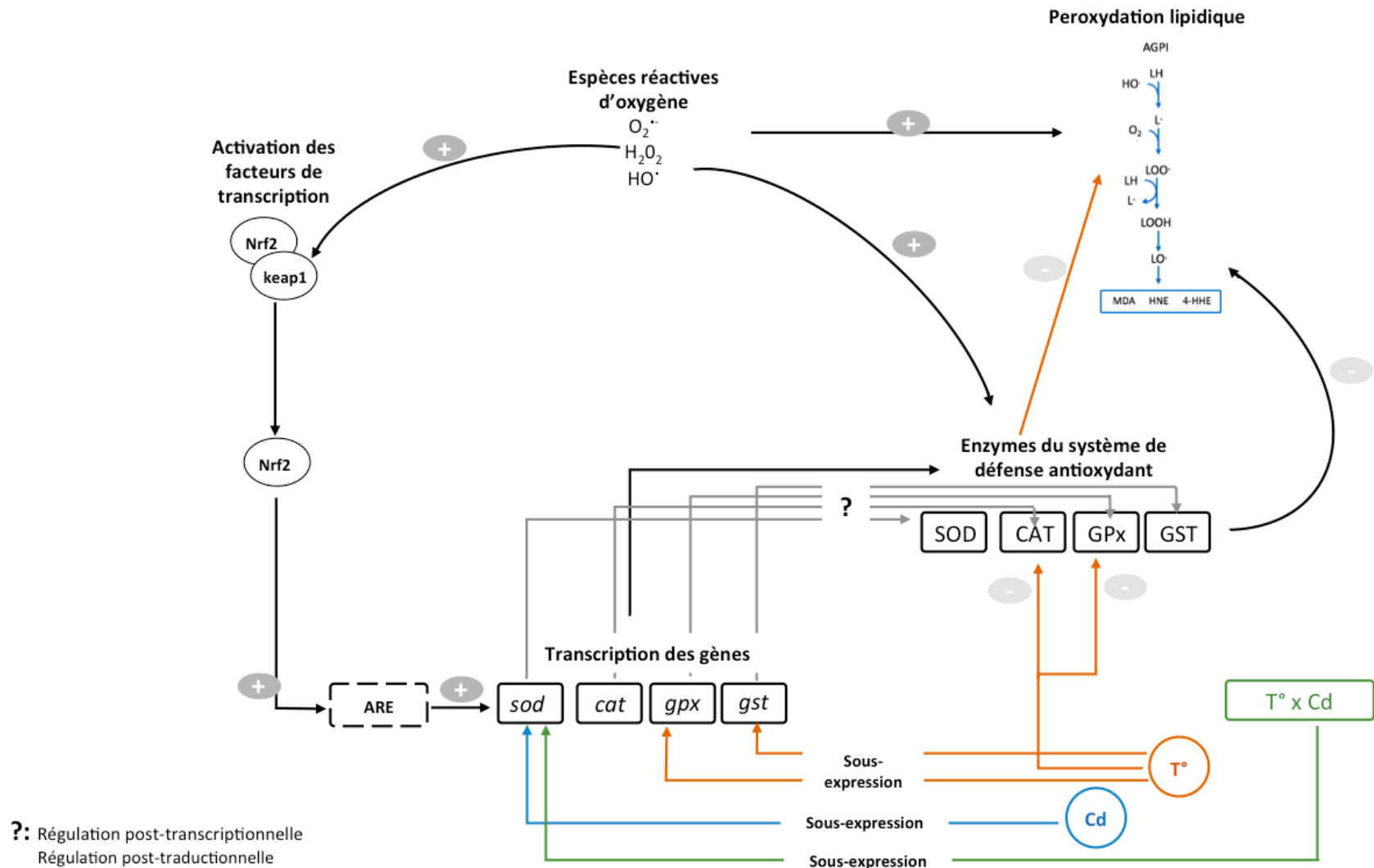


Figure 13 : Schéma récapitulatif des effets de la température et du Cd sur les enzymes de défense antioxydante, le niveau de transcription des gènes correspondants et la concentration de MDA dans le cerveau du mené à grosse tête

4.4 La température d'acclimatation et l'exposition au Cd altèrent-elles la capacité oxydative et antioxydante en relation avec la composition membranaire ?

Pour évaluer les effets de la température et de l'exposition au Cd sur la capacité oxydative chez les poissons eurythermes et déterminer s'il y a un lien avec la modification de la composition membranaire en AG, la capacité antioxydante ainsi que la peroxydation lipidique, j'ai exploité les données présentées dans les sections précédentes pour établir un lien entre les différentes composantes et comparer les réponses des deux espèces dans le muscle.

Chez les deux espèces, la réorganisation des membranes cellulaires en réponse à l'augmentation de la température était comparable et conforme à la théorie d'AHV. L'exposition au Cd a modifié la réponse normale à la température chez les deux espèces. En effet, chez la perchaude, les AGPI ont diminué significativement à 9°C. Chez les menés à grosse tête acclimatés au froid, le Cd n'a pas affecté les AGPI. En revanche, à 30°C, chez les individus exposés au Cd, ce groupe d'AG a significativement augmenté par rapport aux individus maintenus à 30°C (Sections 4.1 et 4.2).

Les activités de la CCO et de la CS ont significativement augmenté au froid chez les deux espèces, à l'exception de la CCO chez la perchaude (Fig. 14). Chez des espèces vivant à de basses températures, les muscles sont plus riches en mitochondries par rapport aux espèces vivant à des températures plus élevées. Les activités de la CCO et de la CS sont entre 1,5 et 5 fois plus élevées chez des espèces de l'antarctique que chez des espèces des zones tempérées (Crockett and Sidell, 1990). D'autre part, selon la théorie de "pacemaker", plus la membrane contient des lipides polyinsaturés, plus les protéines membranaires catalysent les réactions étant donné l'augmentation de l'énergie transférée aux protéines membranaires par les collisions des chaînes lipidiques ainsi que le mouvement libre des phospholipides (Hulbert and Else, 1999), comme la CL associée au complexe IV de la chaîne respiratoire (Hoch, 1992). Ceci peut expliquer la remarquable différence d'activité de la CCO entre les deux températures surtout chez le mené à grosse tête.

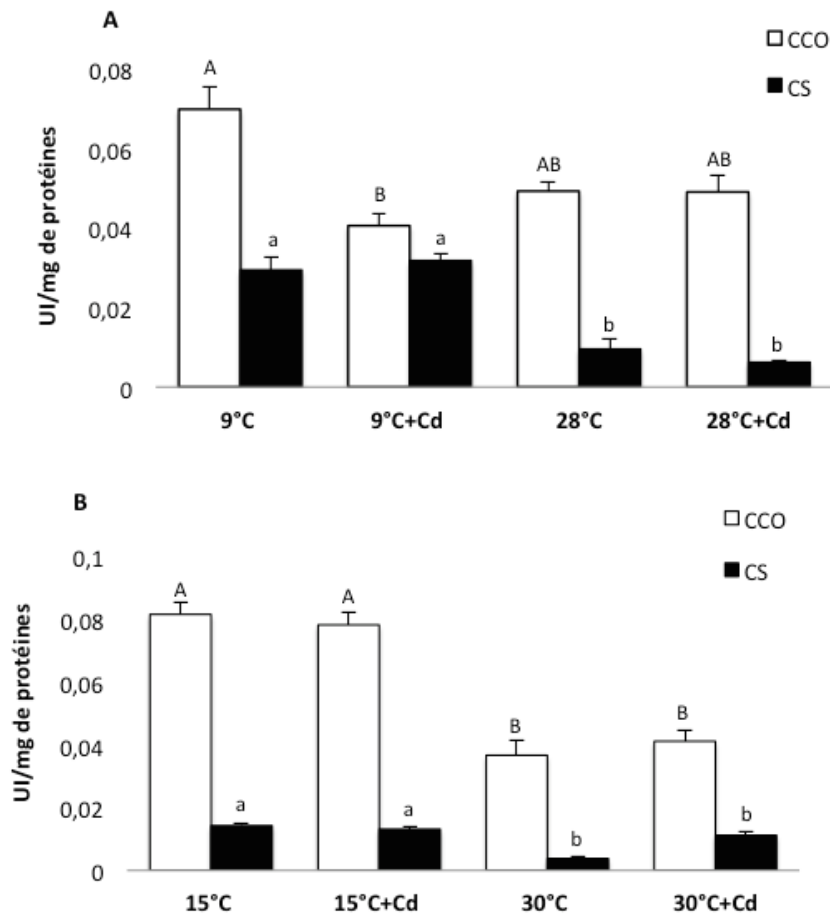


Figure 14 : Activité oxydative (CCO et CS) dans le muscle de la perchaude (A) et du mené à grosse tête (B) acclimatés à deux températures et exposés au Cd.

Les barres portant des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

Chez la perchaude, l'augmentation de la température n'a pas affecté l'activité de la CCO contrairement au mené à grosse tête où l'activité a diminué d'environ la moitié à 30°C. En revanche, chez les deux espèces, une diminution significative de l'activité de la CS a été observée aux températures élevées (Fig. 14).

Tableau 6 : Effets combinés de la température et du Cd sur les enzymes indicatrices de la capacité oxydative (CCO et CS) chez la perchaude et le mené à grosse tête selon l'analyse de variance à deux facteurs
 Les valeurs repésentent les F-value.
 Les valeurs en gras sont significativement affectées par l'un des facteurs testé ou l'interaction des deux.

	Température	Cd	Température x Cd
Perchaude			
CCO	0,9902	0,0411	0,0006
CS	<0,0001	0,8102	0,162
Mené à grosse tête			
CCO	<0,0001	0,9171	0,4631
CS	<0,0001	0,0024	0,0001

Comme mentionné dans les sections 4.1 et 4.2, la réponse normale de la composition membranaire à la variation de la température a été modifiée en présence du Cd pour les deux espèces. Chez la perchaude, la composition membranaire a été modifiée en présence du Cd à 9°C, température à laquelle les AGPI ont nettement diminué (section 4.1.1) et qui s'est accompagnée d'une chute de l'activité de la CCO. Pour explorer les relations entre la capacité oxydative et la composition en AG sous l'effet de la température et du Cd, les deux enzymes indicatrices de la capacité oxydative (CCO et CS), les principaux groupes d'AG ainsi que les AG majoritaires représentant les deux chaînes acyl de la CL, ont été introduits dans deux ACP (Figs. 15 et 16).

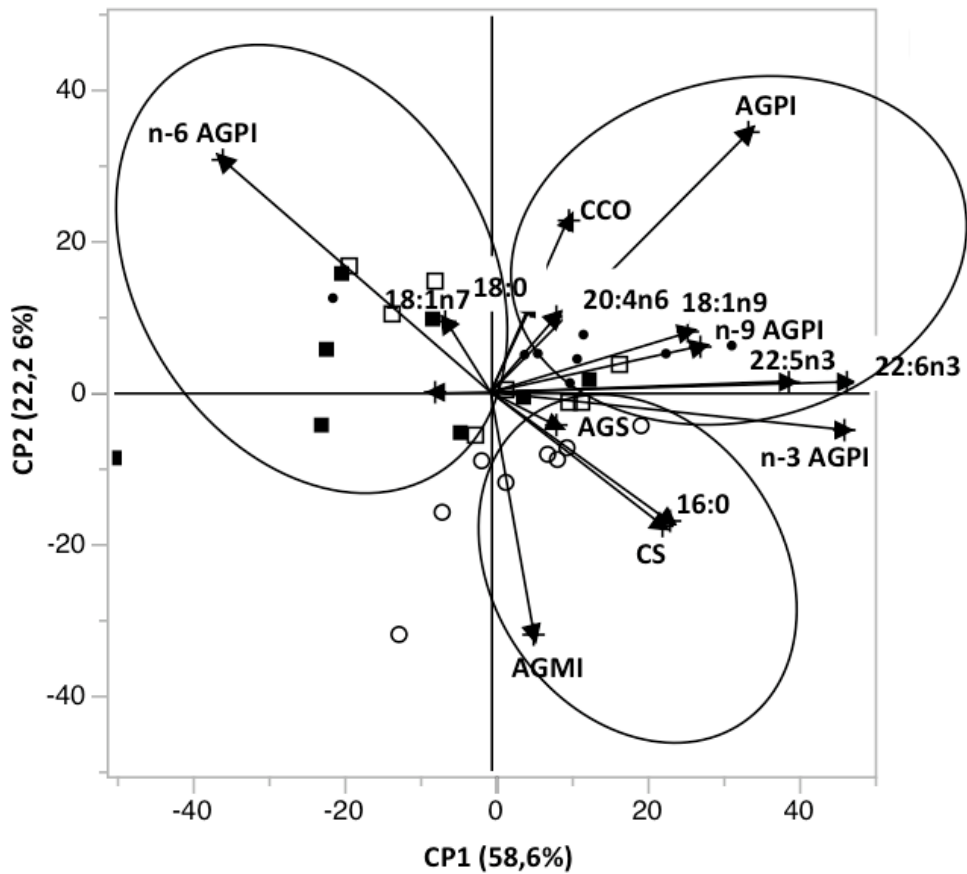


Figure 15 : Analyse en composantes principales intégrant les différentes variables en relation avec la composition membranaire en AG dans le muscle de la perchaude ainsi que les deux enzymes représentant la capacité oxydative (CCO et CS). Les données représentées ont été obtenues à la fin de la période d'exposition et d'acclimatation à deux températures.

● 9°C; ○ 9°C-Cd; ■ 28°C et □ 28°C-Cd.

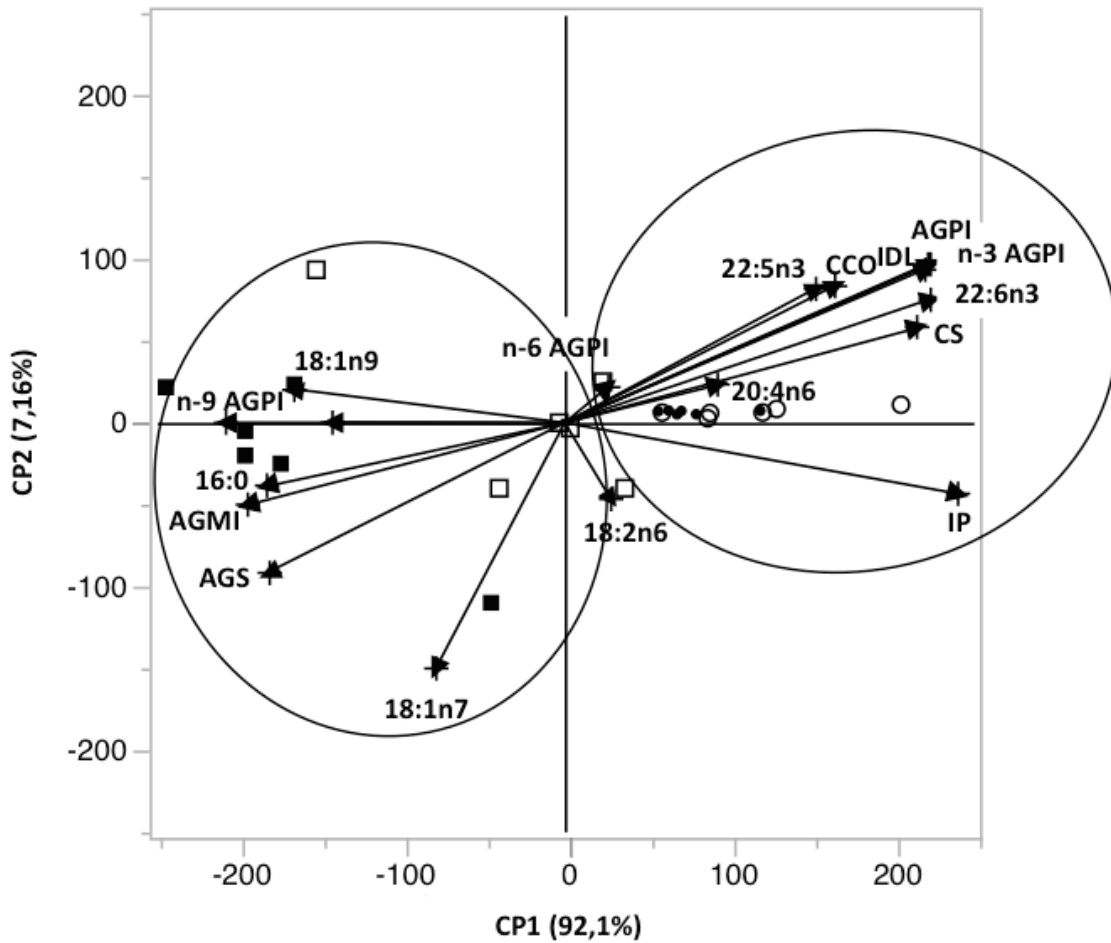


Figure 16 : Analyse en composante principale intégrant les différentes variables en relation avec la composition membranaire en AG dans le muscle du mené à grosse tête ainsi que les deux enzymes représentant la capacité oxydative (CCO et CS). Les données représentées sont obtenues à la fin de la période d'exposition et d'acclimatation à deux températures.

● 15°C; ○ 15°C-Cd; ■ 30°C et □ 30°C-Cd.

L'ACP (Fig. 15) montre trois groupes incluant les variables à 9°C, 9°C en présence du Cd et à 28°C chez la perchaude. Ainsi, la CCO est élevée dans le groupe incluant les AG hautement polyinsaturés à 9°C, tandis que la CS est élevée dans celui incluant les AGS et les AGMI à 9°C en présence du Cd. Dans ce cas je suggère que la diminution de l'activité de la CCO observée en présence du Cd s'est produite sous l'effet d'un autre mécanisme qui n'est pas en relation directe avec la composition membranaire. Un autre aspect de la membrane autre que la composition elle-même peut être impliqué dans la modification de l'activité de cet enzyme plus que la composition elle-même. Dans ce contexte, il a été démontré que les groupements polaires des PL peuvent affecter l'activité des protéines membranaires en changeant la concentration des molécules ou des ions à la surface de la membrane, modifiant ainsi l'affinité des enzymes membranaires pour leurs substrats (Lee, 2004). Dans ce cas, je suppose que le Cd a modifié la composition des têtes polaires et par conséquent l'interaction enzyme-phospholipide, d'où l'activité de l'enzyme qui a diminué.

L'augmentation de la capacité oxydative ainsi que des AGPI mettent les perchaudes acclimatées au froid face à une amplification du risque de la LPO. Malgré l'augmentation, à 9°C, des enzymes antioxydantes (SOD et CAT), qui constituent la première ligne de défense, il semble que la capacité oxydative ait dépassé l'activité antioxydante accentuant ainsi le risque de la peroxydation. En revanche, à 28°C, et malgré l'augmentation des AGPI en présence du Cd, la LPO était plus faible comparativement à 9°C. Par ailleurs, l'activité de la CCO et de la CS étaient beaucoup plus faibles, ce qui confirme encore la contribution de la capacité oxydative à la LPO. Chez le mené à grosse tête, l'activité de la CCO se trouvait dans l'ensemble regroupant la CS et les AGPI hautement polyinsaturés au froid (Fig. 16). Ainsi, comme démontré par des études antérieures (Grim et al., 2010; Kraffe et al., 2007; Wodtke, 1981), la modification de la composition membranaire a contribué à augmenter la capacité oxydative chez les individus acclimatés au froid. Étonnamment, à 30°C, malgré l'augmentation significative en AGPI chez les individus exposés au Cd par rapport aux individus contrôles de la même température, la capacité oxydative, soit la CCO ou CS, était faible (Fig. 12). Dans ce contexte, il est bien connu que la CL, un PL de la membrane mitochondriale, est impliqué dans le fonctionnement des enzymes mitochondriales, y compris la CCO (Paradies et al., 2002). Il a été ainsi démontré que l'altération des chaînes d'AG constituant ce PL module l'activité de ces enzymes membranaires

(Schlame et al., 2005). L'acclimatation des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à deux températures (5°C et 15°C) a modifié la composition des chaînes d'AG constituant le CL et par conséquent les enzymes adjacentes (Kraffe et al., 2007). Dans mon étude, la réduction de l'activité de la CCO s'est accompagnée par une diminution spectaculaire de 18:1n7 et 16:0. Ceci supporte l'hypothèse que le CL requiert une composition spécifique en AG et toute modification peut moduler l'activité des enzymes membranaires et conséquemment la capacité oxydative.

En conclusion, face à une augmentation de la température et une exposition au Cd, la capacité oxydative a été modifiée chez les deux espèces. Chez la perchaude, seule la CS a été affectée par la température tandis que la CCO a diminué chez les individus exposés au Cd. En revanche, chez le mené à grosse tête, la CCO comme la CS ont diminué suite à l'augmentation de la température. D'autre part, les changements des AG constituant les membranes cellulaires à de basses températures pourraient expliquer l'augmentation de l'activité de la CCO. Cependant, la modification de la capacité oxydative en relation avec la composition membranaire en acide gras reste toujours à discuter étant donné que chez la perchaude, il n'y avait pas de lien direct entre les AG membranaires et la CCO, ce qui suggère qu'il y a eu un autre mécanisme qui intervient (Lee, 2003). En revanche, chez le mené à grosse tête, les modifications des AG membranaires en relation avec la modification de la capacité oxydative étaient plus claires, en accord avec la littérature (Grim et al., 2010; Guderley et al., 2008; Kraffe et al., 2007).

5. Conclusion

Ce projet de doctorat a mis en évidence les effets de la température et de contaminants métalliques sur les lipides membranaires. Depuis des décennies, de nombreuses études ont examiné les effets de la température sur la composition membranaire chez différentes espèces ainsi que les mécanismes impliqués. À notre connaissance, cette étude est la première à s'intéresser à l'effet du Cd et du Ni sur les acides gras des phospholipides et à démontrer qu'ils en modifient profondément la composition.

5.1 Retour sur les objectifs

Au début de cette thèse, il était bien connu qu'à de faibles températures le degré d'insaturation augmente pour garder une fluidité membranaire optimale. Cet ajustement par

conséquent rend les membranes cellulaires plus vulnérables à la peroxydation. En outre, la présence de métaux peut d'une façon indirecte augmenter le risque de la peroxydation. En revanche, on ne savait pas encore à ce moment-là si une contamination métallique pouvait influencer la réponse des poïkilothermes à un stress thermique ou non. Il s'est avéré à l'issue de la première expérience sur les perchaudes qu'en présence des deux métaux, Cd et Ni, la réponse normale à un stress thermique a été inversée. Devant cette modification, deux explications se présentaient, soit les deux métaux avaient modifié les activités des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras membranaires, soit la réponse observée reflétait un ajustement de la composition membranaire afin de garder une fluidité optimale pour le fonctionnement de la cellule. Le calcul des indices représentant les activités des désaturases et des élongases exclut la deuxième hypothèse et j'ai donc émis l'hypothèse que les deux métaux avaient des effets directs sur ces enzymes. De plus, bien que la composition membranaire ait été différente d'une condition à l'autre, la LPO exprimée en termes de concentration de MDA était toujours élevée à l'exception de celle à une température élevée en présence du Ni qui semble déclencher une réponse massive du système de défense antioxydante. Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces modifications, l'expérience a été reprise sur le mené à grosse tête dans le but de déterminer la réponse des désaturases et des élongases, les enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras membranaires, mais aussi d'établir deux types de comparaison, une interspécifique et l'autre, entre deux tissus différents. Contrairement à la perchaude, à des températures élevées et en présence du Ni, la mortalité massive observée suggère que ce métal a altéré la résistance à un stress thermique chez le mené à grosse tête. Comme pour la perchaude, le Cd a modifié la réponse normale à une variation de température dans le muscle. En revanche dans le cerveau, mes résultats suggèrent que la température la plus élevée représentait une température critique pour les différentes fonctions cérébrales qui dépendent de la composition membranaire, ce qui a nécessité un ajustement de la composition membranaire en acides gras à l'inverse de la réponse normale. Ces modifications observées dans les deux tissus n'étaient pas conformes, la plupart du temps, au niveau de transcription des gènes qui encodent pour des désaturases et des élongases. Cette incompatibilité entre les modifications membranaires et moléculaires est probablement due à plusieurs autres mécanismes mis en jeu dont la

régulation post transcriptionnelle ou encore la synthèse *de novo* des phospholipides incorporés dans les membranes cellulaires.

Bien qu'il soit un tissu riche en acides gras polyinsaturés, le cerveau semble être mieux protégé contre la peroxydation. En revanche, dans le muscle nous avons observé que le MDA était corrélé au taux d'insaturation et que les individus ayant des membranes plus riches en AGPI sont plus vulnérables à la peroxydation. Tout comme pour les élongases et les désaturases, la transcription des gènes encodant pour les enzymes de défense antioxydante n'étaient pas conformes aux activités observées.

Dans le cadre de la comparaison interspécifique, j'ai également comparé la capacité oxydative chez les deux espèces. La CCO, une enzyme membranaire, était fortement influencée par la composition membranaire chez les individus acclimatés à une faible température. En revanche, combinée à la température, la présence du Cd a différemment affecté la capacité oxydative chez les deux espèces, où la CCO a été inhibée chez la perchaude mais pas chez le mené. Cette inhibition n'était pas corrélée aux modifications de la composition membranaire.

5. 2 Perspectives de recherche

Bien que ce projet ait fournit des résultats originaux par rapport aux effets de la température et de contaminants métalliques sur la composition membranaire en acides gras, plusieurs mécanismes restent encore à étudier pour mieux comprendre les modifications observées. En effet, dans ses études, Hazel (1984, 1990 et 1995) a bien expliqué les différents aspects qui peuvent varier en réponse à un stress thermique comme *i)* le métabolisme des acides gras, *ii)* la synthèse *de novo* des phospholipides qui inclut le transport et l'incorporation des acides gras ainsi que le métabolisme des têtes polaires des phospholipides et enfin *iii)* la déacylation et la réacylation des phospholipides. Tous ces mécanismes impliquent différentes enzymes sensibles à la variation de la température (acyltransférases, phosphotransférases, phospholipases, lysophospholipides acyltransférases) qui pourraient être influencées par la présence de métaux traces. Afin de mieux comprendre les modifications observées, un suivi de ces enzymes donnera des explications plus précises sur le mécanisme le plus affecté par plusieurs facteurs de stress.

Lorsque nous avons étudié l'impact de la température et des métaux sur la transcription des gènes qui encodent pour les désaturases et les élongases, nous avons remarqué que les modifications constitutionnelles au niveau des membranes ne correspondaient pas la plupart du temps aux taux de transcription de ces enzymes. Étant des enzymes cruciales dans le métabolisme des acides gras membranaires, des études ultérieures examinant la réponse des activités enzymatiques dans les mêmes conditions seront un moyen pertinent pour comprendre les différents changements observés.

Finalement, dans ce projet j'ai tenté de m'approcher de conditions environnementales réalistes, mais ces dernières restent encore plus complexes. Il sera donc important d'étudier davantage d'autres facteurs de stress en même temps ou plusieurs métaux en combinaison. Cela nous permettra de mieux prédire les changements pouvant intervenir au niveau de certains milieux surtout avec le réchauffement climatique et la pression incessante de la pollution, ce qui pourrait permettre de réviser les normes de rejets dans les milieux naturels, si les normes actuelles s'avèrent nuisibles aux organismes aquatiques.

Références bibliographiques

- Abele, D., Burlando, B., Viarengo, A., Portner, H.O., 1998. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comp Biochem Phys B* 120, 425-435.
- Abeleoeschger, D., Oeschger, R., 1995. Hypoxia-Induced Autoxidation of Hemoglobin in the Benthic Invertebrates *Arenicola-Marina* (Polychaeta) and *Astarte Borealis* (Bivalvia) and the Possible Effects of Sulfide. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 187, 63-80.
- Agaba, M., Tocher, D.R., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A.J., 2004. Zebrafish cDNA encoding multifunctional Fatty Acid elongase involved in production of eicosapentaenoic (20:5n-3) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids. *Mar Biotechnol (NY)* 6, 251-261.
- Agaba, M.K., Tocher, D.R., Zheng, X., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A.J., 2005. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 142, 342-352.
- Al-Nasser, I.A., 2000. Cadmium hepatotoxicity and alterations of the mitochondrial function. *J Toxicol Clin Toxicol* 38, 407-413.
- Aliyu-Paiko, M., Jaya-Ram, A., Chong, A.S.C., Hashim, R., Amuzat Aliyu, O., 2013. Estimation of Tissue Distribution of mRNA Transcripts for Desaturase and Elongase Enzymes in *Channa striata* (Bloch, 1793) Fingerlings using PCR Technique. *Taiwania* 58, 12–118.
- Almaida-Pagan, P.F., de Costa, J., Mendiola, P., Tocher, D.R., 2012. Age-related changes in mitochondrial membrane composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart and brain. *Comp Biochem Phys B* 163, 129-137.
- Ankley, G.T., Villeneuve, D.L., 2006. The fathead minnow in aquatic toxicology: Past, present and future. *Aquatic Toxicology* 78, 91-102.
- Asagba, S.O., Eriyamremu, G.E., Igberaese, M.E., 2008a. Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiol Biochem* 34, 61-69.
- Asagba, S.O., Eriyamremu, G.E., Igberaese, M.E., 2008b. Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiol Biochem* 34, 61-69.
- Bagnyukova, T.V., Danyliv, S.I., Zin'ko, O.S., Lushchak, V.I., 2007. Heat shock induces oxidative stress in rotan *Perccottus glenii* tissues. *Journal of Thermal Biology*, 32:, 255-260.
- Bagnyukovaa, T.V., Lushchaka, O.V., Storeyb, K.B., Lushchaka, V.I., 2007. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23 °C. *J Therm Biol* 32, 227–234.

- Belyaeva, E.A., Glazunov, V.V., Nikitina, E.R., Korotkov, S.M., 2001. Bivalent metal ions modulate Cd²⁺ effects on isolated rat liver mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 33, 303-318.
- Bernatchez, L., Giroux, M., 1991. Guide des poissons d'eau douce du Québec et leur distribution dans l'est du Canada. Broquet, Incorporated.
- Berntssen, M.H.G., Aatland, A., Handy, R.D., 2003. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquatic Toxicology* 65, 55-72.
- Borchman, D., Lamba, O.P., Salmassi, S., Lou, M., Yappert, M.C., 1992. The dual effect of oxidation on lipid bilayer structure. *Lipids* 27, 261-265.
- Bressin, S., Willmer, P.G., 2000. Estimation of thermal constants: the importance of using equilibrium temperature rather than ambient temperature demonstrated with hoverflies (Diptera, Syrphidae, genus *Eristalis*). *J Exp Biol* 203, 2511-2517.
- Brigelius-Flohe, R., 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free radical biology & medicine* 27, 951-965.
- Brucka-Jastrzebska, E., 2010. The Effect of Aquatic Cadmium and Lead Pollution on Lipid Peroxidation and Superoxide Dismutase Activity in Freshwater Fish. *Pol J Environ Stud* 19, 1139-1150.
- Buda, C., Dey, I., Balogh, N., Horvath, L.I., Maderspach, K., Juhasz, M., Yeo, Y.K., Farkas, T., 1994. Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8234-8238.
- Cadenas, E., Davies, K.J.A., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Bio Med* 29, 222-230.
- Cairns, J., Jr., Heath, A.G., Parker, B.C., 1975. Temperature influence on chemical toxicity to aquatic organisms. *J Water Pollut Control Fed* 47, 267-280.
- Candeias, L.P., Folkes, L.K., Wardman, P., 1995. Is Fenton chemistry that important? *Radiation Research* 1895-1995, Congress Proceedings, 220-223.
- Cao, L., Huang, W., Shan, X., Ye, Z., Dou, S., 2012. Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder juveniles. *Environ Toxicol Pharmacol* 33, 16-25.
- Catala, A., 2006. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell B* 38, 1482-1495.
- Catala, A., 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* 157, 1-11.
- Chakraborty, H., Sen, P., Sur, A., Chatterjee, U., Chakrabarti, S., 2003. Age-related oxidative inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Experimental gerontology* 38, 705-710.

- Cherkasov, A.S., Grewal, S., Sokolova, I.M., 2007. Combined effects of temperature and cadmium exposure on haemocyte apoptosis and cadmium accumulation in the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J Therm Biol* 32.
- Cherkasov, A.S., Ringwood, A.H., Sokolova, I.M., 2006. Combined effects of temperature acclimation and cadmium exposure on mitochondrial function in eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Environ Toxicol Chem* 25, 2461-2469.
- Chowdhury, M.J., Bucking, C., Wood, C.M., 2008. Pre-exposure to waterborne nickel downregulates gastrointestinal nickel uptake in rainbow trout: indirect evidence for nickel essentiality. *Environ Sci Technol* 42, 1359-1364.
- Correia, A.D., Costa, M.H., Luis, O.J., Livingstone, D.R., 2003. Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea : Amphipoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 289, 83-101.
- Cosgrove, J.P., Church, D.F., Pryor, W.A., 1987. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 22, 299-304.
- Cossins, A.R., Christiansen, J., Prosser, C.L., 1978. Adaptation of biological membranes to temperature. The lack of homeoviscous adaptation in the sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 511, 442-452.
- Couture, P., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 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. *Hum Ecol Risk Assess* 14, 97-125.
- Couture, P., Kumar, P.R., 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and calcium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquat Toxicol* 64, 107-120.
- Couture, P., Pyle, G., Campbell, P., Hontela, A., 2015. Using *Perca* as Biomonitors in Ecotoxicological Studies. In: *Biology of Perch.*, CRC Press, Boca Raton, FL, ed. CRC Press, Boca Raton, FL, CRC Press, Boca Raton, FL,.
- Craig, P.M., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2007. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 293, R1882-1892.
- Crockett, E., Sidell, B., 1990. Some pathways of energy metabolism are cold adapted in antarctic fishes. *Physiol Zool* 63, 472-488.
- Crockett, E.L., 2008a. The cold but not hard fats in ectotherms: consequences of lipid restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review. *J Comp Physiol B* 178, 795-809.
- Crockett, E.L., 2008b. The cold but not hard fats in ectotherms: consequences of lipid restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review. *J Comp Physiol B* 178, 795-809.

- Cuculescu, M., Hyde, D., Bowler, K., 1995. Temperature-Acclimation of Marine Crabs - Changes in Plasma-Membrane Fluidity and Lipid-Composition. *J Therm Biol* 20, 207-222.
- da Costa, F., Nóvoa, S., Ojea, J., Martínez-Patiño, D., 2011. Changes in biochemical and fatty acid composition of the razor clam *Solen marginatus* (Solenidae: Bivalvia) during larval development. *Marine Biology* 158, 1829-1840.
- Dabas, A., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., Lakra, W.S., 2012. Assessment of tissue-specific effect of cadmium on antioxidant defense system and lipid peroxidation in freshwater murrel, *Channa punctatus*. *Fish Physiol Biochem* 38, 469-482.
- Daum, G., Vance, J.E., 1997. Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res* 36, 103-130.
- de Kroon, A.I., Rijken, P.J., De Smet, C.H., 2013. Checks and balances in membrane phospholipid class and acyl chain homeostasis, the yeast perspective. *Prog Lipid Res* 52, 374-394.
- de Torrenço, M., Brenner, R.R., 1976. Influence of environmental temperature on the fatty acid desaturation and elongation activity of fish (*Pimelodus maculatus*) liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* 424, 36-44.
- Denkhaus, E., Salnikow, K., 2002. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42, 35-56.
- Devaux, P.F., Morris, R., 2004. Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic* 5, 241-246.
- Dowhan, W., 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids?, pp. 199-232.
- Drobnies, A.E., Davies, S.M., Kraayenhof, R., Epanand, R.F., Epanand, R.M., Cornell, R.B., 2002. CTP:phosphocholine cytidyltransferase and protein kinase C recognize different physical features of membranes: differential responses to an oxidized phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1564, 82-90.
- Egginton, S., Sidell, B.D., 1989. Thermal acclimation induces adaptive changes in subcellular structure of fish skeletal muscle. *Am J Physiol* 256, R1-9.
- Eisler R, 1998. Nickel hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review, Contaminant Hazard Reviews. Patuxent Wildlife Research Center.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H., 1991. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. *Free Radical Bio Med* 11, 81-128.
- Evans, P., Halliwell, B., 1999. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences* 884, 19-40.
- 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.
- Fan, J., Yang, X., Wang, W., Wood, W.H., 3rd, Becker, K.G., Gorospe, M., 2002. Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10611-10616.

- Feller, S.E., Gawrisch, K., MacKerell, A.D., 2002. Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: Intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. *J Am Chem Soc* 124, 318-326.
- Fernandez, B., Campillo, J.A., Martinez-Gomez, C., Benedicto, J., 2010. Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquatic Toxicology* 99, 186-197.
- Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., Reis-Henriques, M.A., 2005. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology* 71, 39-48.
- Friedlander, M., Kotchabhakdi, N., Prosser, C.L., 1976. The effects of heat and cold on behavior and cerebellar function in goldfish. *J. comp. Physiol.* 112, 19-45.
- Fudge, D.S., Stevens, E.D., Ballantyne, J.S., 1998. No evidence for homeoviscous adaptation in a heterothermic tissue: tuna heat exchangers. *Am J Physiol* 275, R818-823.
- Galazyn-Sidorczuk, M., Brzoska, M.M., Jurczuk, M., Moniuszko-Jakoniuk, J., 2009. Oxidative damage to proteins and DNA in rats exposed to cadmium and/or ethanol. *Chem Biol Interact* 180, 31-38.
- Garceau, N., Pichaud, N., Couture, P., 2010. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquatic Toxicology* 98, 107-112.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzahed, Z., Jore, D., 2003. Espèce réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'actualité chimique*, 91-96.
- Gauthier, C., Couture, P., Pyle, G.G., 2006. Metal effects on fathead minnows (*Pimephales promelas*) under field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 353-364.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J., 2002. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers* 7, 242-256.
- Giguère, A., Campbell, P.G., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 77, 178-189.
- Girotti, A.W., 1985. Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of free radicals in biology & medicine* 1, 87-95.
- Girotti, A.W., 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 39, 1529-1542.
- Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., Regoli, F., 2013. Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures. *Aquat Toxicol* 134-135, 120-127.
- Giuliani, M.E., Regoli, F., 2014. Identification of the Nrf2-Keap1 pathway in the European eel *Anguilla anguilla*: role for a transcriptional regulation of antioxidant genes in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 150, 117-123.

- Grasset, J., Ollivier, É., Bougas, B., Yannic, G., Campbell, P., Bernatchez, L., Couture, P., 2016. Combined effects of temperature changes and metal contamination at different levels of biological organization in yellow perch. *Aquat. Toxicol.* 177, 324-332.
- Gregory, M.K., See, V.H., Gibson, R.A., Schuller, K.A., 2010. Cloning and functional characterisation of a fatty acyl elongase from southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 155, 178-185.
- Grim, J.M., Miles, D.R., Crockett, E.L., 2010. Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. *J Exp Biol* 213, 445-452.
- Guderley, H., 2004. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 79, 409-427.
- Guderley, H., Kraffe, E., Bureau, W., Bureau, D.P., 2008. Dietary fatty acid composition changes mitochondrial phospholipids and oxidative capacities in rainbow trout red muscle. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 178, 385-399.
- Guo, J.J., Hsieh, H.Y., Hu, C.H., 2009. Chain-Breaking Activity of Carotenes in Lipid Peroxidation: A Theoretical Study. *J Phys Chem B* 113, 15699-15708.
- Gutteridge, J.M.C., 1995. Lipid-Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue-Damage. *Clin Chem* 41, 1819-1828.
- Habte-Tsion, H.M., Ren, M., Ge, X., Kumar, V., Liu, B., Xie, J., Chen, R., 2016. Increase in temperature affects the growth, immune, and antioxidant status and hepatopancreatic gene expressions of antioxidant enzymes and heat-shock proteins of blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* fry. *Science & Technology* 2, 408-426.
- Hall, J.M., Parrish, C.C., Thompson, R.J., 2002. Eicosapentaenoic acid regulates scallop (*Placopecten magellanicus*) membrane fluidity in response to cold. *Biological Bulletin* 202, 201-203.
- Hansen, B.H., Romma, S., Garmo, O.A., Pedersen, S.A., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., 2007. Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere* 67, 2241-2249.
- Hasnain, S.S., Minns, C.K., Shuter, B.J., 2010. Key Ecological Temperature Metrics for Canadian Freshwater Fishes. Applied Research and Development Branch • Ontario Ministry of Natural Resources.
- Hazel, J.R., 1984. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Am J Physiol* 246, R460-470.
- Hazel, J.R., 1995. Thermal Adaptation in Biological-Membranes - Is Homeoviscous Adaptation the Explanation. *Annu Rev Physiol* 57, 19-42.
- Hazel, J.R., Landrey, S.R., 1988. Time Course of Thermal Adaptation in Plasma-Membranes of Trout Kidney .2. Molecular-Species Composition. *Am J Physiol* 255, R628-R634.

- Hazel, J.R., Williams, E.E., 1990a. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog Lipid Res* 29, 167-227.
- Hazel, J.R., Williams, E.E., 1990b. The Role of Alterations in Membrane Lipid-Composition in Enabling Physiological Adaptation of Organisms to Their Physical-Environment. *Prog Lipid Res* 29, 167-227.
- Hazel, J.R., Williams, E.E., Livermore, R., Mozingo, N., 1991. Thermal Adaptation in Biological-Membranes - Functional-Significance of Changes in Phospholipid Molecular-Species Composition. *Lipids* 26, 277-282.
- Heise, K., Estevez, M.S., Puntarulo, S., Galleano, M., Nikinmaa, M., Portner, H.O., Abele, D., 2007. Effects of seasonal and latitudinal cold on oxidative stress parameters and activation of hypoxia inducible factor (HIF-1) in zoarcid fish. *J Comp Physiol B* 177, 765-777.
- Heugens, E.H., Jager, T., Creyghton, R., Kraak, M.H., Hendriks, A.J., Van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2003. Temperature-dependent effects of cadmium on *Daphnia magna*: accumulation versus sensitivity. *Environ Sci Technol* 37, 2145-2151.
- Hoch, F.L., 1992. Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim Biophys Acta* 1113, 71-133.
- Hochachka, P., Somero, G., 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, Oxford.
- Hsieh, S.L., Kuo, C.M., 2005. Stearoyl-CoA desaturase expression and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during cold acclimation. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 141, 95-101.
- Hulbert, A.J., Else, P.L., 1999. Membranes as possible pacemakers of metabolism. *Journal of theoretical biology* 199, 257-274.
- IPCC, 2007. (Intergovernmental Panel on Climate Change) Fourth assessment report Press ed, in: University, C. (Ed.). Cambridge University New York.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., Yamamoto, M., 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13, 76-86.
- Jakobsson, A., Westerberg, R., Jacobsson, A., 2006. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* 45, 237-249.
- Jiang, W.D., Liu, Y., Hu, K., Jiang, J., Li, S.H., Feng, L., Zhou, X.Q., 2014. Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (CuZnSOD) signaling in the fish brain: protective effects of myo-inositol. *Aquat Toxicol* 155, 301-313.
- Jones, G.J., Nichols, P.D., Johns, R.B., Smith, J.D., 1987. The effect of mercury and cadmium on the fatty-acid and sterol composition of the marine diatom *asterionella-glacialis*. *Phytochemistry* 26, 1343-1348.
- Kagan, V.E., Borisenko, G.G., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Jiang, J., Potapovich, A.I., Kini, V., Amoscato, A.A., Fujii, Y., 2004. Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions

- of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free radical biology & medicine* 37, 1963-1985.
- Karp, G., 2004. *Cell and molecular biology. Concepts and experiments. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, United States of America.*
- Kaspar, J.W., Niture, S.K., Jaiswal, A.K., 2012. Antioxidant-induced INrf2 (Keap1) tyrosine 85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the INrf2-Cul3-Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression. *J Cell Sci* 125, 1027-1038.
- Kasprzak, K.S., 1995. Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Invest* 13, 411-430.
- Kasprzak, K.S., Sunderman, F.W., Salnikow, K., 2003. Nickel carcinogenesis. *Mutat Res-Fund Mol M* 533, 67-97.
- Kehrer, J.P., Biswal, S.S., 2000. The molecular effects of acrolein. *Toxicol Sci* 57, 6-15.
- Kennedy, S.R., Leaver, M.J., Campbell, P.J., Zheng, X., Dick, J.R., Tocher, D.R., 2006. Influence of dietary oil content and conjugated linoleic acid (CLA) on lipid metabolism enzyme activities and gene expression in tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Lipids* 41, 423-436.
- Klein, C.B., Frenkel, K., Costa, M., 1991. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem Res Toxicol* 4, 592-604.
- Kostetsky, E.Y., Velansky, P.V., 2009. Phospholipids of sea worms, mollusks, and arthropods. *Russian Journal of Marine Biology* 35, 187-199.
- Kraffe, E., Marty, Y., Guderley, H., 2007. Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. *J Exp Biol* 210, 149-165.
- Krezel, A., Szczepanik, W., Sokolowska, M., Jezowska-Bojczuk, M., Bal, W., 2003. Correlations between complexation modes and redox activities of Ni(II)-GSH complexes. *Chem Res Toxicol* 16, 855-864.
- Kristal, B.S., Park, B.K., Yu, B.P., 1996. 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 271, 6033-6038.
- Kuah, M.K., Jaya-Ram, A., Shu-Chien, A.C., 2015. The capacity for long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a carnivorous vertebrate: Functional characterisation and nutritional regulation of a Fads2 fatty acyl desaturase with Delta4 activity and an Elovl5 elongase in striped snakehead (*Channa striata*). *Biochim Biophys Acta* 1851, 248-260.
- Kubrak, O.I., Husak, V.V., Rovenko, B.M., Poigner, H., Mazepa, M.A., Kriews, M., Abele, D., Lushchak, V.I., 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, 88-96.
- Kühn, H., Borchert, A., 2002. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: The interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radical Bio Med* 33, 154-172.
- Kunimoto, M., Inoue, K., Nojima, S., 1981. Effect of ferrous ion and ascorbate-induced lipid peroxidation on liposomal membranes. *Biochim Biophys Acta* 646, 169-178.

- Labbe, C., Maise, G., Muller, K., Zachowski, A., Kaushik, S., Loir, M., 1995. Thermal acclimation and dietary lipids alter the composition, but not fluidity, of trout sperm plasma membrane. *Lipids* 30, 23-33.
- Lapointe, D., Pierron, F., Couture, P., 2011. Individual and combined effects of heat stress and aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 104, 80-85.
- Lau, A., Tian, W., Whitman, S.A., Zhang, D.D., 2013. The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not. *Antioxidants & redox signaling* 18, 91-93.
- Le Grand, F., 2012. Etude des relations entre compositions membranaires lipidiques et fonctions cellulaires: Cas des hémocytes de bivalves atteints de néoplasie disséminée, Préparée à l'UFR Sciences et Techniques de Brest. UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE, Bretagne, p. 330.
- Lecklin, T., Nikinmaa, M., 1999. Seasonal and temperature effects on the adrenergic responses of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) erythrocytes. *J Exp Biol* 202, 2233-2238.
- Lee, A.G., 2003. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta* 1612, 1-40.
- Lee, A.G., 2004. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1666, 62-87.
- Lee, S.H., Oe, T., Blair, I.A., 2001. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science* 292, 2083-2086.
- Leonard, A.E., Pereira, S.L., Sprecher, H., Huang, Y.S., 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 43, 36-54.
- Li, Y., Monroig, O., Zhang, L., Wang, S., Zheng, X., Dick, J.R., You, C., Tocher, D.R., 2010. Vertebrate fatty acyl desaturase with Delta4 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16840-16845.
- Liu, Z., Lv, W., Huang, Y., Fan, B., Li, Y., Zhao, Y., 2016. Effects of cadmium on lipid metabolism in female estuarine crab, *Chiromantes dehaani*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 188, 9-16.
- Livingstone, D.R., 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev Med Vet-Toulouse* 154, 427-430.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Krieger, M., Scott, M., Kaiser, C., 2005. *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck Université.
- Logue, J.A., De Vries, A.L., Fodor, E., Cossins, A.R., 2000. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. *J Exp Biol* 203, 2105-2115.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006a. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 143, 30-35.

- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006b. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 143, 36-41.
- Ma, Q., 2013. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53, 401-426.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Vinagre, C., Diniz, M.S., 2013. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 166, 237-243.
- Malek, R.L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy, M.A., Gerhard, G.S., 2004. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 138, 363-373.
- McClelland, G.B., Craig, P.M., Dhekney, K., Dipardo, S., 2006. Temperature- and exercise-induced gene expression and metabolic enzyme changes in skeletal muscle of adult zebrafish (*Danio rerio*). *J Physiol* 577, 739-751.
- Mellery, J., Geay, F., Tocher, D.R., Kestemont, P., Debier, C., Rollin, X., Larondelle, Y., 2016. Temperature Increase Negatively Affects the Fatty Acid Bioconversion Capacity of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fed a Linseed Oil-Based Diet. *Plos One* 11, e0164478.
- Miccadei, S., Floridi, A., 1993. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport by cadmium. *Chem Biol Interact* 89, 159-167.
- Mohd-Yusof, N.Y., Monroig, O., Mohd-Adnan, A., Wan, K.L., Tocher, D.R., 2010. Investigation of highly unsaturated fatty acid metabolism in the Asian sea bass, *Lates calcarifer*. *Fish Physiol Biochem* 36, 827-843.
- Mohrhauer, H., Holman, R.T., 1963. Alteration of the Fatty Acid Composition of Brain Lipids by Varying Levels of Dietary Essential Fatty Acids. *J Neurochem* 10, 523-530.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., Kan, Y.W., 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9926-9930.
- Monroig, O., Rotllant, J., Cerda-Reverter, J.M., Dick, J.R., Figueras, A., Tocher, D.R., 2010. Expression and role of Elovl4 elongases in biosynthesis of very long-chain fatty acids during zebrafish *Danio rerio* early embryonic development. *Biochim Biophys Acta* 1801, 1145-1154.
- Monroig, O., Tocher, D.R., Navarro, J.C., 2013. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: recent advances in molecular mechanisms. *Mar Drugs* 11, 3998-4018.
- Morais, S., Castanheira, F., Martinez-Rubio, L., Conceicao, L.E., Tocher, D.R., 2012. Long chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a marine vertebrate: ontogenetic and nutritional regulation of a fatty acyl desaturase with Delta4 activity. *Biochim Biophys Acta* 1821, 660-671.

- Morais, S., Monroig, O., Zheng, X., Leaver, M.J., Tocher, D.R., 2009a. Highly unsaturated fatty acid synthesis in Atlantic salmon: characterization of ELOVL5- and ELOVL2-like elongases. *Mar Biotechnol (NY)* 11, 627-639.
- Morais, S., Monroig, O., Zheng, X.Z., Leaver, M.J., Tocher, D.R., 2009b. Highly Unsaturated Fatty Acid Synthesis in Atlantic Salmon: Characterization of ELOVL5-and ELOVL2-like Elongases. *Mar Biotechnol* 11, 627-639.
- Morais, S., Mourente, G., Martinez, A., Gras, N., Tocher, D.R., 2015. Docosahexaenoic acid biosynthesis via fatty acyl elongase and Delta4-desaturase and its modulation by dietary lipid level and fatty acid composition in a marine vertebrate. *Biochim Biophys Acta* 1851, 588-597.
- Mosca, M., Ceglie, A., Ambrosone, L., 2011. Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposomes. *Chem Phys Lipids* 164, 158-165.
- Mubiana, V.K., Blust, R., 2007. Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res* 63, 219-235.
- Nichols, J.W., Playle, R.C., 2004. Influence of temperature on silver accumulation and depuration in rainbow trout. *J Fish Biol* 64, 1638–1654.
- Niki, E., Yamamoto, Y., Takahashi, M., Komuro, E., Miyama, Y., 1989. Inhibition of oxidation of biomembranes by tocopherol. *Annals of the New York Academy of Sciences* 570, 23-31.
- Osburn, W.O., Kensler, T.W., 2008. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res* 659, 31-39.
- Palermo, F.F., Risso, W.E., Simonato, J.D., Martinez, C.B., 2015. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 116, 19-28.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Ruggiero, F.M., 2002. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* 286, 135-141.
- Parola, M., Bellomo, G., Robino, G., Barrera, G., Dianzani, M.U., 1999. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxidants & redox signaling* 1, 255-284.
- Pelletier, D., Dutil, J.D., Blier, P., Guderley, H., 1994. Relation between Growth-Rate and Metabolic Organization of White Muscle, Liver and Digestive-Tract in Cod, *Gadus-Morhua* (Vol 164, Pg 179, 1994). *J Comp Physiol B* 164, 508-508.
- Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L., Guderley, H., 2007. Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: Energetics and remodelling of membrane lipids. *J Exp Biol* 210, 2999-3014.
- Pernet, F., Tremblay, R., Gionet, C., Landry, T., 2006. Lipid remodeling in wild and selectively bred hard clams at low temperatures in relation to genetic and physiological parameters. *J Exp Biol* 209, 4663-4675.

- Petrescu, A.D., Gallegos, A.M., Okamura, Y., Strauss, J.F., 3rd, Schroeder, F., 2001. Steroidogenic acute regulatory protein binds cholesterol and modulates mitochondrial membrane sterol domain dynamics. *J Biol Chem* 276, 36970-36982.
- Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., Campbell, P.G., 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, 620-631.
- Poon, H.F., Calabrese, V., Scapagnini, G., Butterfield, D.A., 2004. Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 59, 478-493.
- Porta, A., Fortino, V., Armenante, A., Maresca, B., 2013. Cloning and characterization of a Delta9-desaturase gene of the Antarctic fish *Chionodraco hamatus* and *Trematomus bernacchii*. *J Comp Physiol B* 183, 379-392.
- Preto, A., Loro, V.L., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., Moraes, B.S., Menezes, C., Cattaneo, R., Clasen, B., Finamor, I.A., Dressler, V., 2011. Effects of Water Cadmium Concentrations on Bioaccumulation and Various Oxidative Stress Parameters in *Rhamdia quelen*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 309-318.
- Price, D.J., Joshi, J.G., 1983. Ferritin. Binding of beryllium and other divalent metal ions. *J Biol Chem* 258, 10873-10880.
- 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. *Hum Ecol Risk Assess* 14, 126-145.
- Pyle, G.G., Rajotte, J.W., Couture, P., 2005. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicol Environ Saf* 61, 287-312.
- Quinn, P.J., 2010. A lipid matrix model of membrane raft structure. *Prog Lipid Res* 49, 390-406.
- Rahel, F.J., Magnuson, J.J., 1983. Low Ph and the Absence of Fish Species in Naturally Acidic Wisconsin Lakes - Inferences for Cultural Acidification. *Can J Fish Aquat Sci* 40, 3-9.
- Rajotte, J.W., Couture, P., 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Can J Fish Aquat Sci* 59, 1296-1304.
- Ramos, C.X., Estevez, S.L., Giraldo, E., 2002. Volatile organic compound emissions during the composting of biosolids from a domestic wastewater treatment plant. *Water Sci Technol* 46, 195-198.
- Regoli, F., Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquat Toxicol* 105, 56-66.

- Ren, H.T., Zhang, G.Q., Li, J.L., Tang, Y.K., Li, H.X., Yu, J.H., Xu, P., 2013. Two Delta6-desaturase-like genes in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): structure characterization, mRNA expression, temperature and nutritional regulation. *Gene* 525, 11-17.
- Ringwood, A.H., Conners, D.E., 2000. The effects of glutathione depletion on reproductive success in oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar Environ Res* 50, 207-211.
- Rouleau, C., Xiong, Z.H., Pacepavicius, G., Huang, G.L., 2003. Uptake of waterborne tributyltin in the brain of fish: axonal transport as a proposed mechanism. *Environ Sci Technol* 37, 3298-3302.
- Schlame, M., Ren, M., Xu, Y., Greenberg, M.L., Haller, I., 2005. Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chem Phys Lipids* 138, 38-49.
- Schnegg, A., Kirchgessner, M., 1975. [The essentiality of nickel for animal growth]. *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd* 36, 63-74.
- Scott, W.B., Crossman, E.J., 1973. *Freshwater Fishes of Canada*. Fisheries Research Board of Canada.
- Seiliez, I., Panserat, S., Kaushik, S., Bergot, P., 2001. Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a Delta6-desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 130, 83-93.
- Sidell, B.D., 1998. Intracellular oxygen diffusion: the roles of myoglobin and lipid at cold body temperature. *J Exp Biol* 201, 1119-1128.
- Sinensky, M., 1974. Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 522-525.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Soares, S.S., Martins, H., Gutierrez-Merino, C., Aureliano, M., 2008. Vanadium and cadmium in vivo effects in teleost cardiac muscle: metal accumulation and oxidative stress markers. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 147, 168-178.
- Sokolova, I.M., 2004. Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (*Bivalvia: Ostreidae*). *J Exp Biol* 207, 2639-2648.
- Sokolova, I.M., Sokolov, E.P., Ponnappa, K.M., 2005. Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (*Bivalvia: Ostreidae*). *Aquat Toxicol* 73, 242-255.
- Sprecher, H., 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1486, 219-231.
- Spurgeon, D.J., Sturzenbaum, S.R., Svendsen, C., Hankard, P.K., Morgan, A.J., Weeks, J.M., Kille, P., 2004. Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 138, 11-21.

- Stillwell, W., Wassall, S.R., 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* 126, 1-27.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: Animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res* 29, 1715-1733.
- Tiku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J., Cossins, A.R., 1996. Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 271, 815-818.
- Tocher, D., R., 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac Res* 41, 717-732.
- Tocher, D.R., Agaba, M., Hastings, N., Teale, A.J., 2003. Biochemical and molecular studies of the polyunsaturated fatty acid desaturation pathway in fish. *Big Fish Bang*, 211-227.
- Tocher, D.R., Fonseca-Madriral, J., Dick, J.R., Ng, W.K., Bell, J.G., Campbell, P.J., 2004. Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Phys B* 137, 49-63.
- Tocher, D.R., Zheng, X., Schlechtriem, C., Hastings, N., Dick, J.R., Teale, A.J., 2006. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl delta 6 desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids* 41, 1003-1016.
- Topal, A., Atamanalp, M., Oruc, E., Halici, M.B., Sisecioglu, M., Erol, H.S., Gergit, A., Yilmaz, B., 2015. Neurotoxic effects of nickel chloride in the rainbow trout brain: Assessment of c-Fos activity, antioxidant responses, acetylcholinesterase activity, and histopathological changes. *Fish Physiol Biochem* 41, 625-634.
- Torreilles, J., Guerin, M.C., 1990. Nickel(II) as a Temporary Catalyst for Hydroxyl Radical Generation. *FEBS letters* 272, 58-60.
- Trueman, R.J., Tiku, P.E., Caddick, M.X., Cossins, A.R., 2000. Thermal thresholds of lipid restructuring and delta(9)-desaturase expression in the liver of carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Exp Biol* 203, 641-650.
- Uchida, K., 1999. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends Cardiovasc Med* 9, 109-113.
- Uchida, K., 2003. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 42, 318-343.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1-40.
- van den Burg, E.H., Peeters, R.R., Verhoye, M., Meek, J., Flik, G., Van der Linden, A., 2005. Brain responses to ambient temperature fluctuations in fish: reduction of blood volume and initiation of a whole-body stress response. *J Neurophysiol* 93, 2849-2855.

- Vergauwen, L., Hagenars, A., Blust, R., Knapen, D., 2013. Temperature dependence of long-term cadmium toxicity in the zebrafish is not explained by liver oxidative stress: evidence from transcript expression to physiology. *Aquat Toxicol* 126, 52-62.
- Wang, J., Zhang, H., Zhang, T., Zhang, R., Liu, R., Chen, Y., 2015. Molecular mechanism on cadmium-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. *Int J Biol Macromol* 77, 59-67.
- Wang, J.Y., Wang, Z.Y., Kouyama, T., Shibata, T., Ueki, T., 1994. Significance of Amino-Groups of Phosphatidylethanolamine in Phospholipid Peroxidation of Mixed Liposomes. *Chem Phys Lipids* 71, 197-203.
- Wang, L., Gallagher, E.P., 2013. Role of Nrf2 antioxidant defense in mitigating cadmium-induced oxidative stress in the olfactory system of zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol* 266, 177-186.
- Wodtke, E., 1981. Temperature adaptation of biological membranes. Compensation of the molar activity of cytochrome c oxidase in the mitochondrial energy-transducing membrane during thermal acclimation of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Biochim Biophys Acta* 640, 710-720.
- Wodtke, E., Cossins, A.R., 1991. Rapid cold-induced changes of membrane order and delta 9-desaturase activity in endoplasmic reticulum of carp liver: a time-course study of thermal acclimation. *Biochim Biophys Acta* 1064, 343-350.
- Wu, H., Xuan, R., Li, Y., Zhang, X., Wang, Q., Wang, L., 2013. Effects of cadmium exposure on digestive enzymes, antioxidant enzymes, and lipid peroxidation in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *Environmental science and pollution research international* 20, 4085-4092.
- Xu, H., Zhang, D.L., Yu, D.H., Lv, C.H., Luo, H.Y., Wang, Z.Y., 2015. Molecular cloning and expression analysis of *scd1* gene from large yellow croaker *Larimichthys crocea* under cold stress. *Gene* 568, 100-108.
- Xue, X., Feng, C.Y., Hixson, S.M., Johnstone, K., Anderson, D.M., Parrish, C.C., Rise, M.L., 2014. Characterization of the fatty acyl elongase (*elovl*) gene family, and hepatic *elovl* and delta-6 fatty acyl desaturase transcript expression and fatty acid responses to diets containing camelina oil in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 175, 9-22.
- Yang, J., Liu, D., Jing, W., Dahms, H.U., Wang, L., 2013. Effects of cadmium on lipid storage and metabolism in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *Plos One* 8, e77569.
- Yang, P.M., Chen, H.C., Tsai, J.S., Lin, L.Y., 2007. Cadmium induces Ca²⁺-dependent necrotic cell death through calpain-triggered mitochondrial depolarization and reactive oxygen species-mediated inhibition of nuclear factor-kappaB activity. *Chem Res Toxicol* 20, 406-415.
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Hayat, S., Ahmad, A., 2011. Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bull Environ Contam Toxicol* 86, 1-17.
- Zabelinskii, S.A., Brovtsyna, N.B., Chebotareva, M.A., Gorbunova, O.B., Krivchenko, A.I., 1995. Comparative investigation of lipid and fatty acid composition of fish gills and mammalian

- lungs. A model of the membrane lipid component areas. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 111, 127-140.
- 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.
- Zheng, J.L., Yuan, S.S., Wu, C.W., Li, W.Y., 2016a. Chronic waterborne zinc and cadmium exposures induced different responses towards oxidative stress in the liver of zebrafish. *Aquat Toxicol* 177, 261-268.
- Zheng, J.L., Yuan, S.S., Wu, C.W., Lv, Z.M., 2016b. Acute exposure to waterborne cadmium induced oxidative stress and immunotoxicity in the brain, ovary and liver of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 180, 36-44.
- Zheng, X., Leaver, M.J., Tocher, D.R., 2009. Long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in fish: Comparative analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) Delta6 fatty acyl desaturase gene promoters. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 154, 255-263.
- Zheng, X., Seilliez, I., Hastings, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P., Teale, A.J., 2004. Characterization and comparison of fatty acyl Delta6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 139, 269-279.
- Zhou, J., Wang, L., Xin, Y., Wang, W., He, W.Y., Wang, A.L., Liu, Y., 2010. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J Therm Biol* 35, 284-289.

Articles scientifiques

Article 1

**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*)**

Mariem Fadhlaoui and Patrice Couture*

Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490 de la
Couronne, QC G1K 9A9, Canada

* Corresponding author: patrice.couture@ete.inrs.ca

Aquat Toxicol. 2016 Nov;180:45-55. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.09.005. Epub 2016 Sep 9

Abbreviations

ARA Arachidonic acid (C20:4 n-6)

CAT Catalase

Cd Cadmium

CI Condition index

D5D Δ 5-desaturase

D6D Δ 6-desaturase

DHA Docosahexaenoic acid (C22:6 n-3)

ELOVL2 Elongase 2

EPA Eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3)

GPx Glutathione peroxidase

GSH Reduced glutathione

GST Glutathione-S-transferase

HSI Hepatosomatic index

LPO Lipid peroxidation

MDA Malondialdehyde

MUFA Monounsaturated fatty acids

n-3 PUFA Omega-3 series polyunsaturated fatty acids

n-6 PUFA Omega-6 series polyunsaturated fatty acids

n-9 PUFA Omega-9 polyunsaturated fatty acids

Ni Nickel

PI Peroxidation index

PUFA Polyunsaturated fatty acids

SCD-16 stearoyl-CoA-desaturase

SCD-18 stearoyl-CoA-desaturase

SFA Saturated fatty acids

SOD Superoxide dismutase

Abstract

The aim of this study was to investigate the combined effects of temperature and metal contamination (cadmium and nickel) on phospholipid fatty acid composition, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in fish. Yellow perch were acclimated to two different temperatures (9°C and 28°C) and exposed either to Cd or Ni (respectively 4 µg/L and 600 µg/L) for seven weeks. Superoxide dismutase, catalase, glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase activities and glutathione concentration were measured as indicators of antioxidant capacities, while malondialdehyde concentration was used as an indicator of lipid peroxidation. Poikilotherms including fish counteract the effects of temperature on phospholipid fatty acid ordering by remodelling their composition to maintain optimal fluidity. Accordingly, in our study, the fatty acid composition of yellow perch muscle at 9°C was enhanced in monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) compared to fish maintained at 28°C, in agreement with the theory of homeoviscous adaptation. Using ratios of various fatty acids as surrogates for desaturase and elongase activities, our data suggests that modification of the activity of these enzymes is responsible for the thermal acclimation of phospholipid fatty acid profiles. However, this response was altered under Ni and Cd exposure: PUFA decreased (specifically n-6 PUFA) while the proportion of saturated fatty acids increased at 9°C, whereas at 28°C, PUFA increased to proportions exceeding those observed at 9°C. Lipid peroxidation could be observed under all experimental conditions. Both enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems acted cooperatively to cope with oxidative stress leading to lipid peroxidation, which was not affected by temperature acclimation as indicated by malondialdehyde concentration, in spite of a higher polyinsaturation in cold-acclimated fish which would be predicted to increase their vulnerability to peroxidation. However, in warm-acclimated, Ni-exposed fish, in which the highest proportion of PUFA was observed, lower concentrations of malondialdehyde were measured, suggesting an overcompensation of antioxidant mechanisms in these fish which could represent a substantial metabolic cost and explain their lower condition.

Keywords: Fish; Cell membranes; Phospholipid fatty acids; Temperature; Cadmium; Nickel; Antioxidant enzymes; Lipid peroxidation

1. Introduction

Biological membranes are semipermeable barriers surrounding cells and organelles. They are composed of a lipid bilayer and a variety of proteins. Membranes are highly sensitive to temperature fluctuations. This sensitivity is due to the effects of temperature on membrane lipids and consequently on the proteins embedded in the membranes (Hochachka and Somero, 2002). The internal temperature of fish and other poikilothermic organisms largely reflects ambient environmental temperature. These organisms counteract the effects of fluctuations in environmental temperature on the properties and function of their cell membranes by remodelling membrane lipids, a process known as homeoviscous adaptation (Hazel, 1995) involving changes in phospholipid head groups, acyl-chain composition and cholesterol content (Hazel and Williams, 1990a). Shifts in phospholipid classes surrounding proteins modulate their activity (Frick et al., 2010; Robinson, 1993). This homeoviscous adaptation ensures the maintenance of membrane functions (Hazel, 1995; Kraffe et al., 2007; Pernet et al., 2007). Desaturases and elongases are the key enzymes involved in fatty acid synthesis and remodelling pathways. It was demonstrated that cold-challenged ectothermic fish display an upregulation of these enzymes to restore the fluidity of cold-rigidified membranes (Tiku et al., 1996b; Tocher et al., 2004; Trueman et al., 2000).

Aerobic organisms depend on oxygen for energy production through oxidative phosphorylation. Reactive oxygen species (ROS) are constantly generated during normal cell metabolism. These species include superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$) and others (Halliwell and Gutteridge, 1999). Organisms cope with increasing ROS production by up-regulating their antioxidant defense system through non-enzymatic (glutathione, ascorbic and uric acid, tocopherols, etc.) and enzymatic components (Livingstone, 2003). General cellular antioxidant enzymes are superoxide dismutase (SOD, converts O_2^- to H_2O_2), catalase (CAT, reduces H_2O_2 to H_2O), glutathione peroxidase (GPx, detoxifies H_2O_2 or organic hydroperoxides produced, for example, by lipid peroxidation (Halliwell and Gutteridge, 1999)) and glutathione S-transferase (GST, catalyzes the conjugation of glutathione (GSH) with various electrophilic substances). If antioxidant systems fail to eliminate excessive ROS production, significant damage can occur including DNA damage, protein degradation, enzyme

inactivation and lipid peroxidation (Halliwell and Gutteridge, 1999). Indeed, ROS that possess sufficient energy to remove a hydrogen atom within lipid chains from methylene groups (-CH₂-), can initiate lipid peroxidation (Girotti, 1985). During initiation, a lipid radical (L[•]) produced after the abstraction of a hydrogen atom reacts with dioxygen to generate a lipid peroxy radical (LOO[•]). This peroxy radical then reacts with another lipid to generate another radical (L[•]) and a lipid hydroperoxide (LOOH). It has been demonstrated that more polyunsaturated fatty acids, and hence membranes with a higher degree of unsaturation, are more prone to LPO (Lin and Huang, 2007).

The intensity of LPO is assessed by measuring the concentrations of primary products, lipid peroxides or end products of LPO such as MDA and other aldehydes (Halliwell and Gutteridge, 1999). Common products of LPO released within the non-polar interior of biological membranes affect membrane stability by disruption of the non covalent bonds (e.g., *van der Waals* interactions). Furthermore, LOOH damages membrane integrity by affecting lipid-lipid and lipid-protein interactions (Kühn and Borchert, 2002). In addition to damaging membrane physical properties, LPO can be deleterious by affecting membrane protein functions. For example, the activity of Na⁺/K⁺-ATPase was reduced by approximately 90% after LPO in brain synaptosomes (Chakraborty et al., 2003). Thermal stress induces oxidative stress in ectotherms (Bagnyukova et al., 2003; Bocchetti et al., 2008; Verlecar et al., 2007). An increase of temperature stimulates metabolic processes, enhances oxygen consumption and consequently may increase ROS production (Lushchak, 2011).

Toxic trace metals induce uncontrolled reactive species production and oxidative stress. Cadmium (Cd) and nickel (Ni) are widespread pollutants in aquatic systems. Previous investigations have demonstrated that Cd does not generate ROS directly. Instead, Cd-induced oxidative stress results from the displacement of endogenous Fe leading to ROS generation (Schlenk and Benson, 2003; Valko et al., 2006). In turn, this affects GSH and thiol concentrations and antioxidant enzyme activities and can lead to lipid peroxidation (Sevcikova et al., 2011; Valko et al., 2005; Wang and Wang, 2009). Nickel is also highly toxic to living organisms. It can mediate directly or indirectly the oxidation of macromolecules (DNA, lipids and proteins) (Palermo et al., 2015). It can induce oxidative stress through ROS formation via Haber-Weiss/Fenton reactions (Torreilles and Guerin, 1990), depletion of intracellular free radical

scavengers such as GSH (Krezel et al., 2003) or inhibition of the activity of antioxidant enzymes (Attig et al., 2014; Kubrak et al., 2012).

In a natural environment, organisms are typically exposed to multiple stressors, including natural factors, such as changes in temperature, oxygen concentrations or food availability, and anthropogenic stressors, such as contaminants. Several studies have investigated the effects of these stressors separately on different fish species and an increasing number of studies have examined their combined effects (Cai and Curtis, 1990; Cailleaud et al., 2007; Grasset et al., 2016; Kefaloyianni et al., 2005; Tocher et al., 2004). Yet, to our knowledge, this is the first study to examine the responses of cell membrane phospholipid fatty acid composition, lipid peroxidation and oxidative stress to variations in acclimation temperature and metal exposure. We investigated this question in the muscle of yellow perch (*Perca flavescens*), a freshwater fish species commonly found in areas affected by metal contamination. To this end, fish were acclimated to a cold or a warm temperature under clean conditions or combined with environmentally-relevant aqueous concentrations of Cd or Ni. Membrane phospholipid fatty acid composition was measured, along with indicators of oxidative stress (MDA) and oxidizability (PI) of membrane phospholipids and cellular antioxidant capacities (SOD, CAT, GST, GPx, GSH).

2. Materials and methods

2.1 Experimental design: thermal acclimation and metal exposure

Yellow perch (*Perca flavescens*) were obtained from Trevor Thomas, Abbey Road Fish Farm, (Wainfleet, ON) and transported to the Laboratoire de Recherche en Sciences Aquatiques (LARSA) at Université Laval (Québec, QC) for thermal acclimation. Fish were maintained in a 1m³ circular tank for one month to be acclimated to laboratory conditions at a temperature of 20°C. During this period, fish were fed with Hikari® frozen brine shrimp (*Artemia salina*) with a daily ration of 3% of their biomass. Following acclimation, 25 fish were placed in each of six 40 L aquaria and experimental conditions were started. Although yellow perch tolerate a wide range of temperatures, literature reports that they have a preference for warmer temperatures around 20-22°C (Huh et al., 1976; Rasmussen and Brinkmann, 2015; Tidwell et al., 1999)

However, a recent study from our laboratory (Grasset et al., 2014) as well as preliminary studies indicated that the growth of yellow perch is optimal at colder temperatures, around 9-11°C. In the same studies, we also observed that, although inducing heat stress, 28°C was easily tolerated by yellow perch. Therefore, in our study we selected 9 and 28°C as experimental temperatures since these presented a wide range with a comparable separation from the acclimation temperature. After acclimation at 20°C, temperature was reduced (in 3 aquaria) or raised (in 3 aquaria) at a rate of 2°C per day to reach a low (9°C) and a high (28°C) temperature. When the desired temperatures were reached, metal exposure was initiated following the procedures described in (Grasset et al., 2016). For Cd, measured water concentrations were $3.98 \pm 0.23 \mu\text{g/L}$ ($35.4 \pm 2.0 \text{ nM}$) (mean \pm SE, n=56; 2 temperatures, 2 aquaria per temperature, two samplings per week). Values in Ni exposure aquaria were $605.9 \pm 13.3 \mu\text{g Ni/L}$ ($10.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$) (n=56). Concentrations of both metals in control aquaria were consistently below 0.01 $\mu\text{g/L}$. These metal concentrations were selected as realistic in contaminated environments (Couture et al., 2008; Gauthier et al., 2006). After 7 weeks of exposure, fish were sacrificed by a blow to the head. Biometric measures (length and weight) were taken, then fish were dissected and muscle samples were stored at -80°C for fatty acid, enzyme and lipid peroxidation analyses. Eight fish per condition (2 temperatures for control, Cd and Ni-exposed fish) were randomly selected for this study. The remainder of the fish were dedicated to another study (Grasset et al., 2016). All procedures were approved by our institutional animal care committee and followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

2.2 Sample preparation for enzyme and GSH assays

Muscle samples (40-50 mg) were thawed on ice, diluted 10-fold with ice-cold buffer (pH 7.5; 20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 0.1% Triton X-100) and homogenized for two bursts of 20 s using an Ultra Turrax T25 homogenizer (Janke and Kunkel, IKA-labortechnik, Staufen, Germany). During homogenization, samples and homogenates were kept on ice. Once homogenized, three 20 μL aliquots were kept in separate tubes and stored at -80°C for SOD, CAT and GPx assays whereas GST and GSH were analyzed the same day. Assays were performed using a UV/Vis Cary 50 spectrophotometer equipped with a microplate reader (Varian Inc., Palo Alto, CA).

2.3 Enzyme assays

All enzyme activities were measured using a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary 100; Varian Inc., Palo Alto, CA) with 96-well microplates at room temperature (20°C). Reactions were recorded over a period of five minutes and linear sections of at least three minutes were selected to calculate reaction rates. The activity of GST (EC 2.5.1.18) was measured according to Habig et al. (1974) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as a substrate. The reaction mixture contained phosphate buffer (50mM, pH 6.5), CDNB (1mM), GSH (6mM, omitted in controls), in a final volume of 200 μL (including 10 μL of sample). The formation of S -2,4-dinitro phenyl glutathione conjugate was monitored for 5 min by following its absorbance at 340 nm. GST activity was expressed in IU (μmol of substrate converted to product per min) per g of muscle (wet weight) using an extinction coefficient of 9.6 mM cm^{-1} .

The activities of SOD, CAT and GPx were determined using assay kits (Nos. 706002 and 707002 and 703102 for SOD, CAT and GPx, respectively) purchased from Cayman Chemical Company Inc. (Ann Arbor, Michigan USA) in supernatants obtained by centrifugation of homogenates at 5000 g for 5 min, 10 000 g for 15 min or 10 000 g for 15 min at 4°C for SOD, CAT and GPx respectively. Activities were expressed as UI mg protein⁻¹. SOD activity (EC 1.15.1.1) was determined by the detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine (one unit of SOD represents the amount of enzyme required for 50% dismutation of superoxide radical). CAT (EC 1.11.1.6) activity was determined using a colorimetric assay by measuring formaldehyde formed with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole as chromogen. GPx activity (EC 1.11.1.9) was determined by the measure of NADP⁺ absorbance decrease at 340 nm, which is directly proportional to GPx activity.

2.4 Reduced glutathione (GSH) assay

GSH was determined according to Ellman (1959) by measuring the absorbance of 5,5-dithiobis- 2-nitrobenzoic acid (DTNB)-GSH conjugates at 412 nm and expressed as nmol GSH per mg of protein. The concentration was determined in the initial homogenates used for enzyme assays. Samples were treated with trichloroacetic acid (TCA, 10% w/v) to remove molecules and

enzymes that can hinder GSH analysis, then centrifuged at 8872 g for 10 min. Fifty μL of supernatant was mixed with 230 μL of Tris-HCl buffer (0.8 M Tris/HCl, 0.02 M EDTA, pH 8.9) and 40 μL of 0.01 M DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), Ellman's reagent). The reaction mixture was incubated for 5 min at room temperature. The concentration of GSH was calculated using a GSH standard curve.

2.5 Protein determination

Protein concentration was measured on muscle homogenates according to the dye-binding procedure of (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard. Absorbance was measured at 580 nm and protein concentration was expressed as mg protein per g wet weight.

2.6 Lipid peroxidation

The peroxidative damage to lipids that occurs with free radical generation and results in the production of malondialdehyde (MDA) was assessed. Lipid peroxidation was determined by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to the instructions of an assay kit (10009055) purchased from Cayman Chemical Company Inc. (Ann Arbor, Michigan USA). Muscle samples (25 mg) were homogenised in 250 μL of specific buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, containing 150 mM sodium chloride, 1% Tergitol (NP-40), 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS). Homogenates were centrifuged at 1 600 g for 10 min at 4°C. The MDA in the sample reacted with thiobarbituric acid (TBA) under high temperature (100°C) to generate the MDA-TBA adduct. MDA was measured by colorimetry at 530 nm. The concentration was expressed as nmol/mg protein.

2.7 Lipid extraction and phospholipid fatty acid analysis

Total lipids were extracted from 100 mg muscle samples with 21 volumes of chloroform/methanol (2:1, v/v) containing 0.01% (w/v) butylated hydroxytoluene (BHT) as antioxidant Folch i Camarasa (1957); (Folch et al., 1957) After homogenisation, 5 mL of NaCl (0,73%) were added to precipitate proteins and the mixture was centrifuged 15 min at 1000 g. Two phases separated by a protein layer were obtained: an upper chloroform phase that contains lipids and a lower aqueous phase. The chloroform layer was removed and the solvent

evaporated in a TurboVap® under a nitrogen flow.

Polar and neutral lipid fractions were separated by passing samples through a 500 mg, 3 mL silica column (Sigma-Aldrich, CA). Neutral lipids were eluted by rinsing with 10 mL chloroform, then polar lipids were eluted with 10 mL of methanol.

Fatty acids are difficult to analyze because they are highly polar and tend to form hydrogen bonds. Reducing their polarity facilitates their analysis by gas chromatography and facilitates separation by number and position of unsaturations. The esterification reaction of fatty acids to methyl esters involves the condensation of the carboxyl group of an acid and the hydroxyl group of an alcohol in the presence of a catalyst. Fatty acids from polar fractions were esterified with 2 mL of BF₃ (Boron trifluoride-methanol solution 14% in methanol) for 1h at 75°C. After cooling, fatty acid methyl esters (FAME) were extracted with 3 mL of water (to remove the catalyst- BF₃) followed by 3 mL of petroleum ether. To remove impurities and BHT, samples were purified on a silica column by rinsing with 5 mL petroleum ether and then eluting with 10 mL petroleum ether containing 5% diethyl ether.

Finally, the organic solvent was evaporated under nitrogen, FAME were dissolved in hexane, transferred to 300 µL screw-capped vials and stored at -20°C to be analysed by gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID, Agilent Technologies, 7890D GC system) equipped with a fused silica capillary column (Agilent Technologies: 30 m, 0,250 mm I.D, 0,25 µm). The injection was made at a constant pressure. The oven was programmed to begin at an initial temperature of 140°C increasing to 170°C at a rate of 6.5°C / min, then to 200°C at a rate of 2.75°C / min for 14 min and finally the temperature rose to 230°C at a rate of 3°C / min for 12 min. FAMEs were identified by comparing chromatograms with standard reference mixtures of 37 fatty acids, NHI-F, fatty acid methyl ester mix, PUFA NO.2, animal source and fatty acid methyl esters kit (Sigma-Aldrich, Canada).

2. 8 Kidney metal analysis

Metal analysis was performed by ICP-MS on the kidneys of all fish exposed to metal and temperature combinations for this and another parallel study (Grasset et al., 2016) where analytical procedures are detailed. Kidney was selected for metal analysis because other analyses were prioritized for liver and muscle of these small fish in the larger project. Since in

contaminated yellow perch, kidney, liver and muscle concentrations are correlated with each other (Couture et al., 2008; Pyle et al., 2005a), kidney metal concentrations reflect accumulation in other tissues, although most metals, including Cd and Ni, typically accumulate much more in fish kidney and liver than in muscle (Pannetier et al., Submitted; Pyle et al., 2005a).

2.9 Calculation of indices and statistical analysis

The indices were calculated according to the following formulas:

Condition index (**CI**) = $[\text{Weight (g)} / (\text{Fish length (mm)})^3] * 100$.

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

Peroxidation index (**PI**) = $0.025 * (\% \text{monoenoics}) + 1 * (\% \text{dienoics}) + 2 * (\% \text{trienoics}) + 4 * (\% \text{tetraenoics}) + 6 * (\% \text{pentaenoics}) + 8 * (\% \text{hexaenoics})$, where monoenoics, dienoics, trienoics, tetraenoics, pentaenoics and hexaenoics are fatty acids containing 1, 2, 3, 4, 5 and 6 double bonds, respectively (Almaida-Pagan et al., 2012).

Desaturase activities were estimated as the product/precursor ratios of individual fatty acids according to the following formulas: $\Delta 9$ -desaturase = stearoyl-CoA-desaturase = $[16:1 (n-7)/16:0]$ and $[18:1 (n-9)/18:0]$, $\Delta 5$ -desaturase = $20:5n3/20:4n3$ and $\Delta 6$ -desaturase = $20:4n3/18:3n3$. The indices of elongase activity were calculated using $(22:2n6/20:2n6)$ and $(22:5n3/20:5n3)$ ratios.

Data were expressed as mean \pm SE ($n = 8$) and statistical analyzes were made with JMP 11.0.0 (SAS Institute Inc.). Comparisons among mean values from different stressor combinations were performed using one-way analysis of variance (ANOVA). If the test showed significant differences and the data were normally distributed, a Tukey-Kramer HSD test was performed to determine the significance level (p -value). When data were nonparametric, a Wilcoxon / Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test was applied. Subsequently, Spearman correlation was carried out to investigate correlations among the various parameters monitored. The interactions of temperature and metals on the main fatty acid classes were determined by two-way ANOVA. For this analysis, a variable termed "metal" was created that combined Cd and Ni exposed fish.

A principal component analysis (PCA) was performed to highlight relationships among tested parameters. Resulting biplots represented projections on extracted principal components and two-dimensional loadings of tested parameters as arrows. The parameter significance is represented by arrow length and direction relative to plotted components.

3. Results

3.1 Fish condition and metal contamination

Fish exposed to Ni at 9°C accumulated this metal significantly in their kidney compared to controls and Ni accumulation was enhanced 4-fold at 28°C compared to 9°C (Table 1). In control fish, kidney Ni concentrations were low and not affected by temperature. Exposure to Cd also led to a significant kidney accumulation of this metal at both temperatures. Like for Ni, fish exposed to the higher temperature accumulated higher concentrations of Cd in their kidney. However, in contrast to Ni, kidney Cd concentrations were also higher in control fish at 28°C compared to 9°C. Indeed, kidney Cd concentrations in control fish at 28°C were comparable to values measured in fish exposed to Cd at 9°C.

In control fish, an increase of temperature did not affect the CI but strongly and negatively affected the HSI yielding a 3-fold decrease of relative liver size (Table 1). Neither Cd nor Ni affected the HSI. Although the CI of fish at 9°C was not affected by metals, at 28°C fish exposed to Ni expressed lower values of the CI. The HSI was positively correlated to the CI in fish from all conditions combined (Spearman correlation = 0.6025; $p < 0.0001$; $n = 48$).

3.2 Fatty acid composition of membrane phospholipids

Several differences were found in the fatty acid composition of muscle membrane phospholipids from fish exposed at 9°C and 28°C in the presence or absence of Cd or Ni (Table 2). The principal fatty acids of total membrane phospholipids from yellow perch muscle were 22:6n3>16:0>20:5n3>18:1n9≈18:2n6≈20:4n6>18:1n7≈18:0. The relative abundance of major (>1%) and minor (<1%) fatty acids was affected by both temperature and metals (Table 2). The slight increase of SFA at the warmer temperature was not significant (Table 3) and none of the

individual SFA varied significantly with temperature (Table 2). In contrast, MUFA, dominated by 18:1n9, decreased at high temperature (Table 3). At 9°C under Cd and Ni exposure, SFA and MUFA increased compared to controls at 9°C although the Ni-induced increase in MUFA was not significant, while at 28°C neither SFA nor MUFA varied appreciably following metal exposure, leading to a significant metal-temperature interaction (Table 3). The PI was lowest in control fish acclimated to 28°C, but highest in Ni-exposed fish at that same elevated temperature. Moreover, total PUFA and n-3 PUFA, of which DHA (22:6n3) is the most important, were strongly positively correlated to the PI (Table 4).

In all conditions, PUFA were more abundant than SFA and MUFA and were dominated by 20:5n3 and 22:6n3. This FA category varied in the opposite direction compared to SFA and was affected by temperature and metals (Table 3). There were significantly higher proportions of several individual n-3 and n-9 FA at 9°C compared to 28°C (Table 2). However, the two-way ANOVA only identified a significant effect of temperature on n-9 PUFA, since metals strongly affected n-3 PUFA composition but differently at each temperature, leading to a significant metal-temperature interaction but masking the temperature effect (Table 3). Indeed, n-3 PUFA (the family that dominated PUFA) was 1.5-fold lower at 28°C compared to 9°C when only control fish were considered and the difference was significant (one-way ANOVA, data not shown). In contrast, n-6 PUFA exhibited higher proportions at 28°C and decreased in metal-exposed fish at both temperatures, although only significantly at 9°C. There was, however, no significant temperature-metal interaction on n-6 PUFA (Table 3).

3.3 Estimated activity of fatty acid desaturases and elongases

Estimated muscle D9D activity decreased significantly with an increase of temperature but it was not affected by metal exposure (Table 5). Estimated D6D and D5D activities did not differ between 9°C and 28°C. However, the presence of Ni and Cd had an effect on D6D: at 9°C, Cd and Ni exposure induced an increase of this index compared to 9°C controls. The same was observed for Ni exposure at 28°C, with a 3-fold increase compared to control fish at the same temperature. The activity of the ELOVL2 elongase was significantly influenced by temperature, expressing much lower values at 28°C compared to 9°C. Metals also affected ELOVL2 activity,

but in opposite directions at 9°C and 28°C, both Cd and Ni leading to strong decreases compared to same-temperature controls at 9°C, but Cd yielding a significant increase at 28°C.

3.4 Antioxidant enzyme activities

Muscle CAT and SOD activities showed different responses to temperature compared to metal exposure. Catalase activity was much more affected by temperature than by metals. Its activity drastically decreased at 28°C compared to 9°C ($p < 0.0001$; Figure 1). Slight but non-significant increases were observed under Cd and Ni exposure at both temperatures. In contrast to CAT, SOD activity was not affected by temperature ($p > 0.5$; Figure 2). At 9°C, both Cd and Ni exposure decreased SOD activity. At 28°C, Ni exposure also decreased SOD activity, but Cd exposure increased it, yielding the highest muscle SOD activity of all conditions tested. Like SOD, muscle GPx activity was not affected by temperature (Figure 3). Interestingly, it reacted to metal exposure in opposite directions compared to SOD. At 9°C, under Cd and Ni exposure, GPx activity increased by roughly 25% relative to 9°C controls. At 28°C, it increased significantly under Ni exposure ($p = 0.001$), to reach the highest values among experimental conditions. Like SOD and GPx, temperature did not affect GST activity (Figure 4). Although the enzyme was insensitive to metals at 28°C, at the colder temperature, its activity increased two-to three fold following exposure to either Cd or Ni.

3.5 Glutathione

Glutathione levels were strongly affected by temperature and were much higher at 28°C than at 9°C (Figure 5). The non-significant trend of decrease that can be observed in Ni-exposed fish at 9°C became strongly significant at 28°C. On the other hand, Cd did not affect at all GSH levels at either temperature.

3.6 Lipid peroxidation

The concentration of lipid peroxides, expressed in terms of MDA concentrations, was not significantly affected by temperature (Figure 6). Exposure to Cd did not affect lipid peroxidation at either temperature, but Ni exposure led to strong decreases of MDA concentrations at both temperatures ($p < 0.01$ at 9°C and $p < 0.001$ at 28°C). Indeed, in the whole dataset, muscle MDA

concentration was strongly and negatively correlated to kidney Ni concentration (Table 6), MDA concentration was weakly, but negatively correlated with the PI.

3.7 Relationships among indicators of oxidative stress and antioxidant capacities

The activity of SOD displayed strong negative correlations with CAT, GST and GPx activities, but a positive correlation with GSH concentrations (Table 6). Catalase and GST activities were weakly positively correlated with each other, and the two enzymes negatively correlated with GSH concentrations. Likewise, glutathione peroxidase activity, which showed a positive correlation with GST activity, correlated negatively with GSH concentrations. There was no relationship between MDA concentration and any indicator of antioxidant capacities. The CI increased significantly with muscle CAT activity and MDA and GST concentrations, but was negatively correlated with GSH concentrations.

To facilitate interpretation of the relationships between antioxidant enzymes and lipid peroxidation and to define patterns of biomarker response to temperature and metal stress combinations, we performed a Principal Component Analysis (PCA; Figure 7). The analysis led to two relevant components that accounted for nearly 81% of the overall variability. The first principal component (PC 1) explained 55.9% of the total variance and was characterised firstly by the high loading of CAT and GST, correlated positively, and on the other hand by SOD and GSH, which correlated negatively. This first axis appeared to be associated to temperature specific responses, since fish from the two exposure temperatures were clearly separated along that axis, with fish exposed to 9°C to the right, those exposed to 28°C to the left, and very little overlap. This analysis highlights that high values of CAT, GST and GPx activities were related to low temperature, while elevated values of SOD activity and GSH concentrations were related to the high temperature condition. The second component explained 33.2% of total variance and MDA concentration showed the highest loading (0.97) on that axis. Principal component 2 (PC2) allowed a fair degree of separation of fish according to metal exposure conditions, with control fish associated to the top (positive) values of PC2, while Ni-exposed fish tended to gather at the opposite (negative) side, with intermediate values for Cd-exposed fish. Thus, the PCA supports

that lower values of lipid peroxidation, as indicated by MDA concentrations, were found in Ni-exposed fish compared to Cd-exposed or control fish.

4. Discussion

4.1 Effects of temperature on membrane composition

Cell membranes of poikilotherms subjected to variations in temperature restructure their phospholipids to maintain cellular integrity. In our study, the proportion of UFA, including PUFA and MUFA, was higher in muscle phospholipids of fish acclimated to the colder temperature, in agreement with the general theory of homeoviscous adaptation (Hazel, 1972; Hazel et al., 1991). The major decrease of DHA in the muscle of warm-acclimated fish supports the role of this major fatty acid in the thermal response of cell membrane phospholipid composition. Previous studies have reported this observation and demonstrated that phospholipids containing 22:6n3 are important in controlling membrane fluidity at low temperatures (Logue et al., 2000; Tiku et al., 1996b). More recently, Snyder et al. (2012) observed in freshwater alewives (*Alosa pseudoharengus*) a remodelling of polar lipids at cold temperatures. Unsaturated fatty acids (mainly DHA) greatly increased compared to SFA.

The remodelling of cell membrane fatty acid composition in response to ambient temperature variations involves desaturase and elongase enzymes, but direct measurement of their activities is difficult. In our study, we used product-to-precursor ratios as surrogate measures of desaturase and elongase indices (Cormier et al., 2014) to examine the contribution of these enzymes in temperature-induced membrane remodelling. The higher activity of D9D at 9°C compared to 28°C corresponded to higher proportions of MUFA and PUFA. This enzyme is one of key enzymes involved in the unsaturation of SFA, inserting double bonds into fatty acids at the C9-C10 position. Unsaturation of fatty acids at this position confers a disordering effect within membranes which enhances fluidity (Barton and Gunstone, 1975). The ELOVL-2 elongase catalyzes the elongation of fatty acid chains leading to the formation of long chain fatty acids such as DHA. Its higher activity in our cold-acclimated fish likely also played a role in the increased proportions of UFA.

4.2 Effects of metals on membrane composition and interaction with temperature

Exposure to Cd and Ni modified the normal response of cell membrane phospholipid composition to temperature acclimation in the muscle of our yellow perch. Most importantly, the increase in PUFA in cold-acclimated fish compared to warm-acclimated fish was largely counteracted by exposure to Cd and Ni. In contrast, in metal-exposed warm-acclimated fish, muscle phospholipid PUFA content increased to levels comparable to those observed in cold-acclimated control fish. These modifications observed in metal-exposed fish generated two alternative hypotheses that our experimental design does not allow to tease apart conclusively: Either metals modify desaturase and elongase activities which results in changes in FA composition, or the metal modifies the properties of phospholipid bilayers and the response reflects a compensatory adjustment of its composition in order to preserve membrane function. Evidence from our data lends support to the latter hypothesis. For instance, the decrease of the estimated ELOVL2 elongase activity 9°C in Cd-exposed fish compared to controls at the same temperature corresponds to a decrease in PUFA content, which is dominated by DHA. Since this fatty acid is synthesized through two successive elongations (Tocher et al., 2003), our results could suggest that the decrease in PUFA following Cd exposure was the result of elongase inhibition in cold-acclimated fish. However, kidney Cd accumulation was higher in fish acclimated to 28°C compared to fish at 9°C. Hence, an enhancement of the direct inhibition of elongases and desaturases by Cd would be expected in warm-acclimated fish. Yet, in the latter fish, exposure to Cd yielded higher PUFA and DHA percentages compared to control fish at the same temperature and estimated elongase activity increased to levels similar to values calculated in cold-acclimated fish. Jones et al. (1987a) reported a decrease of PUFA content on marine diatom (*Asterionella glacialis*) under Cd exposure, which they explained by an inhibition of the $\Delta 6$ -desaturase caused by the formation of Cd complexes with thiol-containing enzymes involved in lipid biosynthesis. Our study does not support their hypothesis. Similarly, in our Ni-exposed fish, estimated $\Delta 5$ -desaturase and ELOVL2 elongase activities decreased at 9°C whereas $\Delta 6$ -desaturase increased at 28°C, which argues against a direct effect of metals on elongases and desaturases.

4.3 Influence of temperature and metals on lipid peroxidation and indicators of antioxidant capacities

In the present study, the correlations established between SOD, CAT and GPx activities support that these enzymes act jointly to prevent ROS-induced oxidative damage. The dismutation of superoxide anions by SOD generates hydrogen peroxide, which is converted to water and oxygen by CAT and GPx. The enzyme SOD represents the primary defense against excess ROS production (Halliwell and Gutteridge, 2007). In our study, Cd and Ni exposure modified muscle SOD activity, but temperature by itself did not, although, as discussed above, metal accumulation was stimulated at the higher temperature. Since metal-induced variations in muscle SOD activity differed between cold and warm-acclimated fish, this suggests an interaction between temperature and metal exposure on antioxidant defense mechanisms. Interestingly, in cold-acclimated fish, exposure to either Cd or Ni led to decreases in SOD activity. However, although the accumulation of Cd in warm-acclimated fish induced SOD activity and led to a positive correlation between kidney Cd concentration and muscle SOD activity, the reverse was observed for Ni. Hence, the response of SOD activity to Cd exposure was temperature-dependent, while the response to Ni exposure was not. In a parallel study under the same conditions (Grasset et al., 2016), warm-acclimated yellow perch exposed to Ni expressed a sharp increase of SOD activity in their liver, but Cd did not affect the hepatic activity of this enzyme. Hence, as also demonstrated earlier for wild perch (Pierron et al., 2009), the response of antioxidant defense mechanisms to metal contamination is tissue and metal-specific.

The strong positive correlation between muscle SOD activity and glutathione concentrations that we report here reveals an active upregulation of these components of the antioxidant system through complex differential responses to increases in temperature and metal exposure. The increase of GSH concentrations in perch acclimated to 28°C agrees with a study by Bagnyukovaa et al. (2007) on various tissues of goldfish (*Carassius auratus*) following an increase of temperature from 3°C to 23°C. Furthermore, our observation of a depletion of GSH concentrations in Ni-exposed fish is supported by earlier studies which attributed this phenomenon to either Ni-mediated ROS formation leading to GSH depletion, or to a direct

interaction of Ni with GSH leading the formation of Ni-GSH complexes (Misra et al., 1990; Salnikow et al., 1994).

As for SOD, in our study muscle GPx activity was not affected by temperature, but increased following exposure to Cd and Ni. Others have demonstrated that GPx activity is stimulated by metal exposure in toadfish (*Halobatrachus didactylus*) (Soares et al., 2008) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) (Tsangaris et al., 2007). Furthermore, GPx activity has been considered to be complementary to CAT activity to ensure optimal protection against oxidative stress by scavenging H₂O₂ deriving from superoxide anion dismutation (Dabas et al., 2012; Halliwell and Gutteridge, 1999). In all conditions combined, like for GPx, the activity of CAT in the muscle of our perch was inversely correlated to SOD activity. Hence, contrary to our observations for SOD, temperature strongly negatively affected muscle CAT activity, but the enzyme seemed little affected by metals. The negative correlation between SOD and CAT illustrates the complementary nature of these two components of the antioxidant system. Indeed, the superoxide anion (O₂^{•-}) generated by SOD activity has been reported to have an inhibitory effect on CAT activity (Kono and Fridovich, 1982).

The response of muscle GST activity to temperature and metals contrasted with the other biomarkers of the antioxidant system measured. Although GST activity was not sensitive to temperature, it responded to metal exposure by expressing sharp increases in activity, but only in cold-acclimated fish. This enzyme has been shown by others to increase with thermal stress and metal exposure in aquatic organisms. For example, Madeira et al. (2013) reported that GST activity in the muscle of several estuarine fish species (*Diplodus vulgaris*, *Diplodus sargus*, *Dicentrarchus labrax* and *Liza ramada*) increased with thermal stress. As for any other stressor, the extent of response to heat stress clearly varies as a function of the intensity and duration of the stressor. The lack of thermal response of GST activity in our study likely reflects interspecific differences in thermal tolerance and exposure protocols. For metal exposure, Pretto et al. (2011) reported an increase of GST activity in the liver of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different concentration of Cd for 7 and 14 days and Kubrak et al. (2012) presented similar conclusions in goldfish *Carassius auratus* (spleen) exposed to three concentrations of Ni.

4.4 Influence of membrane composition on lipid peroxidation and indicators of antioxidant capacities

In the discussion below, we hypothesize that metal accumulation in whole kidney tissue is correlated to metal concentrations in the vicinity of the muscle phospholipid bilayers, which is likely given the correlations in metal concentrations among tissues reported in the literature for contaminated fish (see Section 2.8), and the co-variation of total tissue metal concentrations and concentrations measured in membrane-containing subcellular components (Couture et al., 2015; Rosabal et al., 2015). Temperature greatly affected kidney metal accumulation, with higher accumulation of both Cd and Ni at the elevated temperature suggesting a higher risk of toxicity. However, since the phospholipids in the cell membranes of warm-acclimated fish were less polyunsaturated, and hence less vulnerable to metal-induced lipid peroxidation, these two unrelated consequences of temperature acclimation could act in opposite directions, decreasing potential differences in metal-induced lipid peroxidation between the two acclimation temperatures. Yet, metal exposure affected the normal response of cell membrane phospholipid composition to temperature and the PI, an index reflecting the vulnerability of fatty acids to oxidation, indicated that the greater risk of membrane lipid peroxidation was found in warm-acclimated, Ni-exposed fish.

The concentration of MDA, the only direct measurement of lipid peroxidation in our study, was not affected by temperature, in agreement with the PI that did not differ between control fish acclimated to either temperature. However, exposure to both metals, but in particular to Ni, had a stronger influence on both MDA and PI in warm-acclimated compared to cold-acclimated fish, but surprisingly the two parameters varied in opposite directions. Hence, in Ni-exposed warm-acclimated fish, expressing a very high proportion of oxidation-prone PUFA as indicated by elevated PI values, lipid peroxidation was lowest. Indeed, PUFA with a high degree of unsaturation such as ARA (20:4n6), EPA (20:5n3) and DHA (22:6n3) exhibit a greater oxidizability compared to other membrane fatty acids (Cosgrove et al., 1987). For example, the oxidizability of DHA (six double bonds) is about 7.5 fold more important than that of 18:2n6 (two double bonds) (Holman, 1957). Here, warm-acclimated fish exposed to Ni accumulated the metal to high concentrations and this negatively affected their condition. The composition of their muscle membranes was modified by Ni exposure in such a way as to increase their

vulnerability to oxidative stress, but the opposite response was observed. Our study therefore suggests that under these conditions, the depletion of glutathione by ROS or through complexation with Ni combined with an increase of GPx activity overcompensated the risk of LPO. The metabolic cost of this overstimulation of the antioxidant response may be partly responsible for the lower condition of these fish.

5. Conclusion

Data from this study provide novel information about combined temperature and metal effects on fatty acid membrane composition, antioxidant defense system and lipid peroxidation. The higher PUFA content in the muscle cell membranes of cold-acclimated yellow perch allowing maintenance of membrane fluidity and function is consistent with the theory of homeoviscous adaptation. Our study also supports that cold acclimation of membrane composition results from modifications in the activity of key elongases and desaturases. However, under metal exposure, the normal response of cell membrane composition to thermal acclimation was reversed, either through a direct effect on elongase and desaturase activity or as a consequence of metal-induced modifications of membrane properties. Under most conditions studied, the antioxidant system did not prevent accumulation of MDA, suggesting that LPO is a normal occurrence in perch muscle. However, exposure to Ni and particularly at the warmer temperature appears to have triggered a massive response of the antioxidant system, leading to a substantial decrease of LPO in spite of the higher polyinsaturation of membrane lipids in these fish. Future studies should examine the implications of these observations for cell energetics and membrane function.

Acknowledgements

We wish to thank Julie Grasset, who carried out fish exposures and provided us with samples for this study. We are also grateful to Mohamed Ali Ben Alaya for his help in the statistical part related to PCA. This study was funded by a Discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to P. Couture.

References

- Almaida-Pagan, P.F., de Costa, J., Mendiola, P., Tocher, D.R., 2012. Age-related changes in mitochondrial membrane composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart and brain. *Comp Biochem Phys B* 163, 129-137.
- Attig, H., Kamel, N., Sforzini, S., Dagnino, A., Jamel, J., Boussetta, H., Viarengo, A., Banni, M., 2014. Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam). *Mar Environ Res* 94, 65-71.
- Bagnyukova, T.V., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2003. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. *J Therm Biol* 28, 21-28.
- Bagnyukovaa, T.V., Lushchaka, O.V., Storeyb, K.B., Lushchaka, V.I., 2007. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23 °C. *J Therm Biol* 32, 227–234.
- Barton, P.G., Gunstone, F.D., 1975. Hydrocarbon Chain Packing and Molecular-Motion in Phospholipid Bilayers Formed from Unsaturated Lecithins - Synthesis and Properties of 16 Positional Isomers of 1,2-Dioctadecenoyl-Sn-Glycero-3-Phosphorylcholine. *J Biol Chem* 250, 4470-4476.
- Bocchetti, R., Lamberti, C.V., Pisanelli, B., Razzetti, E.M., Maggi, C., Catalano, B., Sesta, G., Martuccio, G., Gabellini, M., Regoli, F., 2008. Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. *Mar Environ Res* 66, 24-26.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Cai, Z., Curtis, L.R., 1990. Effects of diet and temperature on food consumption, growth rate and tissue fatty-acid composition of triploid grass carp. *Aquaculture* 88, 313-327.
- Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S., Forget-Leray, J., 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 147, 841-849.
- Chakraborty, H., Sen, P., Sur, A., Chatterjee, U., Chakrabarti, S., 2003. Age-related oxidative inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Experimental gerontology* 38, 705-710.
- Cormier, H., Rudkowska, I., Lemieux, S., Couture, P., Julien, P., Vohl, M.C., 2014. Effects of FADS and ELOVL polymorphisms on indexes of desaturase and elongase activities: results from a pre-post fish oil supplementation. *Genes & nutrition* 9, 437.
- Cosgrove, J.P., Church, D.F., Pryor, W.A., 1987. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 22, 299-304.

- Couture, P., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 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. *Hum Ecol Risk Assess* 14, 97-125.
- Couture, P., Pyle, G., Campbell, P., Hontela, A., 2015. Using Perca as Biomonitors in Ecotoxicological Studies. In: *Biology of Perch.*, CRC Press, Boca Raton, FL, ed. CRC Press, Boca Raton, FL, CRC Press, Boca Raton, FL,.
- Dabas, A., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., Lakra, W.S., 2012. Assessment of tissue-specific effect of cadmium on antioxidant defense system and lipid peroxidation in freshwater murrel, *Channa punctatus*. *Fish Physiol Biochem* 38, 469-482.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* 226, 497-509.
- Frick, N.T., Bystriansky, J.S., Ip, Y.K., Chew, S.F., Ballantyne, J.S., 2010. Cytochrome c oxidase is regulated by modulations in protein expression and mitochondrial membrane phospholipid composition in estivating African lungfish. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 298, R608-R616.
- Gauthier, C., Couture, P., Pyle, G.G., 2006. Metal effects on fathead minnows (*Pimephales promelas*) under field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 353-364.
- Girotti, A.W., 1985. Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of free radicals in biology & medicine* 1, 87-95.
- Grasset, J., Bougas, B., Campbell, P., Bernatchez, L., Couture, P., 2014. Temperature, oxygen, and diet modulate gene transcription and metabolic capacities in yellow perch. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 71, 1635-1641.
- Grasset, J., Ollivier, É., Bougas, B., Yannic, G., Campbell, P., Bernatchez, L., Couture, P., 2016. Combined effects of temperature changes and metal contamination at different levels of biological organization in yellow perch. *Aquat. Toxicol.* 177, 324-332.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249, 7130-7139.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, THIRD EDITION ed. Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free radicals in biology and medicine*, 4th ed. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Hazel, J.R., 1972. The effect of temperature acclimation upon succinic dehydrogenase activity from the epaxial muscle of the common goldfish (*Carassius auratus* L.)--II. Lipid reactivation of the soluble enzyme. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry* 43, 863-882.

- Hazel, J.R., 1995. Thermal Adaptation in Biological-Membranes - Is Homeoviscous Adaptation the Explanation. *Annu Rev Physiol* 57, 19-42.
- Hazel, J.R., Williams, E.E., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog Lipid Res* 29, 167-227.
- Hazel, J.R., Williams, E.E., Livermore, R., Mazingo, N., 1991. Thermal Adaptation in Biological-Membranes - Functional-Significance of Changes in Phospholipid Molecular-Species Composition. *Lipids* 26, 277-282.
- Hochachka, P., Somero, G., 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, Oxford.
- Holman, R., 1957. Progress in chemistry of fats and other lipids. Lundberg WO, Malkin T (eds), London.
- Huh, H.T., Calbert, H.E., Stuiber, D.A., 1976. Effects of temperature and light on growth of yellow perch and walleye using formulated feed. *Transactions of the American Fisheries Society* 105, 254-258.
- Jones, D.B., Scaretto, L., Carter, R., Mann, J.I., 1987. Glucose, insulin and platelet fatty acids following myocardial infarction: an association with infarct size. *Diabete Metab* 13, 463-466.
- Kefaloyianni, E., Gourgou, E., Ferle, V., Kotsakis, E., Gaitanaki, C., Beis, I., 2005. Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro- or anti-apoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *J Exp Biol* 208, 4427-4436.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257, 5751-5754.
- Kraffe, E., Marty, Y., Guderley, H., 2007. Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. *J Exp Biol* 210, 149-165.
- Krezel, A., Szczepanik, W., Sokolowska, M., Jezowska-Bojczuk, M., Bal, W., 2003. Correlations between complexation modes and redox activities of Ni(II)-GSH complexes. *Chem Res Toxicol* 16, 855-864.
- Kubrak, O.I., Husak, V.V., Rovenko, B.M., Poigner, H., Mazepa, M.A., Kriews, M., Abele, D., Lushchak, V.I., 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, 88-96.
- Kühn, H., Borchert, A., 2002. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: The interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radical Bio Med* 33, 154-172.
- Lin, W.Y., Huang, C.H., 2007. Fatty acid composition and lipid peroxidation of soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*, fed different dietary lipid sources. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, 327-333.
- Livingstone, D.R., 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev Med Vet-Toulouse* 154, 427-430.

- Logue, J.A., De Vries, A.L., Fodor, E., Cossins, A.R., 2000. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. *J Exp Biol* 203, 2105-2115.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13-30.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Vinagre, C., Diniz, M.S., 2013. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 166, 237-243.
- Misra, M., Rodriguez, R.E., Kasprzak, K.S., 1990. Nickel Induced Lipid-Peroxidation in the Rat - Correlation with Nickel Effect on Antioxidant Defense Systems. *Toxicology* 64, 1-17.
- Palermo, F.F., Risso, W.E., Simonato, J.D., Martinez, C.B., 2015. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 116, 19-28.
- Pannetier, P., Caron, A., Campbell, P., Pierron, F., Baudrimont, M., Couture, P., Submitted. A comparison of metal concentrations in the tissues of yellow American eel (*Anguilla rostrata*) and European eel (*Anguilla anguilla*). *Sci Total Environ*.
- Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L., Guderley, H., 2007. Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: Energetics and remodelling of membrane lipids. *J Exp Biol* 210, 2999-3014.
- Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., Campbell, P.G., 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, 620-631.
- Preto, A., Loro, V.L., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., Moraes, B.S., Menezes, C., Cattaneo, R., Clasen, B., Finamor, I.A., Dressler, V., 2011. Effects of Water Cadmium Concentrations on Bioaccumulation and Various Oxidative Stress Parameters in *Rhamdia quelen*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 309-318.
- Pyle, G.G., Rajotte, J.W., Couture, P., 2005. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 287-312.
- Rasmussen, J., Brinkmann, L., 2015. Distribution of Yellow Perch *Perca flavescens* in Lakes, Reservoirs and Rivers of Alberta and British Columbia, in Relation to Tolerance for Climate and other Habitat Factors, and their Dispersal and Invasive Ability, in: CRC Press, B.R. (Ed.), Couture P, Pyle G (eds) *Biology of Perch*, Fl, pp. 73-100.
- Robinson, N.C., 1993. Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 25, 153-163.
- Rosabal, M., Pierron, F., Couture, P., Baudrimont, M., Hare, L., Campbell, P.G., 2015. Subcellular partitioning of non-essential trace metals (Ag, As, Cd, Ni, Pb, and Tl) in livers of American (*Anguilla rostrata*) and European (*Anguilla anguilla*) yellow eels. *Aquat Toxicol* 160, 128-141.

- Salnikow, K., Gao, M., Voitkun, V., Huang, X., Costa, M., 1994. Altered oxidative stress responses in nickel-resistant mammalian cells. *Cancer Res* 54, 6407-6412.
- Schlenk, D., Benson, W.H., 2003. Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts: Organs. CRC Press.
- Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., Svobodova, Z., 2011. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Vet Med-Czech* 56, 537-546.
- Snyder, R.J., Schregel, W.D., Wei, Y., 2012. Effects of thermal acclimation on tissue fatty acid composition of freshwater alewives (*Alosa pseudoharengus*). *Fish Physiol Biochem* 38, 363-373.
- Soares, S.S., Martins, H., Gutierrez-Merino, C., Aureliano, M., 2008. Vanadium and cadmium in vivo effects in teleost cardiac muscle: metal accumulation and oxidative stress markers. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 147, 168-178.
- Tidwell, J.H., Coyle, D.S., Evans, J., Weibel, C., McKinney, J., Dodson, K., Jones, H., 1999. Effect of Culture Temperature on Growth, Survival, and Biochemical Composition of Yellow Perch *Perca flavescens*. *World Aquaculture Society* 30, 324-330.
- Tiku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J., Cossins, A.R., 1996. Cold-induced expression of $\Delta 9$ -desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 271, 815-818.
- Tocher, D.R., Agaba, M., Hastings, N., Teale, A.J., 2003. Biochemical and molecular studies of the polyunsaturated fatty acid desaturation pathway in fish. *Big Fish Bang*, 211-227.
- Tocher, D.R., Fonseca-Madrigal, J., Dick, J.R., Ng, W.K., Bell, J.G., Campbell, P.J., 2004. Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Phys B* 137, 49-63.
- Torreilles, J., Guerin, M.C., 1990. Nickel(II) as a Temporary Catalyst for Hydroxyl Radical Generation. *FEBS letters* 272, 58-60.
- Trueman, R.J., Tiku, P.E., Caddick, M.X., Cossins, A.R., 2000. Thermal thresholds of lipid restructuring and delta(9)-desaturase expression in the liver of carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Exp Biol* 203, 641-650.
- Tsangaris, C., Papathanasiou, E., Cotou, E., 2007. Assessment of the impact of heavy metal pollution from a ferro-nickel smelting plant using biomarkers. *Ecotoxicol Environ Saf* 66, 232-243.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry* 12, 1161-1208.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1-40.
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B.N., 2007. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chem-Biol Interact* 167, 219-226.

Wang, M.H., Wang, G.Z., 2009. Biochemical response of the copepod *Tigriopus japonicus* Mori experimentally exposed to cadmium. Arch Environ Contam Toxicol 57, 707-717.

Table 1: Mean of Ni and Cd concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) in yellow perch kidney, hepatosomatic index and condition index (mean \pm SE; n=8). Means with different superscript letters differ significantly as determined by one-way ANOVA ($p \leq 0.05$).

	9°C	9°C+Cd	9°C+Ni	28°C	28°C+Cd	28°C+Ni
Kidney Ni	0.43 \pm 0.03 ^c	0.28 \pm 0.07 ^c	6.11 \pm 0.47 ^b	0.67 \pm 0.05 ^c	0.31 \pm 0.01 ^c	23.52 \pm 1.33 ^a
Kidney Cd	0.47 \pm 0.08 ^c	1.97 \pm 0.12 ^b	0.31 \pm 0.02 ^c	2.37 \pm 0.11 ^b	5.31 \pm 0.74 ^a	1.46 \pm 0.05 ^{bc}
HSI	2.30 \pm 0.14 ^a	2.45 \pm 0.31 ^a	2.27 \pm 0.10 ^a	0.72 \pm 0.04 ^b	0.63 \pm 0.03 ^b	0.76 \pm 0.05 ^b
CI	1.04 \pm 0.02 ^{ab}	1.02 \pm 0.01 ^a	1.02 \pm 0.01 ^a	0.91 \pm 0.02 ^{bc}	0.86 \pm 0.02 ^{bc}	0.82 \pm 0.02 ^d

Table 2: Fatty acid composition (percentage of total fatty acids) of total phospholipids in yellow perch muscle from each exposure condition (mean \pm SE; n=8). Means with different superscript letters differ significantly as determined by one-way ANOVA ($p \leq 0.05$).

	9°C	9°C+Cd	9°C+Ni	28°C	28°C+Cd	28°C+Ni
C14:0	0.9 \pm 0.2 ^{bc}	1.7 \pm 0.16 ^a	1.6 \pm 0.3 ^{ab}	1.6 \pm 0.7 ^{ac}	0.4 \pm 0.4 ^c	0.7 \pm 0.2 ^c
C15:0	0.04 \pm 0.04 ^{ab}	0.2 \pm 0.08 ^a	0.15 \pm 0.08 ^{ab}	0.08 \pm 0.05 ^{ab}	1.02 \pm 0.67 ^{ab}	0.00 \pm 0.00 ^b
C16:0	13 \pm 0.6 ^b	15.9 \pm 0.9 ^a	15.8 \pm 0.3 ^a	12.7 \pm 1.2 ^b	13 \pm 0.7 ^b	14.2 \pm 0.9 ^b
C17:0	0.09 \pm 0.06 ^{ab}	0.3 \pm 0.07 ^a	0.3 \pm 0.08 ^a	0.1 \pm 0.07 ^{ab}	0.0 \pm 0.0 ^b	0.08 \pm 0.06 ^{ab}
C18:0	2.7 \pm 0.3 ^b	2.9 \pm 0.3 ^{ab}	3.7 \pm 0.1 ^{ab}	3.6 \pm 0.4 ^{ab}	4.3 \pm 0.4 ^a	4.2 \pm 0.4 ^a
C22:0	0.8 \pm 0.3 ^{ab}	0.1 \pm 0.1 ^{ab}	0.0 \pm 0.0 ^b	1.6 \pm 0.3 ^a	1.3 \pm 0.6 ^{ab}	1.2 \pm 0.5 ^{ab}
C24:0	0.2 \pm 0.2 ^{ab}	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.9 \pm 0.3 ^a	0.0 \pm 0.00 ^b	0.08 \pm 0.08 ^b
C14:1n5	0.0 \pm 0.0 ^b	7.7 \pm 3.2 ^a	1.8 \pm 0.71 ^b	0.2 \pm 0.1 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b
C16:1n7	1.8 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	1.5 \pm 0.07	1.4 \pm 0.2	1.8 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2
C17:1n9	1.2 \pm 0.1 ^b	1.1 \pm 0.1 ^a	1.3 \pm 0.2 ^b	2.01 \pm 0.2 ^{ab}	2.9 \pm 0.5 ^b	1.8 \pm 0.5 ^{ab}
C18:1n7	5.9 \pm 1.2 ^a	1.8 \pm 0.7 ^{ab}	1.9 \pm 1.2 ^{ab}	4.9 \pm 0.9 ^b	3.1 \pm 1.01 ^{ab}	4.3 \pm 0.9 ^{ab}
C18:1n9	7.8 \pm 1.2	7.3 \pm 1.03 ^{abc}	8.2 \pm 0.4 ^a	5.7 \pm 0.9 ^c	6.05 \pm 1.01 ^{bc}	5.7 \pm 0.9 ^c
C20:1n9	0.6 \pm 0.1 ^a	0.5 \pm 0.1 ^{ab}	0.7 \pm 0.1 ^a	0.1 \pm 0.07 ^c	0.0 \pm 0.0 ^c	0.2 \pm 0.1 ^{bc}
C22:1n9	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.03 \pm 0.03	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.04 \pm 0.04
C18:2n6	5.8 \pm 0.3 ^a	4.9 \pm 0.4 ^{ab}	6.03 \pm 0.4 ^a	5.6 \pm 0.9 ^{ab}	3.6 \pm 0.4 ^{ab}	3.5 \pm 0.2 ^b
C20:2n6	0.1 \pm 0.08	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.08 \pm 0.08	0.0 \pm 0.0	0.2 \pm 0.1
C18:3n6	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.09 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
C18:3n3	1.9 \pm 0.4 ^a	1.4 \pm 0.3 ^{ab}	2.1 \pm 0.3 ^a	1.01 \pm 0.5 ^{ab}	0.2 \pm 0.2 ^b	0.5 \pm 0.2 ^b
C18:4n3	0.3 \pm 0.1 ^a	0.04 \pm 0.04 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b
C20:4n6	3.9 \pm 0.3 ^b	3.5 \pm 0.3 ^b	4.3 \pm 0.3 ^{ab}	6.9 \pm 1.6 ^a	4.4 \pm 0.7 ^{ab}	6 \pm 0.3 ^{ab}
C20:4n3	0.7 \pm 0.2 ^{ab}	1.2 \pm 0.1 ^a	1.3 \pm 0.07 ^a	0.3 \pm 0.1 ^b	0.3 \pm 0.2 ^b	0.5 \pm 0.2 ^b
C22:4n6	7.7 \pm 2.5 ^a	0.4 \pm 0.2 ^b	0.9 \pm 0.09 ^b	10 \pm 4.5 ^a	12 \pm 4.4 ^{abc}	4.8 \pm 1.6 ^a
C20:5n3	9.7 \pm 0.7 ^{ab}	9.2 \pm 0.8 ^{ab}	9.5 \pm 0.5 ^{ab}	7.6 \pm 1.08 ^b	8.8 \pm 0.6 ^{ab}	10.8 \pm 0.4 ^a
C22:5n3	2.9 \pm 0.3 ^a	2.8 \pm 0.2 ^{ab}	2.9 \pm 0.2 ^{ab}	1.7 \pm 0.3 ^{bc}	1.07 \pm 0.4 ^c	2.5 \pm 0.3 ^{ab}
C22:6n3	28.7 \pm 2.8 ^{ab}	24.9 \pm 1.5 ^{bc}	25.2 \pm 2 ^{bc}	20.3 \pm 2.6 ^c	26.1 \pm 2.4 ^{abc}	34.9 \pm 1.4 ^a
PI	330.48 \pm 13.07 ^{bc}	292.57 \pm 5.56 ^{bc}	329.44 \pm 8.19 ^{bc}	289.9 \pm 12.19 ^c	324.41 \pm 13.43 ^b	399.05 \pm 6.71 ^a

Table 3: Fatty acid groups of membrane phospholipids in yellow perch muscle from each exposure condition (mean \pm SE; n=8). Means with different superscript lowercase letters (9°C) or uppercase letters (28°C) differed significantly as determined by one-way ANOVA ($p \leq 0.05$). The significance of combined effects of temperature and metal exposure as determined by two-way ANOVA is also reported, with F values in bold representing significant effects of temperature, metal exposure (Cd and Ni combined) or their interaction.

	9°C			28°C			Two-way ANOVA		
	Control	Cd	Ni	Control	Cd	Ni	Temperature	Metal	Interaction
SFA	17.7 \pm 0.5 ^b	21.2 \pm 1.02 ^a	21.7 \pm 0.3 ^a	20.6 \pm 1.6 ^A	19.7 \pm 0.8 ^A	20.5 \pm 0.7 ^A	0.9387	0.138	0.0504
MUFA	12.9 \pm 1.2 ^b	20.4 \pm 2.3 ^a	14.6 \pm 0.7 ^{ab}	10.7 \pm 0.4 ^A	11.3 \pm 1.0 ^A	12.2 \pm 2.1 ^A	0.0008	0.0418	0.0498
PUFA	62.0 \pm 1.7 ^a	47.6 \pm 3.03 ^b	52.4 \pm 2.5 ^b	48.2 \pm 4.8 ^B	56.7 \pm 1.4 ^{AB}	63.8 \pm 1.6 ^A	0.3567	0.1409	0.0001
n-3 PUFA	44.4 \pm 3.6 ^a	40.7 \pm 2.6 ^a	41.2 \pm 2.3 ^a	28 \pm 2.1 ^B	36.7 \pm 3.1 ^B	49.6 \pm 1.9 ^A	0.1422	0.0241	0.0023
n-6 PUFA	17.5 \pm 1.3 ^a	8.8 \pm 0.7 ^b	9.3 \pm 0.8 ^b	23.3 \pm 3.5 ^A	19.8 \pm 3.3 ^A	14.5 \pm 1.3 ^A	0.0006	0.0031	0.4361
n-9 PUFA	8.5 \pm 0.5 ^a	7.8 \pm 0.6 ^a	8.7 \pm 0.3 ^a	5.9 \pm 0.6 ^A	6.1 \pm 0.4 ^A	5.9 \pm 0.2 ^A	<.0001	0.7283	0.5534

Table 4: Spearman correlations among fatty acid groups and related indices in yellow perch muscle from the various exposure conditions combined (n=48). Numbers in bold indicate significant correlations. Asterisks denote the significance level of the correlations: *0.05; **0.01; ***0.001.

	SFA	MUFA	PUFA	PI	n-3 PUFA	n-6 PUFA	n-9 PUFA
MUFA	0.0368	1					
PUFA	0.0526	-0.2253	1				
PI	0.0422	-0.2104	0.5819***	1			
n-3 PUFA	0.0105	0.0582	0.6135***	0.3149***	1		
n-6 PUFA	-0.3579	-0.3433**	-0.0737*	-0.0539	-0.5667	1	
n-9 PUFA	0.2531	0.2390***	0.309	0.0757	0.3214*	-0.358	1
Ni	0.0877	-0.1506*	0.365	0.3487	0.4077*	-0.1459	-0.1836
Cd	0.0404	-0.0961	-0.0669*	-0.0553	-0.2596	0.2957	-0.3466***

Table 5: Estimated fatty acid desaturase and elongase activities in yellow perch muscle from each exposure condition (mean \pm SE; n=8; n.c. = not calculated).

	9°C	9°C+Cd	9°C+Ni	28°C	28°C+Cd	28°C+Ni
D9D	3.0 \pm 0.2 ^a	2.7 \pm 0.34 ^a	2.2 \pm 0.3 ^a	1.6 \pm 0.5 ^b	1.4 \pm 0.1 ^b	1.4 \pm 0.1 ^b
D5D	10.1 \pm 0.7 ^a	8.4 \pm 1.6 ^a	7.1 \pm 0.4 ^b	9.5 \pm 2.6 ^{ab}	9.1 \pm 0.4 ^a	14.2 \pm 2.7 ^a
D6D	0.4 \pm 0.1 ^b	0.8 \pm 0.1 ^a	0.7 \pm 0.07 ^a	0.3 \pm 0.2 ^b	n.c	0.9 \pm 0.3 ^a
ELOVL2	1.3 \pm 0.3 ^a	0.09 \pm 0.04 ^b	0.2 \pm 0.02 ^b	0.5 \pm 0.1 ^b	1.6 \pm 0.7 ^a	0.9 \pm 0.3 ^{ab}
ELOVL2'	0.3 \pm 0.02 ^{ab}	0.3 \pm 0.02 ^a	0.3 \pm 0.01 ^{abc}	0.2 \pm 0.03 ^{abc}	0.1 \pm 0.04 ^{bc}	0.2 \pm 0.02 ^c

D9D: Δ 9-desaturase (stearoyl-CoA-desaturase, 18:1n9/18:0); **D5D:** Δ 5-desaturase (20:5n3/20:4n3); **D6D:** Δ 6-desaturase (20:4n3/18:3n3); **ELOVL2:** Elongase 2 (22:4n6/20:4n6); **ELOVL2':** Elongase 2' (22:5n3/20:5n3)

Table 6: Spearman correlations among biometric (CI), biochemical (SOD, CAT, GST, GSH and MDA) variables and kidney Cd and Ni concentrations in yellow perch muscle from the various exposure conditions combined (n=48). Numbers in bold indicate significant correlations. Asterisks denote the significance level of the correlations: *0.05; **0.01; ***0.001.

	SOD	CAT	GPx	GST	GSH	MDA	PI	CI
CAT	-0.4363**	1						
GPx	-0.5281***	0.2268	1					
GST	-0.4737*	0.4121*	0.2043**	1				
GSH	0.6989***	-0.3997**	-0.265*	-0.3697**	1			
MDA	0.1459	-0.0484	-0.2522	-0.0277	0.1132	1		
PI	0.1427	-0.1275	0.1471	-0.3362	0.0504	-0.2557*	1	
CI	-0.1914	0.4615***	-0.2117	0.5337***	-0.3853***	0.2904**	-0.2251	1
Cd	0.6136***	-0.4275***	-0.3068	-0.1411	0.5661***	-0.0818	-0.0553	-0.2317*
Ni	-0.4439**	0.0912	0.5699**	-0.1443	-0.2565*	-0.5349***	0.3487	-0.4663***

Figure legends

Figure 1: Catalase (CAT) activity in yellow perch muscle among exposure conditions. Data expressed as mean \pm SE (n=8). Means with different superscript letters differ significantly ($P \leq 0.05$).

Figure 2: Superoxide dismutase (SOD) activity in yellow perch muscle among exposure conditions. Data expressed as mean \pm SE (n=8). Means with different superscript letters differ significantly ($P \leq 0.05$).

Figure 3: Glutathione peroxidase (GPx) activity in yellow perch muscle among exposure conditions. Data expressed as mean \pm SE (n=8). Means with different superscript letters differ significantly ($P \leq 0.05$).

Figure 4: Glutathione-S-transferase (GST) activity in yellow perch muscle among exposure conditions. Data expressed as mean \pm SE (n=8). Means with different superscript letters differ significantly ($P \leq 0.05$).

Figure 5: Glutathione concentrations (mmol mg^{-1} of protein) in yellow perch muscle among exposure conditions. Data expressed as mean \pm SE (n=8). Means with different superscript letters differ significantly ($P \leq 0.05$).

Figure 6: Lipid peroxidation level expressed as MDA concentration in yellow perch muscle among exposure conditions. Data expressed as mean \pm SE (n=8). Means with different superscript letters differ significantly ($P \leq 0.05$).

Figure 7: Principal component analysis (PCA) of antioxidant defense enzymes activities and lipid peroxidation in yellow perch muscle among the different conditions. Each point represents an individual fish. ● 9°C; ▲ 9°C+Cd; ■ 9°C+Ni; ○ 28°C; △ 28°C+Cd; □ 28°C+Ni.

Figure 1

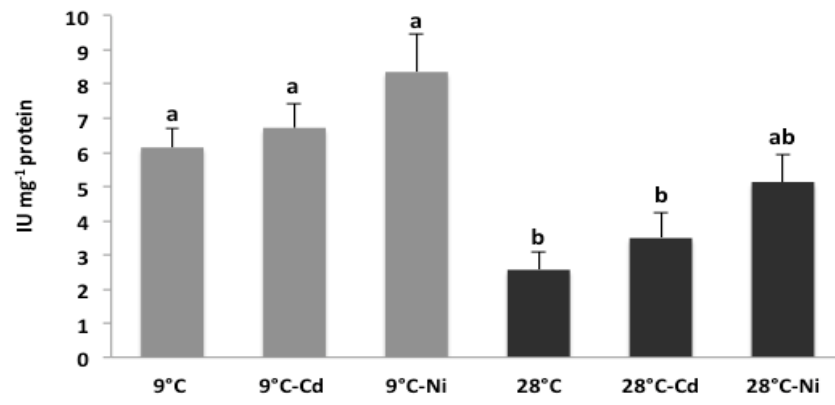


Figure 2

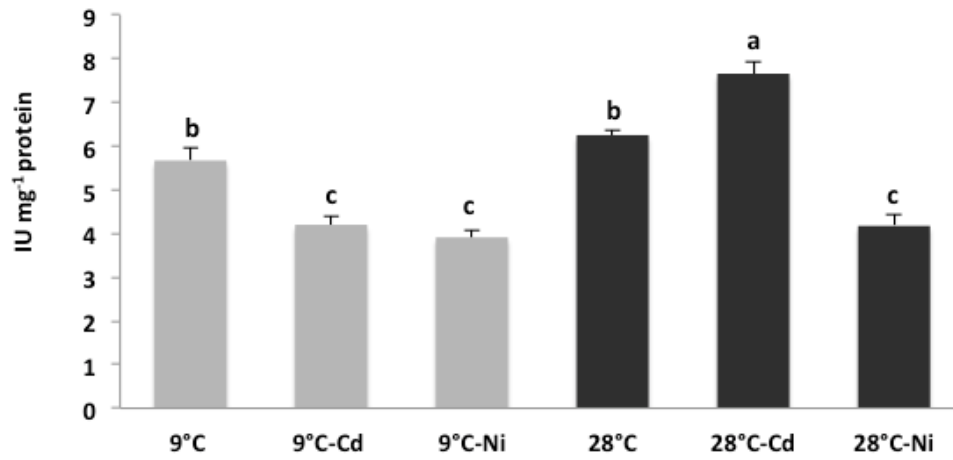


Figure 3

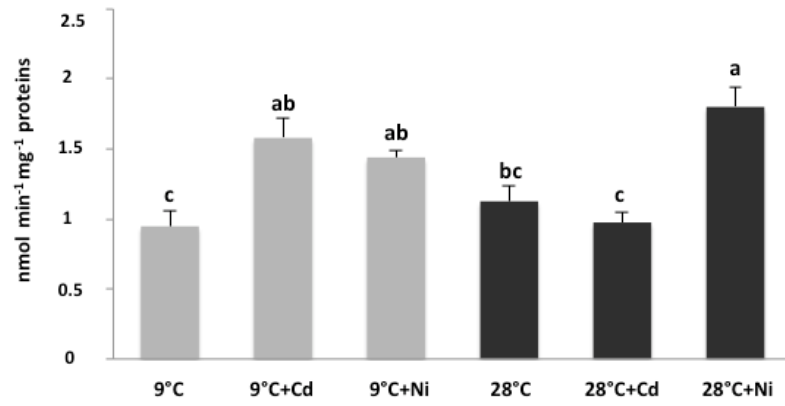


Figure 4

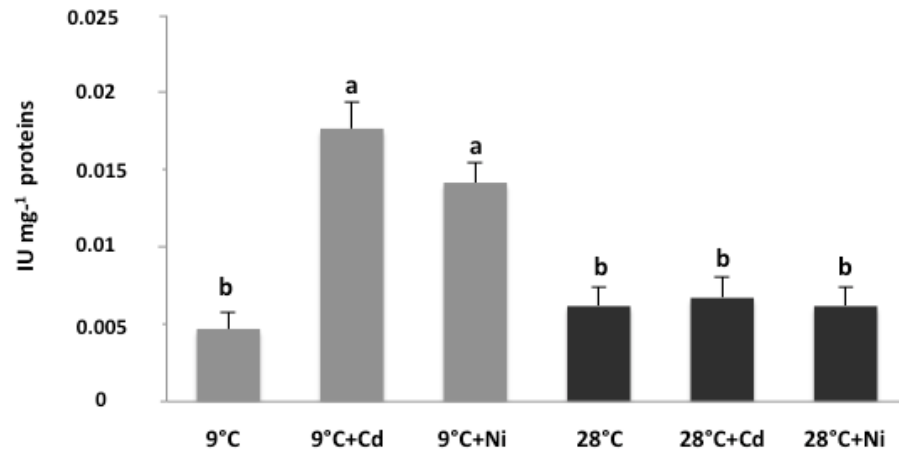


Figure 5

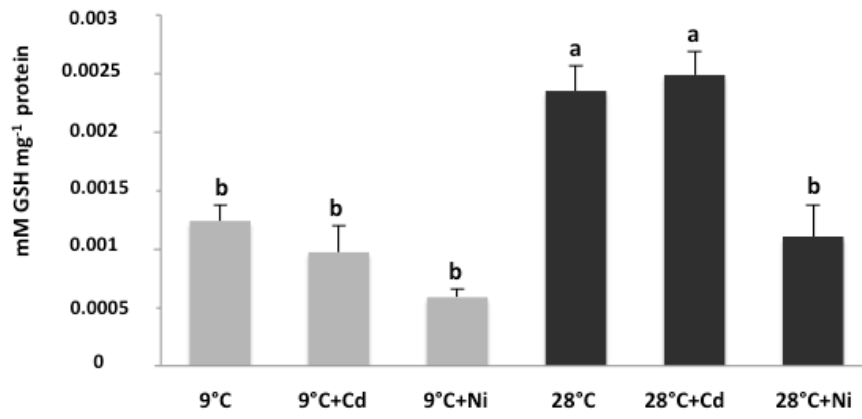


Figure 6

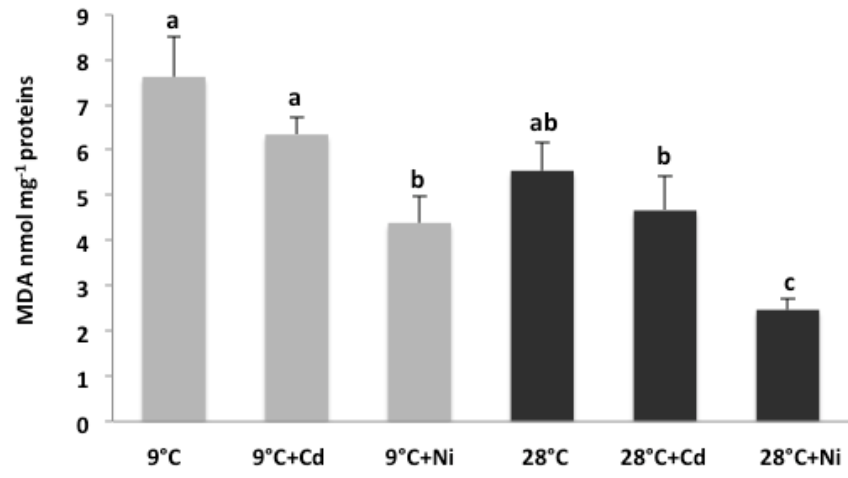
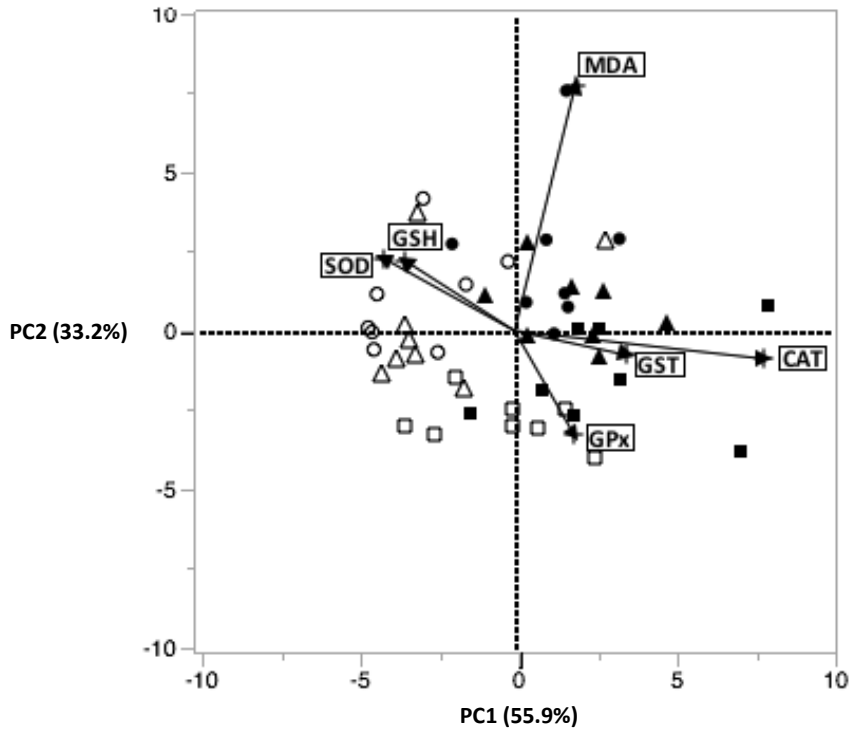


Figure 7



Article 2

Temperature and metal exposure affect membrane fatty acid composition and transcription of desaturases and elongases in fathead minnow muscle and brain

Mariem Fadhlaoui^a, Fabien Pierron^b and Patrice Couture^a

^a Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490, rue de la Couronne, Québec, Québec G1K 9A9, Canada

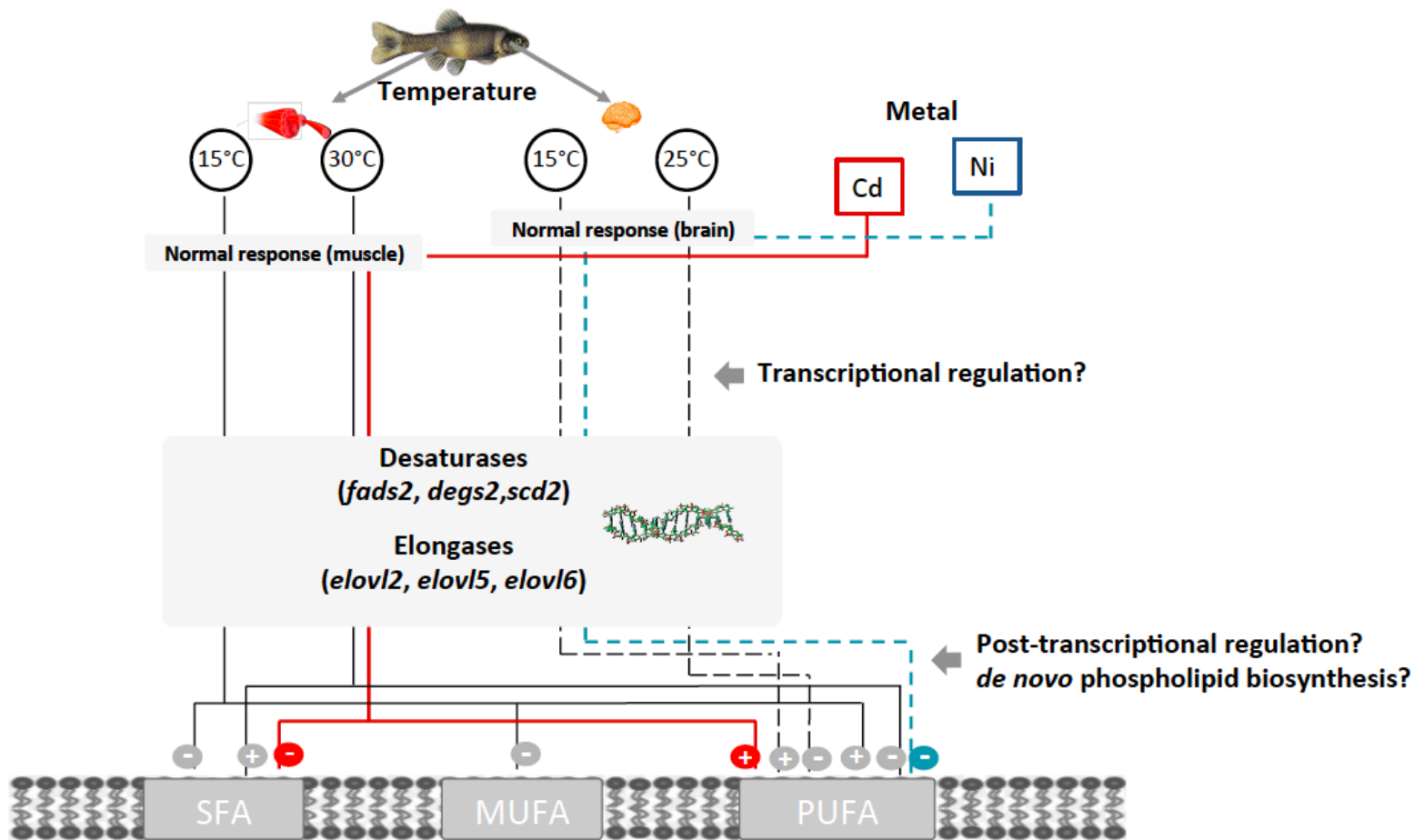
^b Univ. Bordeaux, CNRS, EPOC 5805, Talence, France.

Submitted to Biochim. Biophys. Acta number: BBAMEM-17-65 on February 23th 2017, BBAMEM-17-65.

Abbreviations

ARA	Arachidonic acid
Cd	Cadmium
CI	Condition index
DHA	Docosahexanoic acid
EPA	Eicosapentanoic acid
FA	Fatty acid
FADS	Fatty acid desaturases
HSI	Hepatosomatic index
HVA	Homeoviscous adaptation
LC-PUFA	Long chain polyunsaturated fatty acid
MUFA	Monounsaturated fatty acid
Ni	Nickel
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
SFA	Saturated fatty acid

Graphical abstract



Abstract

In this study, we tested the hypothesis that metal exposure affected the normal thermal response of cell membrane FA composition and of elongase and desaturase gene transcription levels. To this end, muscle and brain membrane FA composition and FA desaturase (*fads2*, *degs2* and *scd2*) and elongase (*elovl2*, *elovl5* and *elovl6*) gene transcription levels were analysed in fathead minnows (*Pimephales promelas*) acclimated for eight weeks to 15, 25 or 30°C exposed or not to cadmium (Cd, 6 µg/l) or nickel (Ni, 450 µg/l). The response of membrane FA composition to temperature variations or metal exposure differed between muscle and brain. In muscle, an increase of temperature induced a decrease of polyunsaturated FA (PUFA) and an increase of saturated FA (SFA) in agreement with the theory of homeoviscous adaptation. Although a similar response was observed in brain between 15 and 25°C, at 30°C, brain membrane unsaturation was higher than predicted. In both tissues, metal exposure affected the normal thermal response of membrane FA composition. The transcription of desaturases and elongases was higher in the brain and varied with acclimation temperature and metal exposure but these variations did not generally reflect changes in membrane FA composition. The mismatch between gene transcription and membrane composition highlights that several levels of control other than gene transcription are involved in adjusting membrane FA composition, including post-transcriptional regulation of elongases and desaturases and *de novo* phospholipid biosynthesis. Our study also reveals that metal exposure affects the mechanisms involved in adjusting cell membrane FA composition in ectotherms.

Key words: fish; cell membranes; temperature; metals; fatty acids; desaturases; elongases

1. Introduction

Cell membranes are highly sensitive to temperature, affecting their physical properties and consequently the functioning of embedded proteins (Hochachka and Somero, 2002). Under cold temperatures, the overall packing order of membrane phospholipids increases, causing a decrease of membrane fluidity. In contrast, an increase of temperature induces phospholipid disorder and enhances fluidity. To counteract temperature effects, poikilotherms remodel membrane phospholipid fatty acid (PLFA) composition, a process known as homeoviscous adaptation (da Costa et al., 2011; Hazel and Williams, 1990b; Sinensky, 1974; Wodtke and Cossins, 1991).

Long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) such as arachidonic acid (ARA, 20:4n-6), eicosapentanoic acid (EPA, 20:5n-3) and decosahexanoic acid (DHA, 22:6n-3) are essential for cell functioning. As major constituents of membrane phospholipids, they control membrane fluidity and influence protein activity and membrane function (Hashimoto et al., 2006; Horrocks and Farooqui, 2004; Stillwell and Wassall, 2003). In addition, DHA and ARA have an important role in neural function and development (Innis et al., 1999; Salem et al., 2001). Two groups of enzymes, desaturases and elongases, are responsible for the regulation of membrane PLFA composition following changes in temperature (Hazel and Livermore, 1990; Trueman et al., 2000). The biosynthesis of LC-PUFA from 18:2n-6 and 18:3n-3 involves desaturases and elongases. Desaturases incorporate double bonds at a specific position of the acyl chain (Guillou et al., 2010) and can be divided into two families: steroyl-CoA desaturases (SCD) and fatty acid desaturases (FADS) (Marquardt et al., 2000). Elongases catalyze the elongation process by inserting 2 carbons at a time (Jakobsson et al., 2006). Recently, a variety of desaturases and elongases involved in the PUFA biosynthetic pathway have been cloned and numerous desaturase families have been identified in marine and freshwater fish species (Tocher et al., 2006; Zheng et al., 2004). The $\Delta 6$ FADS2 desaturase appears to be more common compared to the $\Delta 5$ FADS2 desaturase. Desaturases vary among species. In Atlantic salmon, a unifunctional $\Delta 5$ FADS2 desaturase has been reported, while in zebrafish (*Danio rerio*), rabbitfish (*Siganidae Siganus*) and pike silverside (*Chirostoma*

estor) three bifunctional $\Delta 6/\Delta 5$ FADS2 desaturases have been identified (Fonseca-Madrigal et al., 2014; Hastings et al., 2004). Regarding elongases, the first that has been reported, ELOVL5, was characterised in zebrafish (*Danio rerio*) (Agaba et al., 2004) and subsequently in several other fish species (Agaba et al., 2005; Monroig et al., 2013). As for ELOVL2, to date it has been reported in many species, such as Atlantic salmon, rainbow trout and zebrafish (Gregory and James, 2014; Monroig et al., 2009; Monroig et al., 2013). The extent to which fish can convert 18:2n6 and 18:3n3 to LC-PUFA varies among species and depends on their assemblages of desaturase and elongase enzymes. Palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0) are converted to 16:1n7 and 18:1n9 by SCD, that performs a desaturation at the $\Delta 9$ position of these fatty acids (Guillou et al., 2010). Since they do not possess $\Delta 12$ or $\Delta 15$ desaturases to desaturate 18:1n9 to 18:2n6 (LOA) and then to 18:3n3 (ALA), fish need to acquire these essential fatty acids through food. Then, LOA and ALA are converted to LC-PUFA through a series of enzymatic reactions (Fig. 1). DHA can be synthesized by two pathways. In the first one, often referred to as the “Sprecher shunt pathway”, EPA undergoes two elongations to obtain 24:5n-3 followed by a $\Delta 6$ desaturation and a chain shortening (Sprecher, 2000a). The second one is more direct and it involves $\Delta 4$ desaturation of 22:5n-3 (Li et al., 2010b). It was long considered that vertebrates produced DHA from EPA only via the Sprecher shunt pathway and did not possess a $\Delta 4$ desaturation step, but the existence of an alternative pathway for DHA production from EPA via direct $\Delta 4$ -desaturation has been recently demonstrated (Li et al., 2010b). Once produced, PUFA are incorporated into membrane phospholipids by specific acyltransferases. It appears that freshwater fish have the enzymatic capacity to perform LC-PUFA biosynthesis (Agaba et al., 2005; Hastings et al., 2004; Morais et al., 2009b) while marine fish exhibit low activity of desaturases and elongases such as $\Delta 5$ FADS2 desaturase and ELOVL2 elongase (Morais et al., 2012b; Tocher et al., 2006). This difference may be explained by the higher abundance of LC-PUFA in marine compared to freshwater food webs. In marine ecosystems, the higher availability of LC-PUFA may have induced the loss of biosynthetic capacities for LC-PUFA

in fish, while in contrast their lower availability in freshwater food webs may be the responsible for the persistence of desaturases and elongases (Leaver et al., 2008).

The effects of temperature on metal uptake in aquatic organisms have been abundantly studied and consistently reported to increase with increasing temperature due to metabolic rate increase (Cherkasov et al., 2007; Grasset et al., 2016; Mubiana and Blust, 2007; Nichols and Playle, 2004). Several studies have also investigated the effects of variations in acclimation temperature on cell membrane PUFA composition (Grim et al., 2010; Hazel, 1995; Hazel and Williams, 1990b; Kraffe et al., 2007). However to our knowledge, our previous study on yellow perch (Fadhlaoui and Couture, 2016) was the first to investigate the combined effects of temperature and metal exposure (Cd and Ni) on membrane fatty acid composition. In the present study, we examined the response of cell membrane PLFA to the same stressors in another species of freshwater fish which, in contrast to yellow perch, has a clear preference for warmer water (Hasnain et al., 2010), hence providing an interspecific comparison. The transcription level of genes encoding for desaturases and elongases has been studied in freshwater species in response to temperature acclimation but never to our knowledge in fish exposed to a combination of temperature and metal stresses, a question that is particularly relevant since we have shown in yellow perch that metal exposure modifies the response of cell membrane PLFA to temperature acclimation (Fadhlaoui and Couture, 2016). The objectives of our study are *i)* to provide an interspecific comparison of temperature and metal induced modifications in muscle and brain cell membrane PLFA; *ii)* to investigate the response of gene transcription levels of desaturases (*fads2*, *degs2* and *scd2*, encoding respectively for $\Delta 5/6$ desaturase, $\Delta 4$ desaturase and stearoyl-CoA desaturase ($\Delta 9$ desaturase)) as well as elongases (*elovl2*, *elovl5* and *elovl6*) encoding respectively ELOVL2, ELOVL5 and ELOVL6 to metal exposure and variations in temperature; and *iii)* to investigate the relationships between the cell membrane PLFA composition of different tissues and desaturase and elongase transcription levels.

2. Materials and methods

2.1 Fish and experimental design

Adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) were obtained from Aquatic Research Organisms (ARO, Hampton (NH), USA). In a temperature-controlled room at the INRS-ETE, fish were acclimated for two weeks to laboratory conditions at 25°C with a 16 h light and 8 h dark photoperiod. During this period, fish were fed daily with the same amount of frozen brine shrimp (*Artemia salina*, Ocean Nutrition). After this acclimatization period, 22 fish were placed in each of nine 45L aquaria to start experimental conditions. Temperature was reduced (in 3 aquaria) or raised (in three aquaria) at a rate of 2°C per day to reach a low (15°C) and a high temperature (30°C) while the last three aquaria were maintained at 25°C. For each temperature, one aquarium was used as a control (uncontaminated), a second aquarium was contaminated by Cd and the last with Ni. Physico-chemical parameters (pH, temperature, nitrites and nitrates) were controlled daily. Aquarium water was renewed twice a week with reconstituted water ($[Ca^{2+}]$ 70 μ M, $[Cl^-]$ 129 μ M, $[K^+]$ 12 μ M, $[Mg^{2+}]$ 13 μ M, $[Na^+]$ 179 μ M, $[SO_4^{2-}]$ 63 μ M). When desired temperatures were reached, metal exposure was begun by the addition of Ni or Cd stock solutions to the water of one aquarium at each temperature. Values in Cd aquaria were 5.7 ± 0.35 μ g/L (n=59) and 456 ± 14 (μ g/L) n=59) in Ni aquaria and these concentrations can be found in contaminated environments. Metal concentrations were analysed with ICP-MS after every water change to correct and maintain the desired concentration. At the end of the exposure period (8 weeks), fish were sacrificed by a blow to the head. Biometric measures (length and weight) were taken, then fish were dissected. Six fish were randomly selected for fatty acid analysis in muscle and brain as well as muscle gene transcription. As fathead minnow brain was very small, a second group of six fish was selected to perform gene transcription analysis. For fatty acid analysis, muscle and brain samples were stored at -80°C. For quantitative real time PCR (RT-qPCR) measurements, samples were stored in tubes filled with RNAlater. All procedures on fish were approved

by our institutional animal care committee.

2. 2 Lipid extraction and phospholipid fatty acid analysis

Total lipids were extracted from 100 mg muscle and whole brains according to Folch et al. (1957). The detailed procedure for lipid extraction and membrane fatty acids composition was described in Fadhlaoui and Couture (2016). Total lipids were separated into polar and neutral lipids. The fraction containing polar lipid was then esterified to obtain fatty acid methyl esters (FAME). The resultant FAMEs were analyzed by gas chromatography- flame ionization detector (GC-FID) and the relative FAME content was determined by comparing chromatograms with reference standards (mixtures of 37 fatty acids, NHI-F, fatty acid methyl ester mix, PUFA NO.2, animal source and fatty acid methyl esters kit (Sigma-Aldrich, Canada)).

2. 3 Gene transcription level analyses

In order to obtain the sequences coding for *fads2*, *degs2*, *scd2*, *elovl2*, *elovl5* and *elovl6* in *P. promelas*, we first searched these sequences in the well-described transcriptome of *Danio rerio*. Then, these sequences were blasted against the genome of *P. Promelas* (WGS JNCD01) using Blast algorithm and BioEdit software. The obtained sequences were then blasted against the NR database. For each gene, specific primers were determined from the most conserved regions (Blast results are given in Table 1) using the Primer3plus software.

Total RNA was extracted from muscle and brain using Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions. Tissues were weighed (20 mg muscle and the whole brain) and homogenized in a RNA lysis buffer using a tissue homogenizer (MP Fastprep) for 40s. For each sample, RNA quality was evaluated by electrophoresis on a 1% agarose gel and concentrations as well as purity were determined by spectrophotometry (Nanodrop 8000). Then, first-stand cDNA was synthesised from 400 ng of total brain or muscle RNA using GoScript Reverse

Transcription System (Promega) according to manufacturer's instructions. Following the reverse transcriptase reaction, cDNA was diluted 6-fold for the muscle and 10-fold for the brain. Real-time PCR reactions were then performed in an MX3000P (Stratagene; 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 30 s and 72°C for 30 s). Each 20 µL reaction contained 12.5 µL of GoTaq qPCR master mix (Promega), 5 µL template and the specific primer pairs at a final concentration of 250 nM each. The reaction specificity was determined for each reaction by gel electrophoresis and from the dissociation curve of the PCR product. This was obtained by following the SyberGreen fluorescence level during a gradual heating of the PCR products from 60 to 95 °C. Amplification efficiencies for all primer sets were calculated; all values proved to be sufficient to allow direct comparison of amplification plots according to the $\Delta\Delta C_t$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Relative quantification of gene expression was achieved by concurrent amplification of the *β -actin* endogenous control. Hence, during our experiment, total RNAs were quantified and 400 ng was used to be reverse-transcribed. During the subsequent qPCR amplifications, the output cycle corresponding to the *β -actin* was examined. No significant difference was observed on the output cycle of *β -actin* among fish groups ($p > 0.05$), demonstrating the relevance of *β -actin* as reference gene.

2.4 Muscle and brain metal analyses

Metal quantification was performed on the same samples used for fatty acid analysis and gene transcription in the muscle, while in the brain metal analysis was only performed on the samples used for gene expression. Samples were lyophilised in acid-washed (HNO₃) Eppendorf tubes. Certified reference material (TORT-2 from National Research Council of Canada) as well as blanks were also analyzed to assess analytical accuracy and recovery rates. After lyophilisation, samples were weighed and digested in trace metal grade nitric acid (100 µl/mg dry sample) over 2 days at room temperature, followed by 24h in trace metal grade hydrogen peroxide (40 µl/mg dry sample) and finally diluted in ultrapure water. The concentrations of Cd and Ni were determined

using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Thermo Elemental, Model X-7).

2.5 Calculation of indices and statistical analysis

The indices were calculated according to following formulae:

Condition index (**CI**) = $[\text{Weight (g)} / (\text{Fish length (mm)})^3] \times 100$.

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

The Unsaturation Index (UI) is the sum of the % unsaturated fatty acids multiplied by their number of double bonds (= $\Sigma\text{MUFA} + \Sigma\text{UFAx2} + \Sigma\text{3UFAx3} + \Sigma\text{4UFAx4} + \Sigma\text{5UFAx5} + \Sigma\text{6UFAx6}$). Data were expressed as mean \pm SEM (n = 6).

Comparisons among mean values from different stressor combinations were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), after checking assumptions of normality (Kolmogorov-Smirnov) and homoscedasticity of the error terms (Levene). When the assumptions were not met as deduced from ad-hoc tests, a Wilcoxon / Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test was applied. If significant effects were detected, the Tukey-Kramer HSD was used to determine whether means between pairs of samples were significantly different from one another. Subsequently, Spearman correlations were carried out to investigate correlations among the various parameters monitored. The interactions of temperature and Cd on membrane fatty acid composition as well as desaturase and elongase transcription levels were determined by two-way ANOVA. Statistical analyses were made with JMP 11.0.0 (SAS Institute Inc.).

3. Results

3.1 Fish condition

No mortality was observed in Cd-exposed fish. However, Ni addition induced 100% mortality in the warmer aquaria (25°C and 30°C). Therefore, in this paper, we discuss the interaction of temperature and metals only for Cd and the comparison of Ni vs. Cd

effects was performed only for cold-acclimated fish (15°C).

The condition index (CI) was higher in fish acclimated to 15°C compared to fish acclimated at the warmer temperature (Fig. 2). While Cd exposure had no influence on fish condition at the warmer temperatures, at 15°C the condition of Cd-exposed fish was higher than for controls. The HSI was also negatively impacted by increasing temperature, with higher values in control fish at 15°C compared to 25°C and 30°C, but it was not affected either by Cd or Ni (Fig. 3). Both HSI and CI were positively correlated in all fish pooled (Spearman coefficient= 0.71, $p < 0.001$, $n = 42$).

3. 2 Tissue metal concentrations

The concentration of Cd in muscle showed a significant increase in warm-acclimated, Cd-exposed fish, and was higher at 30°C compared to 25°C. At 15°C, exposure to Cd did not lead to a significant accumulation of the metal in muscle (Fig. 4 A). However, in brain, Cd concentration increased only at 25°C and no significant accumulation was measured at 15°C or 30°C compared to controls (Fig. 4 B). In both muscle and brain, a significant accumulation of Ni was observed in fish exposed to that metal at 15°C (Fig. 4 C-D). Surprisingly, Cd exposure also led to an increase of muscle Ni concentrations at all temperatures tested compared to controls, although the increase was not significant for fish acclimated to 30°C compared to controls at the same temperature.

3. 3 Membrane fatty acid composition in muscle and brain

Muscle membranes of cold-acclimated fish were richer in PUFA (specifically n-3 PUFA) and poorer in SFA than in warm-acclimated fish at 30°C (Tables 2 and 3). However, the difference between fish at 15°C and 25°C was not significant and membrane PLFA were similar. The ratio of unsaturated to saturated fatty acids varied with temperature and was higher in cold-acclimated fish. The percentage of DHA (22:6n-3) and EPA (20:5n-3) decreased at 30°C but was unchanged at 25°C compared to 15°C (Table 2). Exposure to either Ni or Cd at 15°C or to Cd at 25°C did not lead to noteworthy

effects on membrane PLFA composition (Table 2). However, at the highest temperature, SFA decreased and PUFA increased significantly in Cd-exposed fish, mainly due to a sharp decrease in 22:6n-3 (Table 2). In this condition, membrane composition was similar to that of fish acclimated at the colder temperatures (Tables 2 and 3). The two-way ANOVA showed that SFA, PUFA, U/S ratio n-3 PUFA and DHA were significantly affected by the interaction of temperature and Cd exposure (Table 4).

In brain tissue, membrane composition was not strongly different in fish acclimated to 15°C compared to 30°C (Tables 6 and 7), except for MUFA that increased at 30°C. Between 15°C and 25°C the DBI, PUFA, DHA and EPA decreased significantly (Tables 6 and 7). Brain membrane FA proved to be rather rich in MUFA. In addition, they displayed high levels of n-9 UFA (between 24 and 34% of total fatty acids), mostly due to an elevated percentage of 18:1n9, compared to muscle membranes, in which n-9 UFA did not exceed 19% of the total fatty acids. The two-way ANOVA showed that in the brain, all FA groups were affected by temperature, but none were affected by Cd alone. Nonetheless, a significant interaction of Cd and temperature was observed on SFA, MUFA (and specifically n-9 UFA) and the U/S ratio (Table 4).

3. 4 Desaturase and elongase transcription levels

The transcription level of genes of both desaturases and elongases was different between muscle and brain tissues. In the muscle, desaturase and elongase transcription levels were different among exposure conditions (Figs. 5 and 6), but did not clearly respond to changes in acclimation temperature or metal exposure. Specifically, *fads2* was maintained at the same level under 15°C and 25°C in the presence or absence of Cd or Ni. However, under Cd exposure at 30°C, *fads 2* transcription level decreased significantly (Fig. 5A). The transcription level of *degs2* increased notably at 15°C under Ni exposure (Fig. 5B), while *scd2* presented the same transcription level independently of temperature changes but it decreased significantly at 30°C in Cd-exposed fish (Fig. 5C). The transcription level of *elovl2* was not affected at all by temperature or metal exposure while that of *elovl5* increased slightly at 30°C compared to 15°C in control fish

and was strongly stimulated in metal-exposed fish acclimated at the colder temperature (Fig. 6B) and *elov16* decreased significantly under Cd exposure in warm-acclimated fish (Fig. 6C). The two-way ANOVA detected a significant interaction of Cd and temperature on *fads2*, *scd2*, *elov15* and *elov16* in the muscle (Table 5).

Brain desaturase transcription levels were consistently higher at low temperature but their response to metal exposure varied. Specifically, *fads2* transcription level was nearly twice higher at 15°C compared to 25°C and 30°C and stimulated by Cd, but at 25°C only (Fig. 7A). The same trend of thermal response was observed for *degs2*, with a higher transcription level at 15°C than at warmer conditions. However, in contrast to *fads2*, it was down-regulated by Cd at 15°C (fig. 7B). Finally, the *scd2* transcription level was not significantly affected by metal exposure although Ni exposure at 15°C and Cd exposure at all tested acclimation temperatures tended to decrease it (Fig. 7C). The transcription of two of the three elongase genes examined, *elov12* and *elov15*, decreased with increasing acclimation temperature. At 15°C, under Cd exposure, *elov12* decreased while it increased in Ni-exposed fish and reached the highest values of all experimental conditions (Fig. 8A). Metal exposure did not affect *elov15* transcription level (Fig. 8B). The transcription level of *elov16* was not affected by either by temperature or metal exposure (Fig. 8C). The two-way ANOVA detected a significant interaction of Cd and temperature on *fads2* and *elovs2* (Table 5).

4. Discussion

4.1 Temperature effects on Cd accumulation

The greater Cd accumulation in the muscle of warm acclimated fish may be explained by the elevated metabolic rate at high temperature. Among factors that affect metal uptake, ventilation rate and ionoregulatory processes have been reported to increase with temperature (Massabuau and Tran, 2003; Wang et al., 2005). In the brain, Cd accumulation did not follow the same trend as observed in muscle and increased only at 25°C. Metals can be transported by the blood and cross the blood-brain barrier

to enter into the brain (Rouleau et al., 2003). In cold-exposed fish, blood flow can be reduced, to slow down the cooling of brain in order to maintain cerebral activities (van den Burg et al., 2005). It is likely that the lower brain Cd concentrations at 30°C compared to 25°C also results from a reduction of brain irrigation, however this mechanism remains to be investigated.

4. 2 Effects of temperature and metals on morphometric indices

An increase in temperature from 15°C to 25°C and 30°C negatively affected both the CI and the HSI of our fathead minnows, consistent with a previous study on the same species (Lapointe et al., 2011) and also supported by Grasset et al. (2014) for yellow perch. The absence of effects of Cd accumulation on either of the two condition indicators also agree with our previous study Fadhlaoui and Couture (2016) as well as that of Grasset et al. (2016) in yellow perch. In fathead minnows, combined exposure to heat stress and aqueous or dietary Cu exposure did not affect fish condition more than heat stress alone (Lapointe et al., 2011). Hence, in both species, heat stress has much greater effect on indicators of energy storage than metal exposure at environmentally relevant concentrations. Nickel did not affect either condition indicators at 15°C. However, we cannot rule out that exposure to Ni, combined to heat stress, led to a critical reduction of fish condition and the massive mortality observed at 25 and 30°C. Hasnain et al. (2010) have reported an upper lethal temperature of 31.3°C for fathead minnows (upper incipient lethal temperature, or UILT; temperature at which 50% mortality occurs in a population). Our study suggests that Ni, but not Cd, reduces the UILT in fathead minnows. Regarding the higher values of HSI that we observed at the lower temperature, others have suggested that an increase of liver size may be an adaptive response to compensate the decrease in enzyme activities (Kent et al., 1988; Seddon, 1997; Weber and Bosworth, 2005). Given the positive correlation between HSI and CI, our study suggests that 15°C is an optimal temperature for fathead minnow growth.

In our previous study (Fadhlaoui and Couture, 2016), we performed a similar experiment using yellow perch, a fish considered as eurythermal and tolerant to a wide range of contaminants including Cd and Ni (Couture et al., 2015; Eastwood and Couture, 2002; Rajotte and Couture, 2002).

Perch were exposed to the aqueous concentrations of Cd and Ni used in this study for seven weeks (compared to eight weeks in this study for fathead minnows) at either 9°C or 28°C. Yet, in spite of the upper temperature exceeding the UILT of 25.5°C reported by Hasnain et al. (2010) for yellow perch, metal exposure did not induce mortality. Our combined studies confirm experimentally that yellow perch are more tolerant to Ni than fathead minnows at elevated temperatures, but their experimental design does not illuminate their respective tolerance to aqueous Cd or heat stress, alone or in combination.

4.3 Effects of temperature and metals on membrane fatty acids

Although exposure to both 25°C and 30°C negatively impacted the condition of fathead minnows, the fatty acid composition of their muscle only differed at the highest temperature tested, with substantial decreases in LC-PUFA and an enrichment in SFA in muscle PLFA of fish acclimated at 30°C compared to 15°C. This thermal response of fathead minnow muscle membrane PLFA, largely driven by changes in the proportion of DHA, was similar to our observations for yellow perch (Fadhlaoui and Couture 2016) and consistent with the theory of HVA.

Even though in our experiment, exposure to Ni, but not Cd, at 15°C led to a substantial increase in muscle concentrations of the metal, neither metal affected muscle membrane PLFA composition, except for a sharp decrease of 20:4n-6 in Ni-exposed fish. Interestingly, in yellow perch, exposure to both metals at the colder temperature tested (9°C) also induced a sharp decrease in n-6 PUFA, although in that species 22:4n-6 instead of 20:4n-6 was reduced (Fadhlaoui and Couture, 2016), suggesting a common mechanism of action since both fatty acids belong to the same biosynthetic pathway. Interestingly, in our experiment with fathead minnows, all n-6

PUFA except 18:2n6 were decreased in Ni-exposed fish, including 20:2n-6, 20:3n6, 20:4n-6 and 22:4n6. Our observation that 18:2n6 was higher in Ni-exposed fish suggests an inhibition of the n-6 elongase and desaturase pathways. Compared to yellow perch in which SFA, MUFA and PUFA were modified by metal exposure, the overall response of fathead minnow muscle PLFA to metal exposure at low temperature remained modest. The mechanisms involved in metal-induced modifications of cell membrane PLFA may be more sensitive in yellow perch than in fathead minnows at colder temperatures. However, since here, the coldest temperature was 15°C, we cannot exclude that the response of fathead minnows to metal exposure at 9°C may have been similar to the response of yellow perch.

Exposing fathead minnows to Cd strongly modified the response of muscle cell membrane PLFA composition to increasing temperatures, as highlighted by significant interactions between the two stressors on SFA and PUFA in general, and n-3 PUFA in particular. Much like we reported earlier for yellow perch, the heat-induced decrease in PUFA observed in control fish at 30°C was counteracted by Cd. However, in fathead minnows the Cd-induced increase in membrane polyunsaturation was subtler than for perch. While in perch exposure to Cd at 28°C resulted in an extent of muscle membrane PLFA polyunsaturation comparable to fish acclimated 19°C lower, exposing fathead minnows acclimated to 30°C to Cd made their muscle membrane PLFA comparable to control fish acclimated at 15 and 25°C. Given the mortality that resulted from combining elevated temperatures and aqueous Ni exposure in fathead minnows in our study, we do not know whether Ni interfered more strongly than Cd with the temperature-induced adjustments of muscle membrane PLFA, although we can hypothesize this to be the case since in perch, the interference of Ni was even stronger than for Cd (Fadhlaoui and Couture 2016). To our knowledge, there is no report in the literature other than our own studies about metal effects on cell membrane composition and its thermal response in fish or any other organism.

The decrease in SFA in the muscle of fish acclimated at 30°C when exposed to Cd was mainly due to the total inhibition of the sharp increase in 16:0 observed in control

fish at that temperature. While the % composition of 16:0 remained between 12 and 15% in all other temperature and metal exposure scenarios examined, it reached 30% in control fish acclimated at 30°C, suggesting a normal thermal acclimation response for the species. Fatty acid synthase (FAS) is a rate-limiting enzyme in the *de novo* biosynthesis of fatty acids that catalyzes the reaction leading to palmitic acid (16:0) synthesis (Smith et al., 2003). Previous studies on Cd-exposed crabs have reported an impairment of lipid metabolism involving a decrease of FAS activity (Liu et al., 2016; Yang et al., 2013). We therefore hypothesize that the observed inhibition of SFA synthesis in the muscle of Cd-exposed fathead minnows acclimated to 30°C may be related to a Cd-induced inhibition of FAS, accentuated by the rise of temperature which stimulated the accumulation of this metal.

Fathead minnow brain cell membrane PLFA generally differed from muscle, with higher proportions of MUFA, especially oleic acid (18:1n-9) in the former, and they responded more subtly to changes in acclimation temperature and metal exposure. In contrast to muscle for which changes in membrane PLFA were maximal at the extremes of the acclimation temperature spectrum, in the brain, the increase of PUFA in response to elevated temperature was only observed between 15°C and 25°C. The reversal of the trend when further increasing temperature to 30°C suggests an impairment of the normal response to thermal acclimation. Interestingly, Buda et al. (1994) reported that the brain cell membrane PLFA from *Cyprinus carpio* acclimated to temperatures 20°C apart (23°C-25°C vs. 5°C), did not change their composition, but they did not examine an intermediate temperature as we did in our study. (Farkas et al., 2000) demonstrated that the composition of cold-water fish brain was characterized by an abundance of DHA (mainly 18:1/22:6 phosphatidylethanolamine), but that its level decreased with an increase of temperature, as we also observed between 15 and 25°C. Also in agreement with our study for fathead minnows, cold adaptation in various teleost species has been reported to be accompanied by higher proportions of PUFA in brain membranes, while MUFA remained constant (Logue et al., 2000). Several studies have shown that cell membrane functions depending on viscosity are disrupted at high temperatures (Cossins

and Prosser, 1978; Friedlander et al., 1976). We hypothesize that for fathead minnows, 30°C represented a critical temperature forcing fish to make adjustments to their brain cell membrane PLFA in order to maintain membrane-associated cerebral functions that are influenced by membrane fluidity. Indeed, in their experiment in which Buda et al. (1994) acclimated *Cyprinus carpio* to two extreme temperatures 20°C apart, they also hypothesized that the absence of modifications in the proportions of highly polyunsaturated fatty acids such as DHA in their brains involved other mechanisms aiming at maintaining cerebral properties.

Although, like our observations for muscle, Cd exposure did not affect brain cell membrane PLFA at 15°C, the significant decrease in 22:6n-3 in Ni-exposed fish points to a substantial difference in the modes of action of this metal between the two tissues examined, since in muscle, Ni did not affect n-3 FA but induced a reduction of n-6 FA. Considering the increase of the minor FA 18:4n-3 accompanied by a decrease of 22:6n-3, Ni exposure appears to induce an alteration of n-3 PUFA biosynthesis in the brain of cold-acclimated fish. Since neither 20:5n-3 nor 22:5n-3 were affected by Ni exposure, our data suggests that the activity of $\Delta 4$ desaturases was affected by the presence of Ni.

In spite of the substantial accumulation of Cd in the brain of fish acclimated to 25°C, cell membrane PLFA general characteristics like the DBI and PUFA percentages were not affected by Cd. Yet, there was a substantial decrease in 16:0 and in the shorter chain n-9 17:1n-9, while longer chained n-9 18:1n-9, 20:1n9 and 24:1n9 increased, resulting in an overall increase of n-9 UFA. We do not know whether Cd specifically induced decreases in 16:0 or increases in n-9 FA in brain, although we hypothesized for muscle (above) that Cd may inhibit FAS leading to a decrease of 16:0. Regardless, our results suggest that although Cd induced changes in brain cell membrane composition through some yet unknown mechanism, decreases in some FAs were compensated by increases in others, presumably in order to maintain membrane properties and function. Interestingly, in contrast to what we observed in muscle, even in the absence of a significant Cd accumulation in the brain of fish acclimated at 30°C, the substantial decrease in SFA

observed in control fish was reversed in Cd-exposed fish, due to increases in several SFA, yielding U/S ratios comparable to those of fish acclimated to lower temperatures, in the presence or absence of metals. Intriguingly, the effect of Cd observed at 25°C on SFA was the opposite of what was observed in fish acclimated 5°C warmer. Hence, even though fathead minnows appear capable of maintaining the overall PLFA composition of their brain cell membranes much more efficiently than for their muscle, temperature, Cd and their interaction interfere substantially with SFA and n-9 MUFA. Given the lack of Cd accumulation in the brain of fish acclimated to 30°C, we cannot suggest that the observed changes are due to direct interactions of Cd with membrane PLFA. We can therefore hypothesize that Cd-induced changes in brain membrane PLFA are at least in part due to the interference of this metal with lipogenic processes in other tissues, involved in the production of fatty acids destined for incorporation in brain phospholipids.

4. 4 Relationships between membrane fatty acid and the transcription of desaturases and elongases

In fathead minnow muscle, a decrease of acclimation temperature did not affect desaturase and elongase transcription levels except for *elov15* that was slightly lower in fish acclimated at 15°C compared to 30°C. Hence, the substantial temperature-induced modifications of muscle membrane PLFA composition, including an increase in PUFA in cold-acclimated fish, were not reflected by the transcription levels of genes involved in controlling its composition. Previous studies have reported an induction of desaturase transcription and activity in fish during cold acclimation to restore membrane fluidity (Hsieh and Kuo, 2005; Tiku et al., 1996; Wodtke and Cossins, 1991). Given the absence of response at the transcriptional level in our study, the increase in PUFA in the muscle of cold-exposed fish may be related to the activation of latent enzymes, as reported by others (Tiku et al., 1996; Trueman et al., 2000). In these studies fish acclimation was brief compared to our study. Therefore, it is possible that in our study desaturases genes initially responded to temperature decrease before returning to basal levels at

the end of exposure. Yet, future studies should investigate the time course of the transcriptomic response during thermal acclimation.

Exposure to Ni at 15°C affected the transcription level of genes, but in an opposite direction compared to changes in membrane composition, which, as discussed in Section 4.3, suggested an inhibition of n-6 biosynthetic pathway. In our study, this pathway included the genes *fads2*, *degs2*, *elovl2* and *elovl5*, also shared by the n-3 biosynthetic pathway. In Ni-exposed fish, *degs2* transcription level was the highest, but the corresponding product of this $\Delta 4$ desaturase in the n-3 pathway, DHA, was not modified compared to control fish. Likewise, *elovl5* was induced under Ni exposure, yet, n-6 PUFA, mainly 20:4n-6 and 22:4n-6, decreased, while 22:5n-3 was unaffected by Ni exposure. Clearly, the upregulation of these genes in Ni-exposed fish did not lead to an enhancement of the products of their pathways, but suggests that Ni inhibited the desaturase and elongase enzymes for which they encode. These increases in gene transcription levels would suggest a compensatory mechanism.

In contrast to our observations in fish acclimated at 15°C, for which Cd exposure did not affect gene transcription level except for an enhancement of *elovl5*, in Cd-exposed fish acclimated at 30°C, *fads2*, *degs2*, *scd2* and *elovl6* decreased significantly compared to control fish, in contradiction with the sharp increase in PUFA and DBI in Cd-exposed fish. Since elongases and desaturases are responsible for modifications in cell membrane PUFA concentrations and DBI, if the transcription of their genes was downregulated in Cd-exposed fish, this suggests that their activity was upregulated, through some unknown mechanism. Nevertheless, we have to consider that the regulation of membrane lipid composition also involves adjustments of FA incorporation into membrane PL, membrane turnover and PL formation by acylation re-acylation cycles (Hazel, 1984). During the membrane turnover process, FA may be incorporated into membrane PL by direct acylation of lysophosphate (Van Den Bosch, 1980). Therefore, in Cd-exposed fish at warm temperatures, the increase in PUFA may also involve a stimulation of these re-acylation processes.

In the brain of our fathead minnows, the transcription levels of desaturases and elongases appeared much greater than in muscle. Aliyu-Paiko et al. (2013), evaluating the transcription of these enzymes in different tissues of *Channa striata*, have also shown that their levels were higher in the brain and liver compared to muscle. Others have also reported that desaturases (Tocher et al., 2006; Zheng et al., 2004) and elongases (Carmona-Antonanzas et al., 2011; Xue et al., 2014) were highly expressed in brain tissue. Higher transcription of desaturases and elongases in the brain highlight their important role in cerebral tissue, particularly for DHA and EPA. As mentioned earlier (section 4.3), brain membrane PL contained a greater amount of MUFA compared to muscle, dominated mainly by oleic acid (18:1n-9). This fatty acid is synthesised through a desaturation of stearic acid (18:0) by the $\Delta 9$ desaturase encoded by *scd2*, which in our study was higher in brain compared to muscle. This molecular species is important in brain to control the biophysical properties of membranes under temperature variations. The presence of 18:1n-9 in the sn-1 position of phospholipids increases their surface area compared to the combination 18:0/22:6n-3 (Zabelinskii et al., 1995) and decreases consequently the electrostatic interaction between head group regions (Michaelson et al., 1974). The rate of synaptic fusion rate depends on PLFA composition. A high ratio of 18:1n-9/22:6n-3 improves fusion and assists in maintaining signal transduction at low temperature. Like for 18:1n-9, DHA-containing PL in the brain are important for signal transduction and information processing (Farkas et al., 2000). Moreover, in our study, a long-chain fatty acid, 24:1n-9, was more abundant in brain membrane compared to muscle as reported by others (Bell and Tocher, 1989; Tocher and Harvie, 1988). This fatty acid is an elongation product of oleic acid (18:1n-9), which is itself a desaturation product of 18:0 (Thomassen et al., 1985) and is essential for different cerebral functions.

In the brain of our fish, the transcription of desaturases (*fads2* and *degs2*) and elongases (*elov5*) showed a substantial decrease in 25°C-acclimated fish compared to cold acclimated-fish. This decrease was consistent with the modifications of membrane composition as described earlier (section 4.3). Previous studies examining temperature

effects on transcription levels of these genes have reported that stearoyl-CoA desaturase plays an important role in the metabolism of membrane fatty acids aiming at regulating membrane fluidity following temperature fluctuations (Tiku et al., 1996; Trueman et al., 2000). Furthermore, the transcription level of *scd2* desaturase (Hsieh and Kuo, 2005; Tiku et al., 1996a; Trueman et al., 2000; Xu et al., 2015) and elongase (Mellery et al., 2016; Norambuena et al., 2015; Ren et al., 2013) were reported to be up-regulated under cold temperature in different species, in agreement with our study.

In our fathead minnows exposed to 30°C, the transcription of brain desaturases (*fads2*, *degs2* and *scd2*) and elongases (*elovl6* and *elovl5*) decreased, according to normal response to temperature increase. Surprisingly membrane structure did not correspond to the observed variations in transcription and their fatty acid composition was almost similar to that of cold exposed-fish, especially in relation to SFA, PUFA and BDI, suggesting that post-transcriptional and *de novo* phospholipid biosynthetic mechanisms acted to prevent a decrease in brain membrane unsaturation following acclimation to this extreme temperature. The high level of PUFA observed in these fish in spite of the decrease of desaturase and elongase transcription levels likely reflects their critical importance in the function of neural tissue, discussed above.

Metal exposure modified the transcription levels of desaturases and elongases in the brain of our fish. In cold exposed fish, *degs2* and *elovl2* decreased under Cd exposure without leading to modifications in membrane FA composition. In Ni-exposed fish, *elovl2* transcription was induced, while in contrast PUFA, particularly n-3 PUFA, decreased significantly, suggesting that the upregulation of elongases aimed at counteracting Ni-induced effects on brain membrane PUFA. It has been demonstrated that *elovl2* and *elovl5* are regulated by sterol regulatory element binding protein (SREBP) transcription factors (Qin et al., 2009). Studies on Atlantic salmon have shown that the expression of SREBP was affected by modifications of PUFA content (Minghetti et al., 2011; Morais et al., 2009b; Zheng et al., 2005). Thus, we suggest that the increase of *elovl2* under Ni exposure was regulated by a positive feedback loop in response to a

decrease of PUFA, in an attempt to increase n-3 PUFA, especially DHA that was significantly reduced in Ni-exposed fish.

Exposure to Cd did not affect the transcription levels of elongases or desaturases in fish acclimated to the warmer temperatures, except for *fads2* which was induced by Cd at 25°C. Brain membrane composition however did not reflect the changes in *fads2* transcription level since the main products of the $\Delta 5/\Delta 6$ desaturases (DHA, EPA and ARA) were unchanged. In partial support of our study, Cd has been reported to induce $\Delta 6$ desaturase activity in rat (Kudo and Waku, 1996), although $\Delta 9$ desaturase (*scd2*) activity decreased. Their study examined enzyme activity and not gene transcription level, so a direct comparison with our study is risky. To our knowledge, only one study examined Cd effects on fish brain desaturase transcription levels. The authors reported that Cd induced the transcription of $\Delta 9$ desaturase (Balla and Hermes, 2009), contrary to our study in which brain *scd2* transcription levels were not affected by metal exposure.

In conclusion, our study indicates that temperature acclimation affected muscle and brain PLFA differently. In muscle, temperature-induced changes in membrane composition agreed with the HVA theory in contrast to the brain, which was more unsaturated than predicted at the highest acclimation temperature. Desaturase and elongase transcription was higher in the brain, in agreement with the high level of MUFA and PUFA in these membranes and the important role that LC-PUFA play in cerebral functions. Metal exposure modified the normal response to temperature, inducing major modifications of membrane PLFA through some yet unknown mechanism. Temperature and metal induced modifications in desaturase and elongase transcription levels did not systematically correspond to the observed changes in membrane PFLA, suggesting that post-transcriptional regulation of elongases and desaturases as well as other membrane biosynthetic processes may be involved.

References

- Agaba, M., Tocher, D.R., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A.J., 2004. Zebrafish cDNA encoding multifunctional Fatty Acid elongase involved in production of eicosapentaenoic (20:5n-3) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids. *Mar Biotechnol* (NY) 6, 251-261.
- Agaba, M.K., Tocher, D.R., Zheng, X., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A.J., 2005. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 142, 342-352.
- Aliyu-Paiko, M., Jaya-Ram, A., Chong, A.S.C., Hashim, R., Amuzat Aliyu, O., 2013. Estimation of Tissue Distribution of mRNA Transcripts for Desaturase and Elongase Enzymes in *Channa striata* (Bloch, 1793) Fingerlings using PCR Technique. *Taiwania* 58, 12–118.
- Balla, B., Hermes, E., 2009. Isoform specific expression of $\Delta 9$ desaturases in two brain regions of common carp. *Acta Biologica Szegediensis*, 53, 29-33.
- Bell, M.V., Tocher, D.R., 1989. Molecular species composition of the major phospholipids in brain and retina from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Occurrence of high levels of di-(n-3)polyunsaturated fatty acid species. *Biochem J* 264, 909-915.
- Buda, C., Dey, I., Balogh, N., Horvath, L.I., Maderspach, K., Juhasz, M., Yeo, Y.K., Farkas, T., 1994. Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8234-8238.
- Carmona-Antonanzas, G., Monroig, O., Dick, J.R., Davie, A., Tocher, D.R., 2011. Biosynthesis of very long-chain fatty acids (C>24) in Atlantic salmon: cloning, functional characterisation, and tissue distribution of an Elovl4 elongase. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 159, 122-129.
- Cherkasov, A.S., Grewal, S., Sokolova, I.M., 2007. Combined effects of temperature and cadmium exposure on haemocyte apoptosis and cadmium accumulation in the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J Therm Biol* 32.
- Cossins, A.R., Prosser, C.L., 1978. Evolutionary adaptation of membranes to temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2040-2043.
- Couture, P., Pyle, G., Campbell, P., Hontela, A., 2015. Using Perca as Biomonitors in Ecotoxicological Studies. In: *Biology of Perch.*, CRC Press, Boca Raton, FL, ed. CRC Press, Boca Raton, FL, CRC Press, Boca Raton, FL.
- da Costa, F., Nóvoa, S., Ojea, J., Martínez-Patiño, D., 2011. Changes in biochemical and fatty acid composition of the razor clam *Solen marginatus* (Solenidae: Bivalvia) during larval development. *Marine Biology* 158, 1829-1840.

- Eastwood, S., Couture, P., 2002. Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal-contaminated environment. *Aquat Toxicol* 58, 43-56.
- 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.
- Farkas, T., Kitajka, K., Fodor, E., Csengeri, I., Lahdes, E., Yeo, Y.K., Krasznai, Z., Halver, J.E., 2000. Docosahexaenoic acid-containing phospholipid molecular species in brains of vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6362-6366.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* 226, 497-509.
- Fonseca-Madrugal, J., Navarro, J.C., Hontoria, F., Tocher, D.R., Martinez-Palacios, C.A., Monroig, O., 2014. Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2: characterization of Delta 4 and Delta 6 Delta 5 desaturases of *Chirostoma estor*. *J Lipid Res* 55, 1408-1419.
- Friedlander, M., Kotchabhakdi, N., Prosser, C.L., 1976. The effects of heat and cold on behavior and cerebellar function in goldfish. *J. comp. Physiol.* 112, 19-45.
- Grasset, J., Bougas, B., Campbell, P., Bernatchez, L., Couture, P., 2014. Temperature, oxygen, and diet modulate gene transcription and metabolic capacities in yellow perch. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 71, 1635-1641.
- Grasset, J., Ollivier, É., Bougas, B., Yannic, G., Campbell, P., Bernatchez, L., Couture, P., 2016. Combined effects of temperature changes and metal contamination at different levels of biological organization in yellow perch. *Aquat. Toxicol.* 177, 324-332.
- Gregory, M.K., James, M.J., 2014. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Elovl5 and Elovl2 differ in selectivity for elongation of omega-3 docosapentaenoic acid. *Biochim Biophys Acta* 1841, 1656-1660.
- Grim, J.M., Miles, D.R., Crockett, E.L., 2010. Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. *J Exp Biol* 213, 445-452.
- Guillou, H., Zdravec, D., Martin, P.G.P., Jacobsson, A., 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 49, 186-199.
- Hashimoto, M., Hossain, S., Shido, O., 2006. Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid withstands dietary cholesterol-induced decreases in platelet membrane fluidity. *Mol Cell Biochem* 293, 1-8.

- Hasnain, S.S., Minns, C.K., Shuter, B.J., 2010. Key Ecological Temperature Metrics for Canadian Freshwater Fishes. Applied Research and Development Branch • Ontario Ministry of Natural Resources.
- Hastings, N., Agaba, M.K., Tocher, D.R., Zheng, X.Z., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A.J., 2004. Molecular cloning and functional characterization of fatty acyl desaturase and elongase cDNAs involved in the production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from alpha-linolenic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Mar Biotechnol 6, 463-474.
- Hazel, J.R., 1984. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. Am J Physiol 246, R460-470.
- Hazel, J.R., 1995. Thermal Adaptation in Biological-Membranes - Is Homeoviscous Adaptation the Explanation. Annu Rev Physiol 57, 19-42.
- Hazel, J.R., Livermore, R.C., 1990. Fatty-Acyl Coenzyme-a Pool in Liver of Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri*) - Effects of Temperature-Acclimation. J Exp Zool 256, 31-37.
- Hazel, J.R., Williams, E.E., 1990. The Role of Alterations in Membrane Lipid-Composition in Enabling Physiological Adaptation of Organisms to Their Physical-Environment. Prog Lipid Res 29, 167-227.
- Hochachka, P., Somero, G., 2002. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution. Oxford University Press, United States of America.
- Horrocks, L.A., Farooqui, A.A., 2004. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 70, 361-372.
- Hsieh, S.L., Kuo, C.M., 2005. Stearoyl-CoA desaturase expression and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during cold acclimation. Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology 141, 95-101.
- Innis, S.M., Sprecher, H., Hachey, D., Edmond, J., Anderson, R.E., 1999. Neonatal polyunsaturated fatty acid metabolism. Lipids 34, 139-149.
- Jakobsson, A., Westerberg, R., Jacobsson, A., 2006. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. Prog Lipid Res 45, 237-249.
- Kent, J., Koban, M., Prosser, C.L., 1988. Cold-Acclimation-Induced Protein Hypertrophy in Channel Catfish and Green Sunfish. J Comp Physiol B 158, 185-198.
- Kraffe, E., Marty, Y., Guderley, H., 2007. Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. J Exp Biol 210, 149-165.
- Kudo, N., Waku, K., 1996. Cadmium suppresses delta 9 desaturase activity in rat hepatocytes. Toxicology 114, 101-111.

- Lapointe, D., Pierron, F., Couture, P., 2011. Individual and combined effects of heat stress and aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 104, 80-85.
- Leaver, M.J., Bautista, J.M., Bjornsson, B.T., Jonsson, E., Krey, G., Tocher, D.R., Torstensen, B.E., 2008. Towards Fish Lipid Nutrigenomics: Current State and Prospects for Fin-Fish Aquaculture. *Rev Fish Sci* 16, 73-94.
- Li, Y.Y., Monroig, O., Zhang, L.A., Wang, S.Q., Zheng, X.Z., Dick, J.R., You, C.H., Tocher, D.R., 2010. Vertebrate fatty acyl desaturase with Delta 4 activity. *P Natl Acad Sci USA* 107, 16840-16845.
- Liu, Z., Lv, W., Huang, Y., Fan, B., Li, Y., Zhao, Y., 2016. Effects of cadmium on lipid metabolism in female estuarine crab, *Chiromantes dehaani*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 188, 9-16.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Logue, J.A., De Vries, A.L., Fodor, E., Cossins, A.R., 2000. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. *J Exp Biol* 203, 2105-2115.
- Marquardt, A., Stohr, H., White, K., Weber, B.H.F., 2000. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics* 66, 175-183.
- Massabuau, J.C., Tran, D., 2003. Ventilation, a recently described step limiting heavy metal contamination in aquatic animals. *J Phys IV* 107, 839-843.
- Mellery, J., Geay, F., Tocher, D.R., Kestemont, P., Debier, C., Rollin, X., Larondelle, Y., 2016. Temperature Increase Negatively Affects the Fatty Acid Bioconversion Capacity of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fed a Linseed Oil-Based Diet. *Plos One* 11, e0164478.
- Michaelson, D.M., Horwitz, A.F., Klein, M.P., 1974. Head group modulation of membrane fluidity in sonicated phospholipid dispersions. *Biochemistry-U S* 13, 2605-2612.
- Minghetti, M., Leaver, M.J., Tocher, D.R., 2011. Transcriptional control mechanisms of genes of lipid and fatty acid metabolism in the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) established cell line, SHK-1. *Biochim Biophys Acta* 1811, 194-202.
- Monroig, O., Rotllant, J., Sanchez, E., Cerda-Reverter, J.M., Tocher, D.R., 2009. Expression of long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) biosynthesis genes during zebrafish *Danio rerio* early embryogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1791, 1093-1101.

- Monroig, O., Tocher, D.R., Navarro, J.C., 2013. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: recent advances in molecular mechanisms. *Mar Drugs* 11, 3998-4018.
- Morais, S., Castanheira, F., Martinez-Rubio, L., Conceicao, L.E.C., Tocher, D.R., 2012. Long chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a marine vertebrate: Ontogenetic and nutritional regulation of a fatty acyl desaturase with Delta 4 activity. *Bba-Mol Cell Biol L* 1821, 660-671.
- Morais, S., Monroig, O., Zheng, X.Z., Leaver, M.J., Tocher, D.R., 2009. Highly Unsaturated Fatty Acid Synthesis in Atlantic Salmon: Characterization of ELOVL5-and ELOVL2-like Elongases. *Mar Biotechnol* 11, 627-639.
- Mubiana, V.K., Blust, R., 2007. Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res* 63, 219-235.
- Nichols, J.W., Playle, R.C., 2004. Influence of temperature on silver accumulation and depuration in rainbow trout. *J Fish Biol* 64, 1638–1654.
- Norambuena, F., Morais, S., Emery, J.A., Turchini, G.M., 2015. Arachidonic Acid and Eicosapentaenoic Acid Metabolism in Juvenile Atlantic Salmon as Affected by Water Temperature. *Plos One* 10, e0143622.
- Qin, Y., Dalen, K.T., Gustafsson, J.A., Nebb, H.I., 2009. Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXRalpha-SREBP-1c. *Biochim Biophys Acta* 1791, 140-147.
- Rajotte, J.W., Couture, P., 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Can J Fish Aquat Sci* 59, 1296-1304.
- Ren, H.T., Zhang, G.Q., Li, J.L., Tang, Y.K., Li, H.X., Yu, J.H., Xu, P., 2013. Two Delta6-desaturase-like genes in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): structure characterization, mRNA expression, temperature and nutritional regulation. *Gene* 525, 11-17.
- Rouleau, C., Xiong, Z.H., Pacepavicius, G., Huang, G.L., 2003. Uptake of waterborne tributyltin in the brain of fish: axonal transport as a proposed mechanism. *Environ Sci Technol* 37, 3298-3302.
- Salem, N., Litman, B., Kim, H.Y., Gawrisch, K., 2001. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36, 945-959.
- Seddon, W.L., 1997. Mechanisms of temperature acclimation in the channel catfish *Ictalurus punctatus*: Isozymes and quantitative changes. *Comp Biochem Phys A* 118, 813-820.
- Sinensky, M., 1974. Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 522-525.

- Smith, S., Witkowski, A., Joshi, A.K., 2003. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res* 42, 289-317.
- Sprecher, H., 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Bba-Mol Cell Biol L* 1486, 219-231.
- Stillwell, W., Wassall, S.R., 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* 126, 1-27.
- Thomassen, M.S., Helgerud, P., Norum, K.R., 1985. Chain-shortening of erucic acid and microperoxisomal beta-oxidation in rat small intestine. *Biochem J* 225, 301-306.
- Tiku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J., Cossins, A.R., 1996a. Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 271, 815-818.
- Tocher, D.R., Harvie, D.G., 1988. Fatty acid compositions of the major phosphoglycerides from fish neural tissues; (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and cod (*Gadus morhua*) brains and retinas. *Fish Physiol Biochem* 5, 229-239.
- Tocher, D.R., Zheng, X., Schlechtriem, C., Hastings, N., Dick, J.R., Teale, A.J., 2006. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl delta 6 desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids* 41, 1003-1016.
- Trueman, R.J., Tiku, P.E., Caddick, M.X., Cossins, A.R., 2000. Thermal thresholds of lipid restructuring and delta(9)-desaturase expression in the liver of carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Exp Biol* 203, 641-650.
- Van Den Bosch, H.I., 1980. Intracellular phospholipases A2. *Biochim. Biophys. Acta* 604, 191-246.
- van den Burg, E.H., Peeters, R.R., Verhoye, M., Meek, J., Flik, G., Van der Linden, A., 2005. Brain responses to ambient temperature fluctuations in fish: reduction of blood volume and initiation of a whole-body stress response. *J Neurophysiol* 93, 2849-2855.
- Wang, J., Chuang, C.Y., Wang, W.X., 2005. Metal and oxygen uptake in the green mussel *Perna viridis* under different metabolic conditions. *Environ Toxicol Chem* 24, 2657-2664.
- Weber, T.E., Bosworth, B.G., 2005. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. *Aquaculture* 246, 483-492.
- Wodtke, E., Cossins, A.R., 1991. Rapid cold-induced changes of membrane order and delta 9-desaturase activity in endoplasmic reticulum of carp liver: a time-course study of thermal acclimation. *Biochim Biophys Acta* 1064, 343-350.

- Xu, H., Zhang, D.L., Yu, D.H., Lv, C.H., Luo, H.Y., Wang, Z.Y., 2015. Molecular cloning and expression analysis of *scd1* gene from large yellow croaker *Larimichthys crocea* under cold stress. *Gene* 568, 100-108.
- Xue, X., Feng, C.Y., Hixson, S.M., Johnstone, K., Anderson, D.M., Parrish, C.C., Rise, M.L., 2014. Characterization of the fatty acyl elongase (*elovl*) gene family, and hepatic *elovl* and delta-6 fatty acyl desaturase transcript expression and fatty acid responses to diets containing camelina oil in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 175, 9-22.
- Yang, J., Liu, D., Jing, W., Dahms, H.U., Wang, L., 2013. Effects of cadmium on lipid storage and metabolism in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *Plos One* 8, e77569.
- Zabelinskii, S.A., Brovtsyna, N.B., Chebotareva, M.A., Gorbunova, O.B., Krivchenko, A.I., 1995. Comparative investigation of lipid and fatty acid composition of fish gills and mammalian lungs. A model of the membrane lipid component areas. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 111, 127-140.
- Zheng, X., Seiliez, I., Hastings, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P., Teale, A.J., 2004. Characterization and comparison of fatty acyl Delta6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 139, 269-279.
- Zheng, X., Torstensen, B.E., Tocher, D.R., Dick, J.R., Henderson, R.J., Bell, J.G., 2005. Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturase and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochim Biophys Acta* 1734, 13-24.

Table 1: Primers used for desaturase and elongase gene transcription level analysis by RT-qPCR.

Gene	Function	Blast hit	Forward primers (5'–3')	Reverse primers (3'–5')
<i>fads2</i>	Desaturation	<i>Cyprinus carpio</i> 1e-172	GCTCGATCTGGA AGTTGAGG	GTCACCCACACAAACCAGTG
<i>degs2</i>	Desaturation	<i>Danio rerio</i> 1e-64	GCATCCCATCTCTGGACATT	ATGACTTCCCCAGCATTCC
<i>scd2</i>	Desaturation	<i>Cyprinus carpio</i> 4e-72	GTCTGTGCTGCTGATGTGCT	GCACTCGTGTTGAACTCCAC
<i>elovl2</i>	Elongation	<i>Danio rerio</i> 1e-122	GAGTTTCTTTGGACCGATGC	CTGTGGTGGAAACGCTACCT
<i>elovl5</i>	Elongation	<i>Danio rerio</i> 1e-157	CAGCATGCTCAACATCTGGT	TTCCACCACAGGTACGGTCT
<i>elovl6</i>	Elongation	<i>Danio rerio</i> 0	GTGCATGCCGTCATGTATTC	CACAGATCACCCAAATGGTG
<i>B-actin</i>	Reference	KF844250	CACCATGTACCCTGGCATTG	GATCTTAATTTTCATGGTGGAAGGA

Table 2: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of membrane phospholipids in fathead minnow muscle for each exposure condition. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6). Different superscript letters within a row represent significant differences between conditions ($p < 0.05$). **DBI**=Double bond index; **U/S Ratio**=Unsaturated/Saturated fatty acid Ratio.

	15°C	15°C-Cd	15°C-Ni	25°C	25°C-Cd	30°C	30°C-Cd
C14:0	0.04 \pm 0.03 ^{ab}	0.1 \pm 0.07 ^a	0.0 \pm 0.00 ^b	0.02 \pm 0.02 ^{ab}	0.1 \pm 0.1 ^{ab}	0.1 \pm 0.05 ^{ab}	0.2 \pm 0.1 ^{ab}
C16:0	12.8 \pm 0.2 ^b	11.8 \pm 0.7 ^b	13.5 \pm 0.7 ^b	14.2 \pm 0.5 ^b	13.7 \pm 0.3 ^b	30.0 \pm 5.2 ^a	15.0 \pm 0.6 ^b
C17:0	0.1 \pm 0.0 ^b	0.5 \pm 0.2 ^a	0.2 \pm 0.2 ^{ab}	0.2 \pm 0.1 ^{ab}	0.2 \pm 0.0 ^{ab}	0.1 \pm 0.1 ^{ab}	0.1 \pm 0.0 ^b
C18:0	4.8 \pm 0.1 ^b	3.9 \pm 0.4 ^b	6.4 \pm 0.8 ^a	5.3 \pm 0.4 ^{ab}	5.7 \pm 0.3 ^{ab}	6.9 \pm 1.0 ^a	6.2 \pm 0.3 ^a
C24:0	0.1 \pm 0.0 ^b	0.1 \pm 0.0 ^b	0.2 \pm 0.1 ^{ab}	0.2 \pm 0.1 ^{ab}	0.5 \pm 0.4 ^{ab}	1.3 \pm 0.7 ^a	0.6 \pm 0.4 ^{ab}
15:1	1.8 \pm 0.3 ^a	0.6 \pm 0.1 ^b	0.9 \pm 0.5 ^{ab}	1.0 \pm 0.3 ^{ab}	1.0 \pm 0.2 ^{ab}	0.1 \pm 0.0 ^c	2.7 \pm 0.5 ^a
16:1n-7	0.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.3 \pm 0.3	0.3 \pm 0.1
17:1n-9	1.0 \pm 0.2 ^b	0.5 \pm 0.1 ^b	1.1 \pm 0.7 ^b	0.7 \pm 0.1 ^b	0.6 \pm 0.2 ^b	2.4 \pm 0.6 ^a	1.9 \pm 0.4 ^{ab}
18:1n-7	2.6 \pm 0.1 ^b	2.6 \pm 0.1 ^b	2.2 \pm 0.6 ^b	2.2 \pm 0.4 ^b	2.4 \pm 0.3 ^b	6.1 \pm 1.8 ^a	2.1 \pm 0.4 ^b
18:1n-9	9.6 \pm 0.6 ^b	9.5 \pm 0.7 ^b	13.1 \pm 1.9 ^{ab}	10.9 \pm 0.7 ^b	11.5 \pm 0.9 ^{ab}	14.3 \pm 1.7 ^a	13.2 \pm 0.4 ^a
20:1n-9	0.5 \pm 0.1 ^b	0.4 \pm 0.0 ^b	0.1 \pm 0.1 ^b	0.4 \pm 0.2 ^b	0.2 \pm 0.0 ^b	2.4 \pm 0.7 ^a	0.9 \pm 0.4 ^{ab}
24:1n-9	0.2 \pm 0.0 ^b	0.5 \pm 0.0 ^a	0.2 \pm 0.1 ^b	0.6 \pm 0.1 ^a	0.6 \pm 0.1 ^a	1.0 \pm 0.5 ^a	0.3 \pm 0.1 ^b
18:2n-6	5.8 \pm 0.2 ^b	5.8 \pm 0.5 ^b	7.1 \pm 0.5 ^a	7.3 \pm 0.3 ^a	7.2 \pm 0.7 ^a	5.7 \pm 0.8 ^b	5.0 \pm 0.3 ^b
20:2n-6	0.9 \pm 0.1 ^a	1.0 \pm 0.1 ^a	0.2 \pm 0.2 ^c	0.7 \pm 0.1 ^b	0.8 \pm 0.1 ^{ab}	0.1 \pm 0.1 ^c	0.4 \pm 0.1 ^c
18:3n-6	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	1.5 \pm 1.0	0.2 \pm 0.1
18:3n-3	0.1 \pm 0.1 ^{ab}	0.2 \pm 0.1 ^a	0.1 \pm 0.1 ^{ab}	0.1 \pm 0.06 ^{ab}	0.1 \pm 0.1 ^{ab}	0.1 \pm 0.1 ^{ab}	0.0 \pm 0.0 ^b
20:3n-6	1.8 \pm 0.2 ^a	1.5 \pm 0.2 ^a	0.3 \pm 0.3 ^c	0.9 \pm 0.1 ^b	0.8 \pm 0.2 ^b	0.0 \pm 0.0 ^c	0.5 \pm 0.2 ^b
18:4n-3	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.2 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
20:4n-6	6.1 \pm 0.3 ^a	5.4 \pm 0.6 ^a	0.2 \pm 0.0 ^b	5.8 \pm 0.3 ^a	6.1 \pm 0.4 ^a	4.5 \pm 1.2 ^a	5.2 \pm 0.4 ^a
20:4n-3	1.1 \pm 0.2 ^b	0.9 \pm 0.2 ^b	4.4 \pm 0.2 ^a	0.3 \pm 0.2 ^c	0.6 \pm 0.2 ^{bc}	0.2 \pm 0.2 ^c	0.5 \pm 0.3 ^{bc}
22:4n-6	1.7 \pm 0.2 ^a	1.0 \pm 0.2 ^a	0.2 \pm 0.1 ^b	0.7 \pm 0.5 ^{ab}	0.6 \pm 0.2 ^b	1.7 \pm 1.5 ^{ab}	0.9 \pm 0.4 ^{ab}
20:5n-3	8.7 \pm 0.3 ^a	8.4 \pm 0.6 ^a	8.6 \pm 0.9 ^a	7.9 \pm 0.5 ^a	8.1 \pm 0.3 ^a	5.1 \pm 0.3 ^b	5.8 \pm 0.7 ^b
22:5n-3	3.2 \pm 0.2 ^a	3.4 \pm 0.2 ^a	2.6 \pm 0.6 ^{ab}	2.4 \pm 0.1 ^b	6.5 \pm 4.2 ^a	0.0 \pm 0.0 ^c	1.6 \pm 0.4 ^b
22:6n-3	36.6 \pm 1.0 ^a	41.2 \pm 2.4 ^a	37.7 \pm 2.5 ^a	35.3 \pm 1.3 ^a	31.7 \pm 6.4 ^a	15.9 \pm 0.8 ^b	33.6 \pm 1.2 ^a
DBI	350.1 \pm 4.7 ^{ab}	370.0 \pm 14.7 ^a	309.2 \pm 6.5 ^b	332.5 \pm 6.5 ^{ab}	329.8 \pm 15.6 ^{ab}	203.2 \pm 7.9 ^c	298.6 \pm 11.3 ^b
U/S Ratio	4.6 \pm 0.1 ^{ab}	5.2 \pm 0.2 ^a	4.0 \pm 0.1 ^{ab}	4.0 \pm 0.1 ^{ab}	4.0 \pm 0.2 ^{ab}	2.2 \pm 0.2 ^c	3.4 \pm 0.1 ^b

Table 3: Fatty acid groups and families (% of total fatty acids) in muscle membranes of fathead minnows under different exposure conditions. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6) and are calculated for each individual of the same condition. Different superscript letters within a row indicate significant differences between conditions ($p < 0.05$).

	15°C	15°C-Cd	15°C-Ni	25°C	25°C-Cd	30°C	30°C-Cd
SFA	18.5 \pm 0.3 ^{cd}	12.7 \pm 0.7 ^d	18.0 \pm 0.4 ^{cd}	21.5 \pm 0.4 ^b	22.3 \pm 0.7 ^{bc}	34.0 \pm 1.4 ^a	22.8 \pm 0.9 ^b
MUFA	16.1 \pm 0.9 ^b	14.5 \pm 3.5 ^b	22.9 \pm 0.9 ^{ab}	16.4 \pm 0.9 ^b	16.8 \pm 1.5 ^b	29.1 \pm 2.0 ^a	22.2 \pm 0.9 ^{ab}
PUFA	66.0 \pm 0.9 ^{ab}	69.1 \pm 3.5 ^a	58.5 \pm 1.0 ^{ab}	63.1 \pm 1.0 ^{ab}	63.0 \pm 2.0 ^{ab}	38.5 \pm 1.9 ^c	53.6 \pm 2.2 ^b
n-9 UFA	10.2 \pm 0.7 ^c	10.3 \pm 1.2 ^c	11.7 \pm 0.7 ^{bc}	12.5 \pm 0.7 ^{bc}	12.3 \pm 0.9 ^{bc}	19.4 \pm 1.7 ^a	14.4 \pm 0.4 ^b
n-3 UFA	49.7 \pm 1.0 ^{ab}	54.3 \pm 2.7 ^a	44.2 \pm 1.3 ^{ab}	47.8 \pm 1.3 ^{ab}	47.3 \pm 2.4 ^{ab}	22.9 \pm 1.0 ^c	41.5 \pm 2.1 ^b
n-6 UFA	16.3 \pm 0.2 ^a	14.8 \pm 0.4 ^b	13.1 \pm 0.7 ^c	15.1 \pm 0.7 ^{abc}	15.6 \pm 1.1 ^b	15.3 \pm 2.2 ^{abc}	12.1 \pm 0.9 ^c

Table 4: Effects of temperature, Cd and their interaction as determined by two-way ANOVA analysis of FA groups and families in fathead minnow muscle and brain. Values in bold represent a significant effect of temperature, Cd or their interaction ($p < 0.05$).

	Muscle			Brain		
	Temperature	Cd	Temperature x Cd	Temperature	Cd	Temperature x Cd
SFA	<0.0001	0.0130	0.0030	0.0406	0.5338	0.0014
MUFA	<0.0001	0.0444	0.1185	0.0408	0.8243	0.0037
PUFA	<0.0001	0.0001	0.0002	0.0096	0.8257	0.5908
U/S Ratio	<0.0001	0.0026	0.0383	0.0182	0.2099	0.0002
n-9 UFA	0.0042	0.5152	0.7228	0.0113	0.0849	0.0178
n-3 UFA	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0085	0.3383	0.2465
n-6 UFA	0.2153	0.1476	0.2882	0.0139	0.3109	0.2531

Table 5: Effects of temperature, Cd and their interaction as determined by two-way ANOVA analysis on the transcription level of elongases and desaturases in fathead minnow muscle and brain. Values in bold represent a significant effect of temperature, Cd or their interaction ($p < 0.05$).

	Muscle			Brain		
	Temperature	Cd	Temperature x Cd	Temperature	Cd	Temperature x Cd
<i>fads2</i>	0.1336	0.1426	0.3862	<0.0001	0.0044	0.0318
<i>degs2</i>	0.0223	0.4013	0.0113	0.7014	0.0318	0.0728
<i>scd2</i>	0.0045	0.5442	0.0034	<0.0001	0.1173	0.2304
<i>elovl2</i>	0.7704	0.7289	0.1294	0.0006	0.2424	0.0005
<i>elovl6</i>	0.3873	0.0384	0.0017	0.5876	0.1176	0.9821
<i>elovl5</i>	0.5766	0.4746	0.0080	0.0138	0.4254	0.1174

Table 6: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of membrane phospholipids in fathead minnow brain for each exposure condition. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6). Different superscript letters within a row represent significant differences between conditions ($p < 0.05$). **DBI**=Double bond index; **U/S Ratio**=Unsaturated/Saturated fatty acid Ratio.

	15°C	15°C-Cd	15°C-Ni	25°C	25°C-Cd	30°C	30°C-Cd
C14:0	0.1 \pm 0.0 ^b	0.2 \pm 0.0 ^a	0.1 \pm 0.0 ^b	0.03 \pm 0.02 ^b	0.03 \pm 0.02 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b
C16:0	16.2 \pm 2.1 ^{ab}	18.0 \pm 1.4 ^{ab}	21.8 \pm 1.6 ^a	22.0 \pm 2.9 ^a	12.8 \pm 2.9 ^b	8.8 \pm 0.1 ^b	11.4 \pm 0.7 ^b
C17:0	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.03 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
C18:0	7.7 \pm 0.5 ^c	7.6 \pm 0.4 ^c	7.6 \pm 0.3 ^c	9.4 \pm 0.4 ^{bc}	10.5 \pm 0.4 ^b	9.2 \pm 0.3 ^{bc}	14.0 \pm 1.0 ^a
C24:0	1.6 \pm 0.2 ^a	1.7 \pm 0.2 ^a	1.8 \pm 0.5 ^a	1.6 \pm 0.3 ^a	1.5 \pm 0.3 ^a	0.0 \pm 0.0 ^b	1.2 \pm 0.3 ^a
15:1	0.2 \pm 0.1 ^b	0.1 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.5 \pm 0.3 ^a	0.0 \pm 0.0 ^b	0.7 \pm 0.1 ^a	0.0 \pm 0.0 ^b
16:1n-7	0.2 \pm 0.1 ^c	0.9 \pm 0.1 ^a	0.9 \pm 0.2 ^a	0.4 \pm 0.1 ^b	0.6 \pm 0.1 ^b	0.2 \pm 0.1 ^c	0.5 \pm 0.2 ^{abc}
17:1n-9	1 \pm 0.3 ^b	1.2 \pm 0.4 ^{ab}	1.5 \pm 0.3 ^{ab}	2.2 \pm 0.3 ^a	0.2 \pm 0.3 ^c	1.0 \pm 0.3 ^b	0.6 \pm 0.3 ^{bc}
18:1n-7	3.3 \pm 0.1 ^b	3.1 \pm 0.2 ^b	2.8 \pm 0.1 ^b	3.2 \pm 1.2 ^b	2.6 \pm 1.2 ^b	6.9 \pm 0.0 ^a	0.5 \pm 0.3 ^c
18:1n-9	18.5 \pm 0.3 ^b	18.1 \pm 0.8 ^b	20.4 \pm 1.3 ^b	18.5 \pm 1.0 ^b	26.4 \pm 1.0 ^a	22.1 \pm 0.4 ^{ab}	21.3 \pm 0.5 ^{ab}
20:1n-9	1.2 \pm 0.1 ^b	1.2 \pm 0.1 ^b	0.9 \pm 0.1 ^b	0.6 \pm 0.1 ^c	1.1 \pm 0.1 ^b	2.4 \pm 0.1 ^a	0.1 \pm 0.1 ^d
22:1n-9	0.3 \pm 0.0 ^a	0.3 \pm 0.0 ^a	0.2 \pm 0.0 ^{ab}	0.2 \pm 0.2 ^{ab}	0.3 \pm 0.2 ^{ab}	0.6 \pm 0.3 ^a	0.1 \pm 0.1 ^b
24:1n-9	3.8 \pm 0.2 ^b	3.9 \pm 0.4 ^b	3.7 \pm 0.3 ^b	3.9 \pm 0.3 ^b	6.5 \pm 0.3 ^a	4.2 \pm 0.4 ^b	3.7 \pm 0.1 ^b
18:2n-6	0.7 \pm 0.1 ^{ab}	0.7 \pm 0.1 ^{ab}	0.9 \pm 0.1 ^a	0.7 \pm 0.1 ^{ab}	0.7 \pm 0.1 ^{ab}	1.4 \pm 0.6 ^{ab}	0.3 \pm 0.1 ^b
20:2n-6	0.4 \pm 0.0 ^a	0.5 \pm 0.0 ^a	0.4 \pm 0.0 ^a	0.2 \pm 0.1 ^{ab}	0.2 \pm 0.1 ^{ab}	0.6 \pm 0.2 ^a	0.0 \pm 0.0 ^b
18:3n-6	0.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
18:3n-3	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	2.3 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^b
20:3n-6	0.9 \pm 0.1 ^a	0.3 \pm 0.1 ^c	0.7 \pm 0.1 ^b	0.1 \pm 0.1 ^d	0.4 \pm 0.1 ^b	0.0 \pm 0.0 ^d	0.0 \pm 0.0 ^d
20:3n-3	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	2.7 \pm 1.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^b
18:4n-3	0.1 \pm 0.1 ^b	0.3 \pm 0.1 ^b	0.9 \pm 0.3 ^a	0.2 \pm 0.2 ^b	0.2 \pm 0.2 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b
20:4n-6	3.3 \pm 0.1 ^b	3.1 \pm 0.2 ^b	3.2 \pm 0.1 ^b	3.2 \pm 0.3 ^b	3.8 \pm 0.3 ^b	4.9 \pm 0.2 ^a	2.9 \pm 0.2 ^b
20:4n-3	0.4 \pm 0.3 ^b	0.1 \pm 0.1 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.5 \pm 0.1 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	4.8 \pm 0.1 ^a	0.0 \pm 0.0 ^b
22:4n-6	0.2 \pm 0.1 ^b	0.1 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.5 \pm 0.3 ^b	0.0 \pm 0.3 ^b	0.4 \pm 0.1 ^b	9.6 \pm 3.8 ^a
20:5n-3	2.5 \pm 0.2 ^a	2.5 \pm 0.3 ^a	2.2 \pm 0.2 ^a	0.8 \pm 0.1 ^{bc}	1.2 \pm 0.1 ^b	0.6 \pm 0.1 ^{bc}	0.3 \pm 0.1 ^c
22:5n-3	1.5 \pm 0.1 ^b	1.4 \pm 0.1 ^b	2.6 \pm 1.2 ^{ab}	0.4 \pm 0.1 ^c	0.8 \pm 0.1 ^c	4.4 \pm 0.3 ^a	1.1 \pm 1.0 ^c
22:6n-3	35.5 \pm 1.3 ^a	33.5 \pm 0.7 ^a	27.2 \pm 2.4 ^b	27.9 \pm 0.8 ^b	29.8 \pm 0.8 ^{ab}	26.5 \pm 0.4 ^b	31.7 \pm 2.2 ^{ab}
DBI	282.6 \pm 11.7 ^a	255.3 \pm 2.9 ^{ab}	238.9 \pm 11.2 ^b	221.5 \pm 11.2 ^b	245.4 \pm 2.99 ^{ab}	264.7 \pm 3.4 ^a	267.2 \pm 21.8 ^{ab}
U/S Ratio	3.0 \pm 0.3 ^b	2.7 \pm 0.2 ^b	3.0 \pm 0.3 ^b	2.0 \pm 0.3 ^b	3.2 \pm 0.5 ^{ab}	4.4 \pm 0.2 ^a	2.6 \pm 0.2 ^b

Table 7: Fatty acid groups and families (% of total fatty acids) in brain membranes of fathead minnows under different exposure conditions. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6) and are calculated for each individual of the same condition. Different superscript letters within a row indicate significant differences between conditions ($p < 0.05$).

	15°C	15°C-Cd	15°C-Ni	25°C	25°C-Cd	30°C	30°C-Cd
SFA	25.8 \pm 2.6 ^{ab}	27.8 \pm 1.6 ^{ab}	31.5 \pm 1.5 ^a	33.03 \pm 2.9 ^a	25.1 \pm 2.3 ^{ab}	18.8 \pm 0.8 ^b	28.0 \pm 1.9 ^a
MUFA	28.6 \pm 0.6 ^b	28.9 \pm 1.5 ^b	30.4 \pm 1.4 ^{ab}	29.5 \pm 2.5 ^{ab}	37.7 \pm 2.5 ^a	37.4 \pm 1.1 ^a	30.0 \pm 3.2 ^{ab}
PUFA	45.6 \pm 2.1 ^a	43.2 \pm 2.7 ^a	38.1 \pm 1.9 ^b	34.3 \pm 0.7 ^b	37.1 \pm 4.2 ^{ab}	43.8 \pm 0.9 ^a	41.9 \pm 4.9 ^{ab}
n-9 UFA	24.0 \pm 0.5 ^b	24.7 \pm 1.2 ^b	26.7 \pm 1.4 ^{ab}	25.4 \pm 2.1 ^b	34.3 \pm 2.4 ^a	29.9 \pm 2.1 ^{ab}	28.2 \pm 3.1 ^{ab}
n-3 UFA	40.5 \pm 1.9 ^a	37.8 \pm 2.1 ^{ab}	32.9 \pm 1.9 ^b	29.3 \pm 0.7 ^c	32.0 \pm 4.3 ^{abc}	36.5 \pm 1.9 ^b	30.3 \pm 1.9 ^{bc}
n-6 UFA	5.3 \pm 0.4 ^{ab}	4.7 \pm 0.6 ^b	5.2 \pm 0.1 ^{ab}	4.7 \pm 0.5 ^b	5.0 \pm 0.3 ^{ab}	7.0 \pm 0.8 ^{ab}	11.3 \pm 3.6 ^a

Figure legends

Figure 1: The biosynthesis pathway of monounsaturated and long-chain polyunsaturated fatty acids in fish

Figure 2: Condition index of fathead minnows after eight weeks of exposure to each experimental condition. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6). Bars sharing the same letters are not significantly different ($p>0.05$).

Figure 3: Hepatosomatic index of fathead minnows after eight weeks of exposure to each experimental condition. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6). Bars sharing the same letters are not significantly different ($p>0.05$).

Figure 4: Cadmium and nickel concentration in muscle (A-C) and brain (B-D) of fathead minnows after eight weeks of exposure to each experimental condition. Data are expressed in $\mu\text{g. g}^{-1}$ dry weight and represented as mean \pm SEM (n=6). Bars sharing the same letters are not significantly different ($p>0.05$).

Figure 5: Desaturase genes transcription level (A) *fads2* (B) *degs2* (C) *scd2* in fathead minnow muscle after eight weeks of exposure to each experimental condition. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6) and significant differences between means are indicated by different letters ($p<0.05$).

Figure 6: Transcription level of elongase genes *elovl2* (A), *elovl5* (B) and *elovl6* (C) in fathead minnow muscle after eight weeks of exposure to each experimental condition. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6) and significant differences between means are indicated by different letters ($p<0.05$).

Figure 7: Transcription level of desaturase genes *fads2* (A), *degs2* (B) and *scd2* (C) in fathead minnow brain after eight weeks of exposure to each experimental condition. Data are expressed as mean SEM (n=6) and significant differences between means are indicated by different letters ($p<0.05$)

Figure 8: Transcription level of elongase genes *elovl2* (A), *elovl5* (B) and *elovl6* (C) in fathead minnow brain after eight weeks of exposure to each experimental condition. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6) and significant differences between means are indicated by different letters ($p<0.05$).

Figure 1

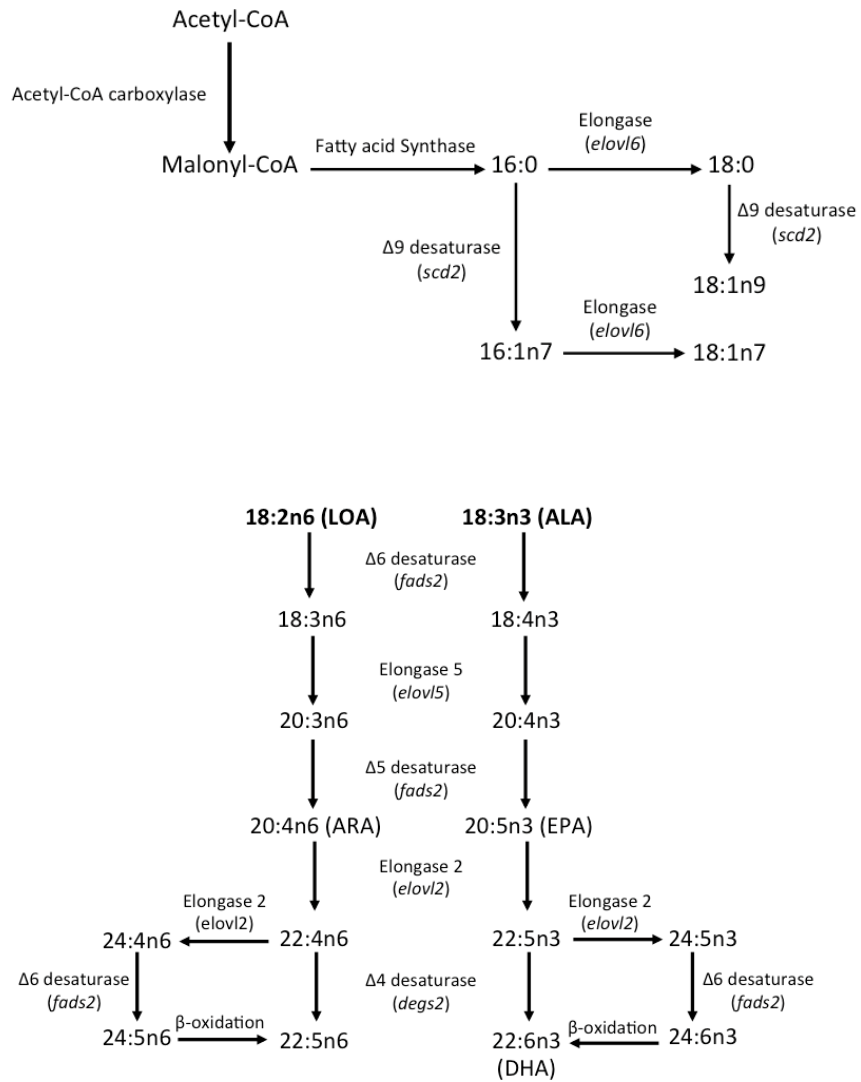


Figure 2

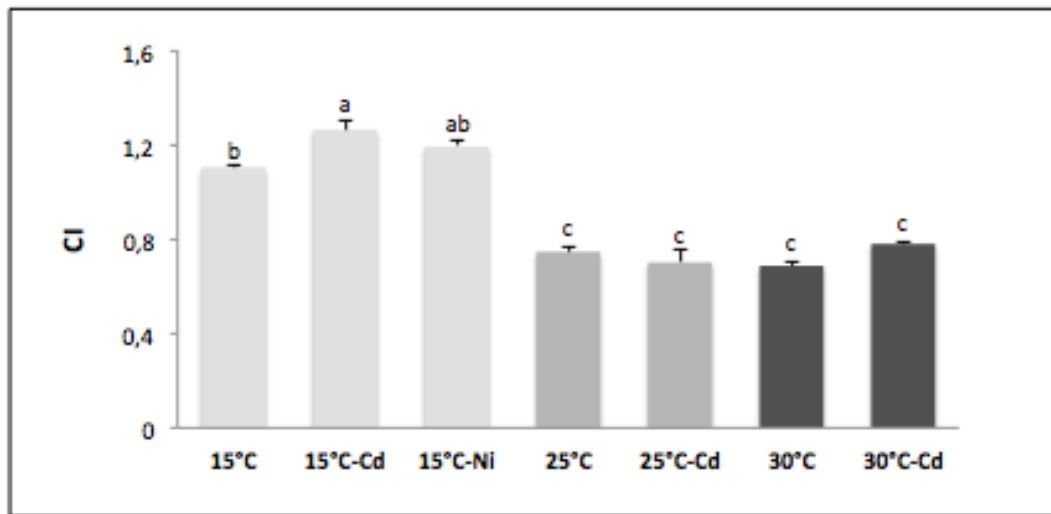


Figure 3

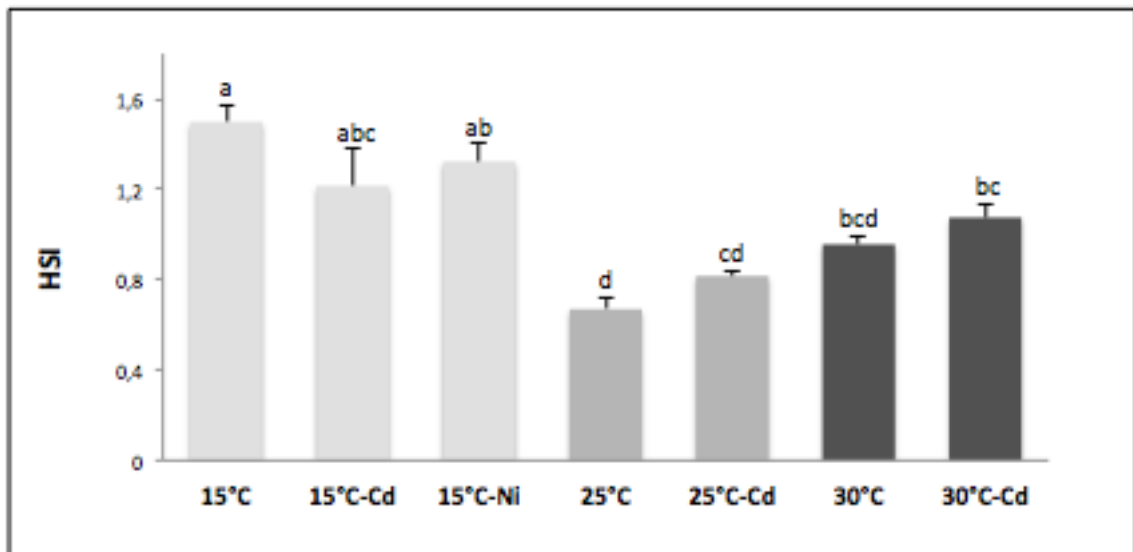


Figure 4

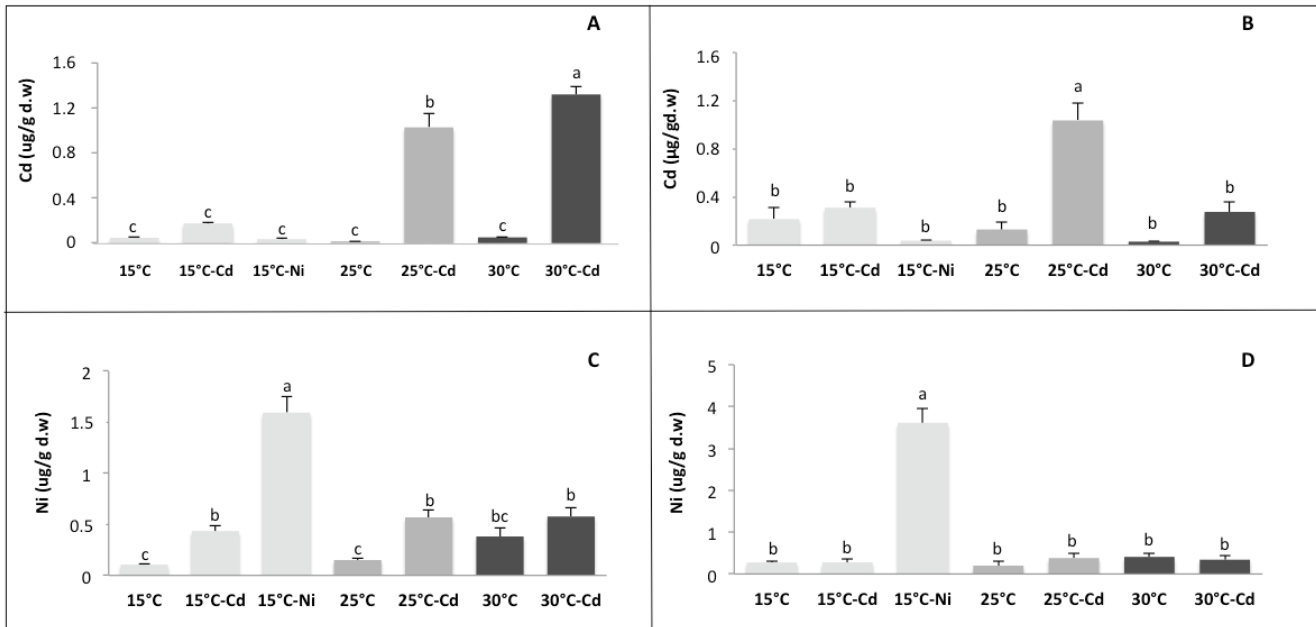


Figure 5

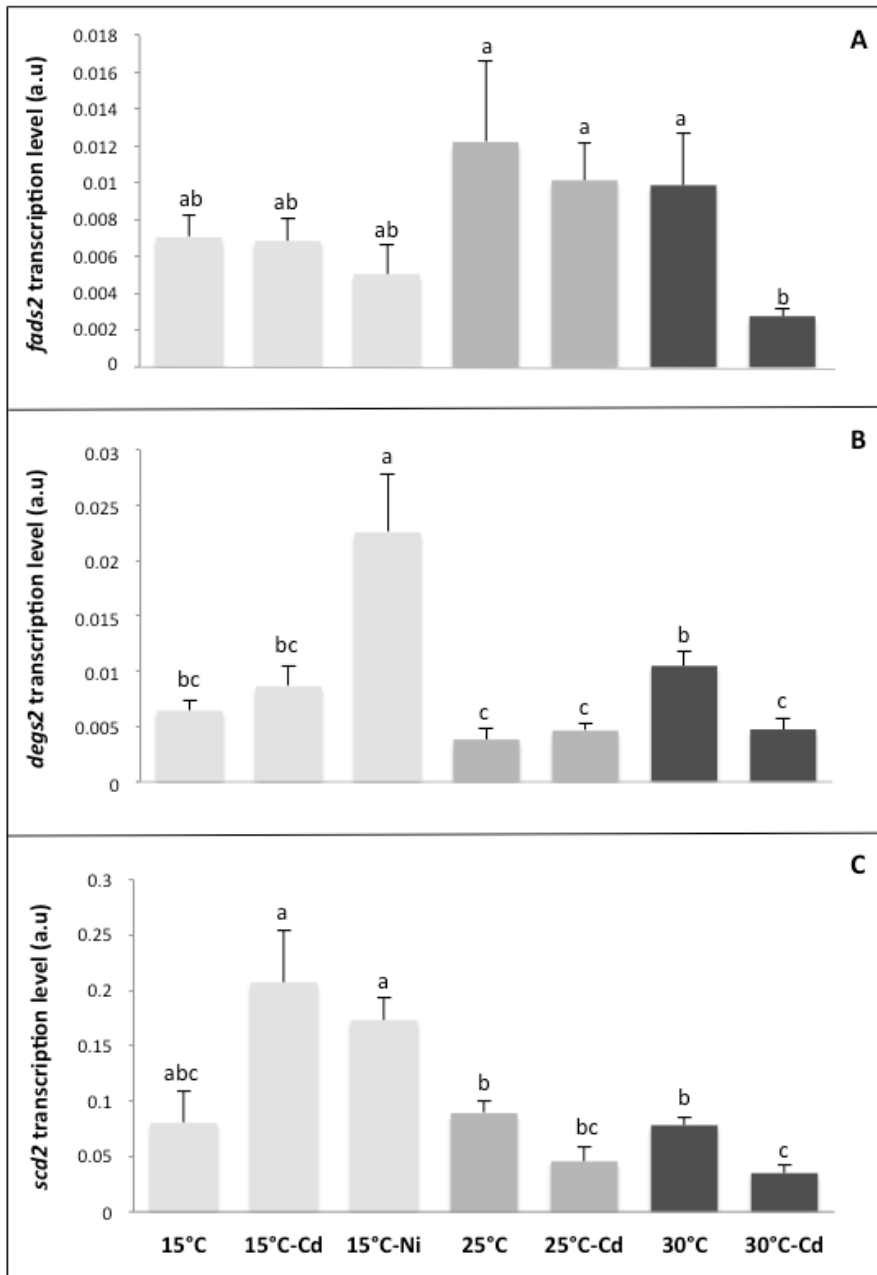


Figure 6

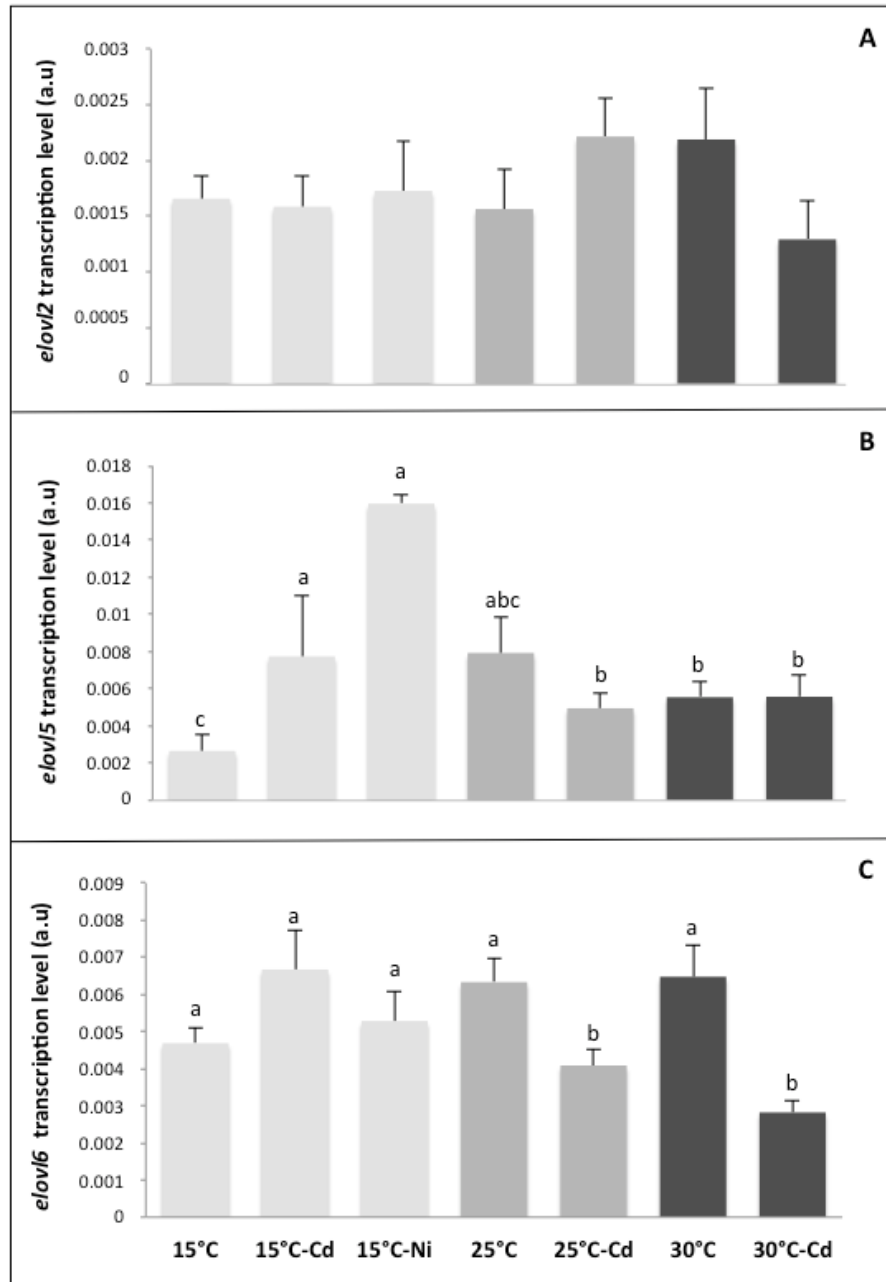


Figure 7

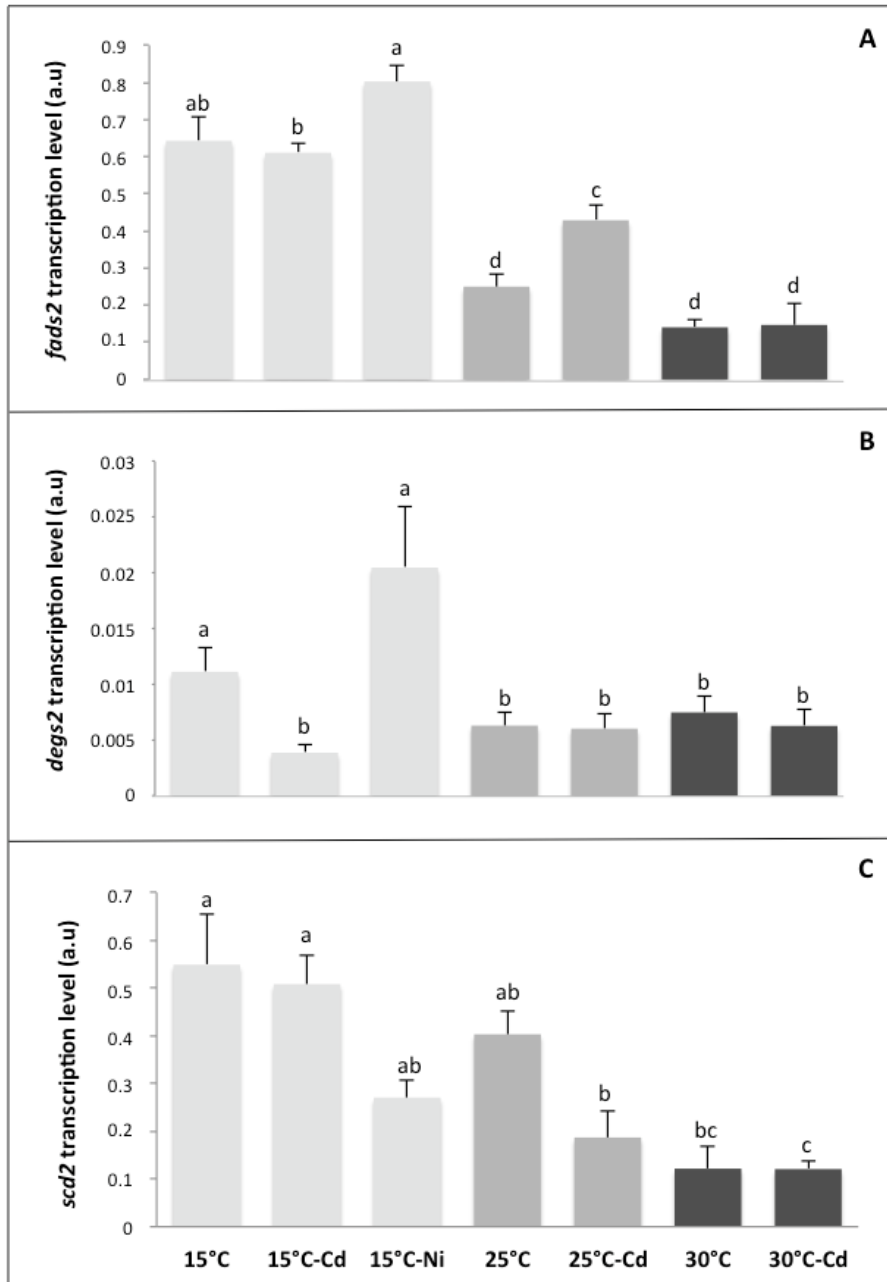
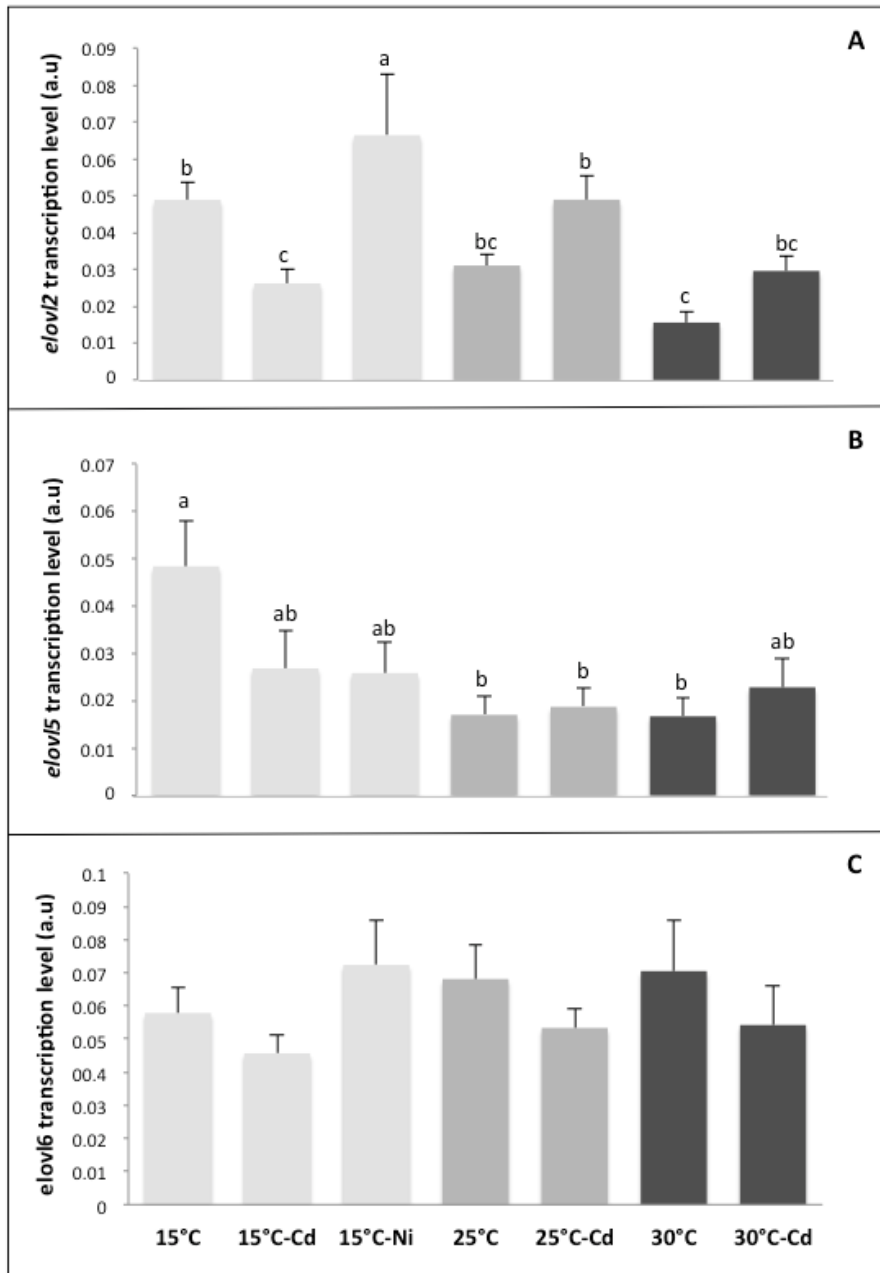


Figure 8



Article 3

Combined effects of temperature and aqueous cadmium exposure on oxidative stress and antioxidant capacities in fathead minnow muscle and brain

Mariam Fadhlaoui^a, Fabien Pierron^b and Patrice Couture^a

^a Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490, rue de la Couronne, Québec, Québec G1K 9A9, Canada

^b Univ. Bordeaux, CNRS, EPOC 5805, Talence, France.

Abstract

Cadmium (Cd), a non-essential metal, has different deleterious effects on aquatic organisms that are in part related to its ability to induce oxidative stress. Temperature variation has been shown to modify Cd toxicity. In this study fathead minnows were acclimated to three increasing temperatures (15, 25 and 30°C) and exposed to dissolved Cd (6 µg/L) for 8 weeks. For each temperature, two groups were acclimated either to temperature or both to temperature and Cd. We investigated transcriptional as well as catalytic responses of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx and GST) and lipid peroxidation measured as malondialdehyde content (MDA). Enzyme activities were higher in the brain compared to the muscle while MDA content was higher in muscle mainly at 15°C and 25°C. Yet Cd affected mostly antioxidant enzymes in the muscle. Lipid peroxidation (LPO) level was mainly affected by temperature and related to the elevated amount of polyunsaturated fatty acids in membranes with temperatures decrease. However, in the brain, despite the higher level of unsaturation, antioxidant enzymes seem to protect neuronal tissues against peroxidation at all temperatures tested and under Cd exposure. The overall result showed an inconsistent trend between transcription level and enzymes activities.

Keywords: temperature, cadmium, oxidative stress, lipid peroxidation and transcription.

1. Introduction

Aquatic organisms are exposed to multiple natural (*e.g.* temperature variations, hypoxia) and chemical stressors (*e.g.* contaminants). Water temperature strongly influences metabolism and affects reactive oxygen species (ROS) production in fish (Bagnyukovaa et al., 2007). Thermal stress can trigger ROS overproduction leading to cell injury. In ectotherms, several mechanisms are involved in oxidative stress induction following variations in temperature. An increase of temperature stimulates metabolic processes, enhancing oxygen consumption and ROS production (Bagnyukovaa et al., 2007; Lushchak and Bagnyukova, 2006b). Although a lower metabolic rate at low temperatures could reduce the risk of oxidative stress, under some circumstances low temperature also induces oxidative stress (Malek et al., 2004b). Furthermore, temperature affects biological membrane composition and various physiological processes that may increase the susceptibility of membrane phospholipids to lipid peroxidation (Crockett, 2008b; Grim et al., 2010). In cold-acclimated fish, the proportion of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) within membrane phospholipids increases in order to adjust fluidity (Cossins and Prosser, 1978; Hazel, 1995; Hazel and Williams, 1990b). Phospholipids containing higher proportions of LC-PUFA are more prone to lipid peroxidation (LPO) (Catala, 2006; Cosgrove et al., 1987; Norris et al., 2012). Since cold acclimated fish increase their oxidative capacity (Guderley, 2004) they may face a higher risk of LPO.

To cope with ROS production, cells possess highly efficient enzymatic antioxidant machinery, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S transferase (GST) (Fig. 1). Superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) are a dominant form of ROS. Under normal conditions, once produced, they are rapidly scavenged by SOD leading to H_2O_2 formation that is eliminated then either by CAT, GPx or GST (Fig. 1). If ROS production exceeds antioxidant capacity, oxidative damage occurs and can lead to cell dysfunction. LPO is the most common consequence of injury caused by ROS. It occurs when PUFA are attacked by ROS (mainly HO^{\cdot}), leading to a chain reaction altering cell membrane integrity and function (Kühn and Borchert, 2002). The

products of LPO are usually unstable. The most common method to assess LPO is the measure of end products such as malondialdehyde (MDA) (Claeson et al., 2001). Furthermore, LPO products may form DNA adducts leading to mutations and altered gene expression (Marnett, 1999).

The influence of temperature on metal uptake and toxicity in aquatic organisms has been known for decades (Cairns et al., 1975a). The uptake rate of metals increases with temperature in ectotherms, mainly due to an elevation of their metabolic rate (reviewed in Sokolova and Lannig (2008)). Several studies have demonstrated in different aquatic organisms that Cd accumulation increases with temperature (Fadhlaoui and Couture, 2016; Grasset et al., 2016; Mubiana and Blust, 2007; Wang et al., 2005).

Cadmium is a highly toxic nonessential metal, readily accumulated by aquatic organisms through dietary and aqueous uptake using calcium channels of gill and gut epithelial cell membranes (Chowdhury et al., 2004; Szebedinszky et al., 2001). A variety of Cd-induced toxicity mechanisms have been identified. Once inside the body, Cd acts at various levels, inducing DNA strand breaks, chromosome aberrations (Beyersmann and Hechtenberg, 1997), alteration of gene transcription (Tully et al., 2000), tissue damage and cell death (Daniel et al., 2004; Yang et al., 2007). Cadmium is also indirectly involved in ROS generation due to its ability to inhibit the electron transfer chain (Wang et al., 2004).

In our earlier studies in yellow perch (Fadhlaoui and Couture 2016; Fadhlaoui et al submitted), we demonstrated that temperature and Cd affected membrane composition and antioxidant defense systems. In spite of the high muscle membrane polyunsaturation in cold acclimated fish, antioxidant enzymes acted cooperatively to protect membranes against LPO. In fathead minnow, we showed not only a modification of membrane composition under temperature and Cd exposure, but also that brain was a PUFA-rich tissue and that this may increase the risk to LPO. Therefore, to investigate multiple stressor effects and to provide interspecific comparison we aimed in this study to investigate, in fathead minnow muscle and brain, the combined effects of

temperature and aqueous Cd exposure *i*) on the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx and GST) and on the transcription level of their corresponding genes (*sod-1*, *cat*, *gpx* and *gst*) and *ii*) on LPO using MDA as an indicator; and finally *iii*) to examine the relationships between transcription level, antioxidant enzyme activities and LPO related to membrane fatty acid composition.

2 Materials and methods

4.1 Fish and experimental design

Adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) were obtained from Aquatic Research Organisms (ARO, Hampton (NH), USA). Upon reception at the INRS-ETE, fish were acclimated to laboratory conditions for 8 weeks at 25°C with a 16h/8h day/night photoperiod and fed once a day daily with the same amount of frozen brine shrimp (*Artemia salina*, Ocean Nutrition). Following acclimation, fish were randomly distributed in six 45L aquaria (n=22 per aquarium). Physico-chemical parameters (pH, temperature, nitrites and nitrates) were controlled daily and 30% of aquarium water was renewed twice a week with reconstituted water according to Lapointe et al. (2011). Temperature was reduced or raised in two aquaria at a rate of 2°C per day to reach a low (15°C) and a high (30°C) temperature. When desired temperatures were reached, Cd from a stock solution (ICP-AES standard, 1000 µg/ml) was added to 3 aquaria to reach a nominal concentration of 6 µg/L and this concentration could be found in contaminated environments. Aqueous Cd concentrations were analysed by ICP-MS after each water change to maintain target concentration (5.7 ± 0.35 µg/L (n=59)). The experimental design yielded six conditions as follows: 15°C, 15°C+Cd, 25°C, 25°C+Cd, 30°C and 30°C+Cd. After 8 weeks of exposure, fish were sacrificed and biometric measures (length and weight) were taken. Six fish were randomly selected for enzyme assays, gene transcription and MDA quantification in muscle and brain. Given the small size of fathead minnow brain, all analyzes could not be carried out on the same samples. Therefore, a second group of six fish was selected to perform gene transcription

analysis. Muscle and brain samples were stored at -80°C for enzymatic analysis, while those for quantitative real time PCR (RT-qPCR) measurements were stored in RNAlater[®].

2. 2 Enzyme assays

Enzyme activities were measured using a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary 100; Varian Inc., Palo Alto, CA) with 96-well microplates at room temperature (24°C). The activity of GST (EC 2.5.1.18) was measured according to Habig et al. (1974) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as a substrate. The absorbance of the product S-(2,4-dinitrophenyl) glutathione was recorded at 340 nm. GST activity was expressed in IU (μmol of substrate converted to product per min) per g of muscle or brain tissue (wet weight) using an extinction coefficient of 9.6 mM cm^{-1} .

The activities of SOD, CAT and GPx were determined using assay kits (Nos. 706002, 707002 and 703102, respectively) purchased from Cayman Chemical Company Inc. (Ann Arbor, Michigan USA) in supernatants obtained by centrifugation of homogenates at 5000 g for 5 min, 10 000 g for 15 min or 10 000 g for 15 min at 4°C for SOD, CAT and GPx respectively. Activities were expressed as UI mg protein^{-1} . SOD activity (EC 1.15.1.1) was determined by the detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine (one unit of SOD represents the amount of enzyme required for 50% dismutation of superoxide radicals). CAT (EC 1.11.1.6) activity was determined using a colorimetric assay by measuring formaldehyde formed with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole as chromogen. GPx activity (EC 1.11.1.9) was determined by the measure of NADP^{+} absorbance decrease which is directly proportional to GPx activity.

2. 3 Protein determination

Protein concentrations were measured in muscle and brain homogenates according to the dye-binding procedure of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard. Absorbance was measured at 580 nm and protein concentration was expressed as mg protein per g wet weight.

2. 4 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was assessed as produced malondialdehyde (MDA) and was determined by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to the instructions of an assay kit (10009055) purchased from Cayman Chemical Company Inc. (Ann Arbor, Michigan USA). Muscle and brain samples (25 mg) were homogenised and homogenates were centrifuged at 1,600 g for 10 min at 4°C. During incubation at 100°C, MDA in samples reacted with thiobarbituric acid (TBA) to generate the MDA-TBA adduct. MDA was measured by colorimetry at 530 nm. The concentration was expressed as nmol/mg protein.

2. 5 Gene level transcription analysis

Total RNA was extracted from 20 mg muscle or whole brain using Absolutely RNA RT-PCR (Miniprep Kit-Agilent) according to the manufacturer's instructions. Extract quality was evaluated by electrophoresis on a 1% agarose gel. The RNA concentration and purity were determined by spectrophotometry (Nanodrop 8000). First-stand cDNA was synthesised from 400 ng of total brain and muscle RNA using GoScript Reverse Transcription System (Promega) according to manufacturer's instructions. Then, cDNA was diluted and real time PCR reactions were performed in an MX3000P (Stratagene; 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30 s and 72°C for 30 s). Each 20 µL reaction contained 12.5 µL of GoTaq qPCR master mix (Promega), 5 µL template and the specific primer pairs (available in Lapointe et al., 2011) at a final concentration of 250 nM each. Relative quantification of gene expression was achieved by concurrent amplification of the *β-actin* endogenous control. Hence, during our experiment, total RNAs were quantified and 400 ng was used to be reverse-transcribed. During the subsequent qPCR amplifications, the output cycle corresponding to the *β-actin* was examined. No significant difference was observed on the output cycle of *β-actin* among fish groups, demonstrating the relevance of *β-actin* as reference gene.

2. 6 Membrane fatty acid composition

The composition of phospholipid fatty acids muscle was determined using gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID, Agilent Technologies, 7890D GC system) as reported in our previous study (Fadhlaoui et al., submitted). Data from that study were used to investigate relationships between membrane composition, enzymes activities and LPO only in the muscle. In the brain, due to their small size, we used different samples, so we cannot perform correlations.

2. 7 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM ($n = 6$) and statistical analyzes were made with JMP 11.0.0 (SAS Institute Inc.). Comparisons among mean values from different stressor combinations were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) after checking assumptions of normality (Kolmogorov-Smirnov) and homoscedasticity of the error terms (Levene). When the assumptions were not met as deduced from ad-hoc tests, a Wilcoxon/Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test was applied. If significant effects were detected, the Tukey-Kramer HSD was used to determine whether means between pairs of samples were significantly different from one another. As different parameters were measured in the same muscle sample, Spearman correlations were performed to investigate correlations among the various parameters monitored. A principal component analysis (PCA) was performed to highlight relationships among tested parameters. The resulting biplot represented projections on extracted principal components and two-dimensional loadings of tested parameters as arrows. The parameter significance is represented by arrow length and direction relative to plotted components. Finally, the interactions of temperature and Cd on enzymatic activities, gene transcription and MDA content were determined by two-way ANOVA. Statistical analyses were made with JMP 11.0.0 (SAS Institute Inc.).

3. Results

3.1 Effects of temperature, Cd and cell membrane composition on antioxidant enzyme activity

In muscle, no significant effect of temperature was observed on SOD activity at any of the three temperatures. At 15°C, Cd exposure increased SOD activity while at 25°C, the opposite occurred (Fig. 2A). The two-way ANOVA analysis showed that SOD was affected by the interaction of temperature and Cd (Table 2). A significant increase of CAT activity was recorded at 30°C compared to 25°C, whereas Cd had no significant effect at any tested temperatures (Fig. 2B). GPx activity also was greater at 30°C compared to 25°C but was reduced by Cd exposure at the same temperature (Fig. 2C), a result of a combined effect of temperature rise and Cd exposure (Table 2). Contrary to CAT and GPx, a significant decrease of GST activity was found in fish acclimated to 30°C compared to the lower temperatures but its activity was not affected by Cd exposure (Fig. 2D). Moreover, it was negatively correlated to CAT activity (Table 3).

Spearman correlation analysis revealed several correlations between antioxidant enzyme activities and membrane fatty acid composition (Table 3). CAT and GPx displayed positive correlations with SFA and MUFA, contrary to GST that was negatively correlated to the same FA groups. The opposite was observed for PUFA that was negatively correlated to CAT and GPx but positively correlated to GST.

In the brain, the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx and GST) were higher compared to muscle except for CAT and GPx at 25 and 30° respectively C (Fig. 2). The effects of temperature and Cd on these enzymes also differed from those observed in muscle. In the brain, SOD activity increased at 25 and 30°C compared to 15°C (Fig. 2A) and although it was not affected by Cd at any of the three temperatures tested, there was a significant interaction of Cd and temperature on SOD activity (Table 4). In contrast, CAT activity decreased with rising temperature to reach the lowest value at 30°C and was not affected by Cd exposure (Fig. 2B). The activity of GPx also decreased slightly, but not significantly, at 30°C compared to 15°C. Contrary to SOD and CAT, GPx decreased in Cd-exposed fish at 30°C (Fig. 2C). The activity of GST was not significantly

affected by either temperature or Cd. It decreased slightly, but not significantly, in Cd-exposed fish at 30°C (Fig. 2D). Compared to muscle, there were fewer, and different, correlations among antioxidant enzyme activities in the brain. CAT and SOD were negatively correlated (Spearman correlation, $p=0.047$, $\rho= 0.33$), while CAT and GPx were positively correlated ($p=0.042$, $\rho= 0.46$) as well as GST and GPx ($p=0.051$, $\rho= 0.45$).

3.2 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation, assessed as MDA concentration, was approximately three-fold higher in muscle compared to brain (Fig. 3). In muscle, MDA concentration decreased significantly at 30°C compared to 15 and 25°C and was not affected by Cd exposure (Fig.3). In the brain, MDA also decreased at 30°C, but contrary to muscle, it was negatively affected by Cd exposure, although only at 15°C (Fig. 3). Spearman correlation analyses in the muscle revealed that MDA concentration was positively correlated to GST activity and negatively to Cd concentration. We also examined the influence of membrane fatty acid composition on MDA concentration in muscle. More polyunsaturated muscle membrane fatty acids were more prone to LPO, as indicated by positive correlations between MDA, PUFA and eicosapentanoic acid (EPA, 20:5n3). Conversely, MDA concentration significantly decreased with increases of SFA and MUFA (Table 3).

3.3 Effects of temperature and Cd on antioxidant enzyme transcription level

In the muscle, a significant decrease of *sod-1* transcription level was found at 30°C but it increased in Cd exposure at the same temperature (Fig. 4A), a result of combined effect of temperature rise and Cd exposure (Table 2). However, *cat* transcription level showed a significant increase at 30°C. It increased also in Cd-exposed fish at 15 and 30°C compared to control fish (Fig. 4B). The two-way ANOVA detected a combined effect of temperature and Cd exposure on *cat* transcription level (Table 2). Contrary to *sod-1* and *cat*, *gpx* transcription level decreased at 25°C compared to 30°C. However, it increased

in Cd-exposed fish at 15 and 25°C (Fig. 4C). As for *cat*, *gst* transcription level increased significantly in warmer exposed fish but it was not affected by Cd exposure (Fig. 4D). In the brain, *sod* transcription level decreased significantly at 30°C, and in Cd-exposed fish at 25°C (Fig. 4A). The two-way ANOVA analysis showed that *sod* transcription level was affected by the interaction of temperature and Cd (Table 4). Neither temperature nor Cd exposure affected *cat* transcription level (Fig. 4B). As for *sod*, *gpx* transcription level decreased significantly in the warmer temperature and under Cd exposure at 15 and 25°C (Fig. 4C). Same for *gst* transcription level that decreased at 30°C but was not affected by Cd exposure (Fig. 4D).

3. 4 Relationships among antioxidant capacities, gene transcription and lipid peroxidation

The PCA performed on antioxidant defense enzyme activities and the transcription levels of their corresponding genes, MDA and Cd concentration in the muscle extracted two main factors that explained 87.8% of the total variance (Fig. 5). The first axis (71.5% of total variance) appeared to be associated to temperature specific responses, and SOD, CAT, GST and MDA were mainly related to temperature. The second axis (19.3% of total variance) separated fish according Cd exposure and *sod*, *gpx* and GPx were mostly affected by Cd.

4. Discussion

In our previous study, we showed that Cd concentrations in muscle increased significantly with temperature. In the brain, however, Cd concentrations were markedly higher at 25°C compared to 15°C and 30°C (Fadhlaoui et al., submitted). This finding agrees with previous findings demonstrating that metabolic rate increases at higher temperatures leading to higher metal bioaccumulation levels (Lannig et al., 2006; Portner, 2002). However, in the brain, we have demonstrated that Cd concentration was

significantly higher only at 25°C, in this case, Cd accumulation may be related to other complex mechanisms.

4. 1 Effects of temperature and Cd on antioxidant capacities

In the muscle of fathead minnows, CAT, GPx and GST activities were sensitive to temperature increase particularly at 30°C, a temperature outside of their optimum tolerance interval. CAT and GPx activities were positively correlated with temperature, whereas GST decreased with increasing temperatures. It was demonstrated that enhanced respiration, oxygen consumption and metabolic rate (Sollid et al., 2005) under elevated temperatures trigger oxidative stress in poikilotherms (Bagnyukova et al., 2003; Heise et al., 2006). In our study, antioxidant enzymes showed an efficient response to thermal stress to cope with ROS production under warm conditions and cooperative action highlighted by the correlation between CAT and GPx activities. There is no consistent trend across species, and previous studies showed different responses following temperature acclimation. In our previous study on yellow perch (*Perca flavescens*) acclimated to 9 and 28°C, CAT and GPx activities in the muscle were insensitive to temperature increase contrasting with the observed changes in enzymes activities in this study (Fadhlaoui and Couture, 2016). In the muscle of seabass, (*Dicentrarchus labrax*), CAT activity increased at 24°C compared to 18°C (Vinagre et al., 2012). Moreover, in the muscle of several fish species (*Diplodus vulgaris*, *Diplodus sargus*, *Dicentrarchus labrax*, *Gobius niger* and *Liza ramada*), temperature increase affected CAT and GST activities (Madeira et al., 2013). Yet, as shown in our studies, several studies have demonstrated that SOD activity does not appear to be affected by temperature increase (Bagnyukovaa et al., 2007; Fadhlaoui and Couture, 2016; Grim et al., 2010).

In the brain, the opposite trend was observed, yet, SOD activity increased, CAT decreased at the warmer temperature and GPx as well as GST were insensitive to temperature increase. As in the muscle, SOD activity could be high enough for dismutating superoxide anion; its decrease in cold acclimated fish may be compensated by an increase of reduced glutathione that can scavenge ROS. Contrary to our findings,

Bagnyukovaa et al. (2007) showed that glutathione-dependent enzymes were higher in goldfish brain at 23°C. In our fathead minnows, there was not a clear trend to thermal stress and antioxidant enzymes were induced at elevated and at low temperature in the brain. In the two cases, antioxidant enzymes increase highlighted a response to ROS excessive production in order to protect organisms against ROS-induced damage mainly LPO. Yet, different patterns of responses suggest that thermal response is tissue-specific.

The observed decrease of SOD and GPx activities in Cd-exposed fish, respectively at 25 and 30°C, did not agree with previous studies showing an induction of these enzymes (Almeida et al., 2002; Banaee et al., 2015; Ghazie A. Al-Sawafi and Yan, 2013). In our study, the observed decrease was due to temperature and Cd interaction. Hence, elevated temperature and Cd concentration probably altered enzyme structure leading to activity decrease. In their study, Wang et al. (2015) investigated Cd effect on antioxidant enzymes and suggested that Cd induced a misfolding of SOD and CAT proteins, and consequently altered their enzymatic activities.

4. 2 Effects of temperature and Cd on antioxidant gene transcription levels

In the muscle, temperature affected the transcription level of genes. The higher values of *sod-1* and *gst* transcription level respectively at 15 and 30°C were not accompanied by changes in enzyme activities. This suggests that SOD and GST are not controlled at the level of transcription but rather at the post-transcriptional and/or post-translational level. This observation agrees with previous studies supporting that high temperature can induce antioxidant gene transcription (Habte-Tsion et al., 2016; Zhou et al., 2010) or the opposite at low temperature (Malek et al., 2004b). Our results suggest that the mismatch between gene transcription and enzyme activity might be related to a modification of enzyme structure or to indirect mechanisms like the reduction of heme group availability, that allows the enzyme to react with hydrogen peroxide (Benedetti et al., 2009). In the brain, with the exception of *cat*, antioxidant enzyme transcription level was elevated at the lowest temperatures, in agreement with

previous studies demonstrating that cold temperatures cause oxidative stress and up-regulate genes involved in the fight against oxidative stress (Gracey et al., 2004; Kammer et al., 2011; Malek et al., 2004a).

Exposure to Cd modified *sod-1*, *cat* and *gpx* transcription levels in the muscle. It has been demonstrated that genes encoding for antioxidant enzymes are among other factors, controlled by the transcription factor Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2) (Giuliani and Regoli, 2014; Jiang et al., 2014). Under stress conditions, after a series of activation events, Nrf2 induce the transcription of antioxidant genes (Niture et al., 2009). In recent studies, it was demonstrated that Cd activates Nrf2 (Wang and Gallagher, 2013; Zheng et al., 2016b) and this finding supports our results on *sod-1*, *cat* and *gpx* in the muscle at elevated temperature. However, we found different effects of Cd exposure in the brain, since *sod-1* and *gpx* were down regulated at 25°C. A significant bioaccumulation of Cd in brain in response to Cd exposure was observed only at 25°C. Indeed, ROS can induce transcription of antioxidant genes under stress conditions through the interaction with antioxidant responsive element (ARE), mediated primary by Nrf2 transcription factor (Moi et al., 1994). Unlike our study, others investigating the effect of metal exposure on antioxidant enzymes as well as their corresponding gene transcription demonstrated a significant correlation between metal concentration and gene transcription level (Craig et al., 2007; Hansen et al., 2007; Zheng et al., 2016a). Yet, in our study, temperature, Cd exposure or their interaction had different effects on antioxidant enzymes genes transcription that did not, in most cases, coordinate with their corresponding activities. Previous studies on several fish species exposed to various contaminants were in agreement with our results and revealed inconsistent relationship between gene transcription and enzymatic activities (Agostini et al., 2011; Craig et al., 2007; Giuliani et al., 2013). The mismatch between gene transcription and enzyme activities confirm that antioxidant enzymes did not vary in a similar way, and have different activation time (Frenzilli et al., 2004).

4.3 Influence of temperature and Cd exposure on lipid peroxidation in relation with antioxidant capacities and membrane composition

Temperature variation is accompanied by ROS production that attacks all cellular constituents (Lushchak and Bagnyukova, 2006a, b). The maintenance of membrane fluidity requires a higher degree of polyunsaturated fatty acids (Fadhlaoui and Couture, 2016; Fadhlaoui et al., submitted; Hazel, 1984, 1995). PUFA are a prime target for ROS attack. In this study, we found that in muscle, MDA content was higher at 15 and 25°C. In our previous study, we determined the membrane fatty acid composition in the same samples and we found that at 15 and 25°C (with or without Cd exposure) PUFA percentage was higher than in warmer-acclimated fish (Fadhlaoui et al., submitted). The correlations between MDA and PUFA demonstrated that membrane remodelling enhanced the susceptibility to LPO. Several studies investigating waterborne Cd exposure have demonstrated an increase of MDA level (Jin et al., 2015; Vergauwen et al., 2013) while we suggested that MDA levels were mainly related to membrane PUFA and mostly to temperature variation. At warmer temperature, the low MDA content may be related to other compounds that mitigated LPO damage as lipophilic antioxidants (Niki et al., 1989). The PCA analysis showed that MDA, *sod-1* and *gpx* were grouped together. It seems that lipid peroxidation products may be involved in triggering the regulation of some antioxidant enzymes as proposed by Lushchak and Bagnyukova (2006b) on goldfish, *Carassius auratus*, suggesting a regulation via redox-sensitive transcriptional factors like AP-1 and NFκB.

In the brain, it seems that antioxidant defense was more efficient. Correlations between antioxidant enzymes underlie the cooperative action to cope with oxidative stress. At the warmer temperature, the decrease of GPx and GST was partially compensated by CAT activity increase as cooperative mechanism to remove H₂O₂. Thus, brain is a lipid-rich tissue and contains a great amount of LC-PUFA, particularly arachidonic acid (ARA, 20:4n6), docosahexaenoic acid (DHA, 22:3n6) and EPA. They perform several crucial roles and their alteration or deficiency can lead to the alteration of physical membrane properties, membrane enzyme activities, cellular signalling and

interaction (reviewed in (Lauritzen et al., 2001)). In our previous study, we showed that muscle and brain have different membrane fatty acids composition (Fadhlaoui and Couture, 2016). Surprisingly, in this study, despite the high unsaturation degree in brain, its MDA concentration was about 2 to 4 fold lower than in muscle. This suggests that the increase of antioxidant enzyme activity in brain was sufficient to deal with enhanced ROS production and to protect membrane fatty acids against LPO.

Overall, muscle appears to respond differently to stress caused by temperature and Cd exposure compared to the brain. Indeed, the difference between the two organs may be related to several factors such as susceptibility to oxidants and to antioxidant enzyme activation, antioxidant levels, and other repair systems. Furthermore, this difference indicated that fish developed tissue-specific adaptive responses to protect the most vulnerable tissues against oxidative stress. Our finding didn't agree with some previous studies that have shown that in the brain of rotan (*Perccottus glenii*) under different temperature (19 and 32°C) LPO increases with thermal stress (Bagnyukova et al., 2007). Furthermore, in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different concentration of Cd, lipid peroxidation, evaluated as thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) formation, was higher in Cd-exposed fish brain compared to controls (Pretto et al., 2010). It is therefore important to consider that the response to thermal stress may be species dependent and that several factors may be involved such as metal concentrations and exposure duration. The effect of interactions among stressors should be considered in subsequent studies and other enzymes should be studied to understand their implication in membrane protection against LPO.

References

- Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., Novelli, E.L., 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment international* 27, 673-679.
- Bagnyukova, T.V., Danyliv, S.I., Zin'ko, O.S., Lushchak, V.I., 2007. Heat shock induces oxidative stress in rotan *Perccottus glenii* tissues. *Journal of Thermal Biology*, 32:, 255-260.
- Bagnyukova, T.V., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2003. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. *J Therm Biol* 28, 21-28.
- Bagnyukovaa, T.V., Lushchaka, O.V., Storeyb, K.B., Lushchaka, V.I., 2007. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23 °C. *J Therm Biol* 32, 227–234.
- Banaee, M., Mehrpak, M., Haghi, N.B., Noori, A., 2015. Amelioration of cadmium-induced changes in biochemical parameters of the muscle of Common Carp (*Cyprinus carpio*) by Vitamin C and Chitosan. *International Journal of Aquatic Biology* 2 362-371.
- Benedetti, M., Fattorini, D., Martuccio, G., Nigro, M., Regoli, F., 2009. Interactions between trace metals (Cu, Hg, Ni, Pb) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*: oxidative effects on biotransformation pathway. *Environ Toxicol Chem* 28, 818-825.
- Beyersmann, D., Hechtenberg, S., 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 144, 247-261.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Cairns, J., Heath, G.A., Parker, B.C., 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiolog* 47, 135–171.
- Catala, A., 2006. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell B* 38, 1482-1495.
- Chowdhury, M.J., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2004. Gastrointestinal uptake and fate of cadmium in rainbow trout acclimated to sublethal dietary cadmium. *Aquat Toxicol* 69, 149-163.
- Claeson, K., Thorsen, G., Karlberg, B., 2001. Methyl malondialdehyde as an internal standard for the determination of malondialdehyde. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 751, 315-323.

- Cosgrove, J.P., Church, D.F., Pryor, W.A., 1987. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 22, 299-304.
- Cossins, A.R., Prosser, C.L., 1978. Evolutionary adaptation of membranes to temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2040-2043.
- Craig, P.M., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2007. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 293, R1882-1892.
- Crockett, E.L., 2008. The cold but not hard fats in ectotherms: consequences of lipid restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review. *J Comp Physiol B* 178, 795-809.
- Daniel, S., Limson, J.L., Dairam, A., Watkins, G.M., Daya, S., 2004. Through metal binding, curcumin protects against lead- and cadmium-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates and against lead-induced tissue damage in rat brain. *J Inorg Biochem* 98, 266-275.
- 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., submitted. Temperature and metal exposure affect membrane fatty acid composition and transcription of desaturases and elongases in fathead minnow muscle and brain.
- Frenzilli, G., Bocchetti, R., Pagliarecci, M., Nigro, M., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Regoli, F., 2004. Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Mar Environ Res* 58, 609-613.
- Ghazie A. Al-Sawafi, A., Yan, Y., 2013. Alterations of Acetylcholinesterase Activity and Antioxidant Capacity of Zebrafish Brain and Muscle Exposed to Sublethal Level of Cadmium. *International Journal of Environmental Science and Development* 4, 327-330.
- Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., Regoli, F., 2013. Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures. *Aquat Toxicol* 134-135, 120-127.
- Giuliani, M.E., Regoli, F., 2014. Identification of the Nrf2-Keap1 pathway in the European eel *Anguilla anguilla*: role for a transcriptional regulation of antioxidant genes in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 150, 117-123.
- Gracey, A.Y., Fraser, E.J., Li, W., Fang, Y., Taylor, R.R., Rogers, J., Brass, A., Cossins, A.R., 2004. Coping with cold: An integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16970-16975.

- Grasset, J., Ollivier, É., Bougas, B., Yannic, G., Campbell, P., Bernatchez, L., Couture, P., 2016. Combined effects of temperature changes and metal contamination at different levels of biological organization in yellow perch. *Aquat. Toxicol.* 177, 324-332.
- Grim, J.M., Miles, D.R., Crockett, E.L., 2010. Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. *J Exp Biol* 213, 445-452.
- Guderley, H., 2004. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 79, 409-427.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249, 7130-7139.
- Habte-Tsion, H.M., Ren, M., Ge, X., Kumar, V., Liu, B., Xie, J., Chen, R., 2016. Increase in temperature affects the growth, immune, and antioxidant status and hepatopancreatic gene expressions of antioxidant enzymes and heat-shock proteins of blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* fry. *Science & Technology* 2, 408-426.
- Hansen, B.H., Romma, S., Garmo, O.A., Pedersen, S.A., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., 2007. Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere* 67, 2241-2249.
- Hazel, J.R., 1984. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Am J Physiol* 246, R460-470.
- Hazel, J.R., 1995. Thermal Adaptation in Biological-Membranes - Is Homeoviscous Adaptation the Explanation. *Annu Rev Physiol* 57, 19-42.
- Hazel, J.R., Williams, E.E., 1990. The Role of Alterations in Membrane Lipid-Composition in Enabling Physiological Adaptation of Organisms to Their Physical-Environment. *Prog Lipid Res* 29, 167-227.
- Heise, K., Puntarulo, S., Nikinmaa, M., Abele, D., Portner, H.O., 2006. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. *J Exp Biol* 209, 353-363.
- Jiang, W.D., Liu, Y., Hu, K., Jiang, J., Li, S.H., Feng, L., Zhou, X.Q., 2014. Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (CuZnSOD) signaling in the fish brain: protective effects of myo-inositol. *Aquat Toxicol* 155, 301-313.
- Jin, Y., Liu, Z., Liu, F., Ye, Y., Peng, T., Fu, Z., 2015. Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol* 48, 9-17.

- Kammer, A.R., Orczewska, J.I., O'Brien, K.M., 2011. Oxidative stress is transient and tissue specific during cold acclimation of threespine stickleback. *J Exp Biol* 214, 1248-1256.
- Kühn, H., Borchert, A., 2002. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: The interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radical Bio Med* 33, 154-172.
- Lannig, G., Cherkasov, A.S., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent effects of cadmium on mitochondrial and whole-organism bioenergetics of oysters (*Crassostrea virginica*). *Mar Environ Res* 62 Suppl, S79-82.
- Lapointe, D., Pierron, F., Couture, P., 2011. Individual and combined effects of heat stress and aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 104, 80-85.
- Lauritzen, L., Hansen, H.S., Jorgensen, M.H., Michaelsen, K.F., 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 40, 1-94.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006a. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 143, 30-35.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006b. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 143, 36-41.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Vinagre, C., Diniz, M.S., 2013. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 166, 237-243.
- Malek, R.L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy, M.A., Gerhard, G.S., 2004a. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 138, 363-373.
- Malek, R.L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy, M.A., Gerhard, G.S., 2004b. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 138, 363-373.
- Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res-Fund Mol M* 424, 83-95.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., Kan, Y.W., 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9926-9930.

- Mubiana, V.K., Blust, R., 2007. Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res* 63, 219-235.
- Niki, E., Yamamoto, Y., Takahashi, M., Komuro, E., Miyama, Y., 1989. Inhibition of oxidation of biomembranes by tocopherol. *Annals of the New York Academy of Sciences* 570, 23-31.
- Niture, S.K., Jain, A.K., Jaiswal, A.K., 2009. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci* 122, 4452-4464.
- Norris, S.E., Mitchell, T.W., Else, P.L., 2012. Phospholipid peroxidation: lack of effect of fatty acid pairing. *Lipids* 47, 451-460.
- Portner, H.O., 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 132, 739-761.
- Pretto, A., Loro, V.L., Morsch, V.M., Moraes, B.S., Menezes, C., Clasen, B., Hoehne, L., Dressler, V., 2010. Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. *Arch Environ Contam Toxicol* 58, 1008-1014.
- Sokolova, I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implication of global climate change. *Clim Res* 37, 181-201.
- Sollid, J., Weber, R.E., Nilsson, G.E., 2005. Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*. *J Exp Biol* 208, 1109-1116.
- Szebedinszky, C., McGeer, J.C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2001. Effects of chronic Cd exposure via the diet or water on internal organ-specific distribution and subsequent gill Cd uptake kinetics in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 20, 597-607.
- Tully, D.B., Collins, B.J., Overstreet, J.D., Smith, C.S., Dinse, G.E., Mumtaz, M.M., Chapin, R.E., 2000. Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 168, 79-90.
- Vergauwen, L., Hagenars, A., Blust, R., Knapen, D., 2013. Temperature dependence of long-term cadmium toxicity in the zebrafish is not explained by liver oxidative stress: evidence from transcript expression to physiology. *Aquat Toxicol* 126, 52-62.

- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Diniz, M., 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecol Indic* 23, 274-279.
- Wang, J., Chuang, C.Y., Wang, W.X., 2005. Metal and oxygen uptake in the green mussel *Perna viridis* under different metabolic conditions. *Environ Toxicol Chem* 24, 2657-2664.
- Wang, J., Zhang, H., Zhang, T., Zhang, R., Liu, R., Chen, Y., 2015. Molecular mechanism on cadmium-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. *Int J Biol Macromol* 77, 59-67.
- Wang, L., Gallagher, E.P., 2013. Role of Nrf2 antioxidant defense in mitigating cadmium-induced oxidative stress in the olfactory system of zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol* 266, 177-186.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S.S., Rao, K.M., 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* 36, 1434-1443.
- Yang, P.M., Chen, H.C., Tsai, J.S., Lin, L.Y., 2007. Cadmium induces Ca²⁺-dependent necrotic cell death through calpain-triggered mitochondrial depolarization and reactive oxygen species-mediated inhibition of nuclear factor-kappaB activity. *Chem Res Toxicol* 20, 406-415.
- Zheng, J.L., Yuan, S.S., Wu, C.W., Li, W.Y., 2016a. Chronic waterborne zinc and cadmium exposures induced different responses towards oxidative stress in the liver of zebrafish. *Aquat Toxicol* 177, 261-268.
- Zheng, J.L., Yuan, S.S., Wu, C.W., Lv, Z.M., 2016b. Acute exposure to waterborne cadmium induced oxidative stress and immunotoxicity in the brain, ovary and liver of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 180, 36-44.
- Zhou, J., Wang, L., Xin, Y., Wang, W., He, W.Y., Wang, A.L., Liu, Y., 2010. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J Therm Biol* 35, 284-289.

Table 1: Primers used for antioxidant enzymes transcription analysis by RT-qPCR.

Gene	Forward primers (5'–3')	Reverse primers (3'–5')
<i>actin</i>	CACCATGTACCCTGGCATTG	GATCTTAATTTTCATGGTGGGAAGGA
<i>gpx</i>	TCCAGGAAATGCCTTTGAAC	TGACCCAATGACCTTCATGA
<i>cat</i>	TTATCAGGGATGCGCTTCTGT	TTCACATGAGTCTGCGGATTTC
<i>sod</i>	CCAGACATGTCGGAGACCTT	ATGGAATGTTGCCCTGAGAG
<i>gst</i>	CCGGGCAGTGCGAGAA	TCAACACCTCCTTTGCAACTTTTA

Table 2: Combined effects of temperature and Cd exposure on antioxidant enzyme activities, relative transcription levels of corresponding genes and lipid peroxidation (expressed as malondialdehyde) in fathead minnow muscle as determined by two-way ANOVA analysis. Bold values indicate a significant effect of temperature, metal or of their interaction.

	Cd	Temperature	Interaction (Cd x Temperature)
Enzyme activities			
SOD	0.2156	0.1383	0.001
CAT	0.3441	0.0048	0.552
GPx	0.0009	0.0014	<0.0001
GST	0.2963	<0.0001	0.1403
Transcription level			
<i>sod</i>	0.9399	0.2898	0.0253
<i>cat</i>	0.0004	<0.0001	0.0223
<i>gpx</i>	0.0068	0.1181	0.3092
<i>gst</i>	0.5658	0.0162	0.0473
Lipid peroxidation			
MDA	0.07	<0.0001	0.2804

Table 3: Spearman correlations among antioxidant enzyme activities, fatty acid groups (% of total phospholipid fatty acids), specific long-chain polyunsaturated fatty acids, MDA and Cd concentrations in fathead minnow muscle from the various exposure conditions combined (n = 36). Numbers in bold indicate significant correlations. Asterisks denote the significance level of the correlations: *0.05; **0.01; ***0.001.

	SOD	CAT	GPx	GST	SFA	MUFA	PUFA	DHA	EPA	ARA	MDA
SOD	1										
CAT	-0.0618	1									
GPx	-0.1517	0.2423	1								
GST	0.3374	-0.4632*	-0.2509	1							
SFA	-0.2449	0.3621*	0.6434***	-0.6426**	1						
MUFA	-0.2502	0.4821*	0.4819*	-0.5131***	0.7075***	1					
PUFA	0.2152	-0.4105*	-0.5833**	0.6718***	-0.8967***	-0.8207***	1				
DHA	0.2644	-0.3911	-0.3552*	0.5326***	-0.7362***	-0.7401***	0.8088***	1			
EPA	0.249	-0.5044*	-0.3523	0.7229***	-0.6001***	-0.6413***	0.7278***	0.4756**	1		
ARA	0.037	-0.2187	-0.1054	0.1299	-0.2644	-0.485	0.4066	0.2801	0.1941	1	
MDA	0.264	-0.3481	-0.2812	0.5993***	-0.4441**	-0.3826*	0.4714**	0.1941	0.4069*	0.3174	1
Cd	-0.4495	0.0619	-0.2051	-0.3830	0.0672	0.0614	-0.0345	-0.0778	-0.1671	0.0319	-0.4314**

SOD: Superoxide dismutase, **CAT:** catalase, **GPx:** glutathione peroxidase, **GST:** glutathione S transferase, **SFA:** saturated fatty acid, **MUFA:** monosaturated fatty acid, **PUFA:** polyunsaturated fatty acid, **DHA :** Docosahexaenoic acid, **EPA :** Eicosapentaenoic acid, **ARA :** Arachidonic acid, **MDA:** Malondialdehyde, **Cd:** cadmium

Table 4: Combined effects of temperature and Cd exposure on antioxidant enzyme activities, relative transcription levels of corresponding genes and lipid peroxidation (expressed as malondialdehyde) in fathead minnow brain as determined by two-way ANOVA analysis. Bold values indicate a significant effect of temperature, metal or of their interaction.

	Cd	Temperature	Interaction Cd x Temperature
Enzyme activities			
SOD	0.9232	0.0815	0.0361
CAT	0.3441	0.0048	0.552
GPx	0.6528	0.0003	0.1218
GST	0.8073	0.0984	0.1474
Transcription level			
<i>sod</i>	0.0072	0.0582	0.028
<i>cat</i>	0.8692	0.0253	0.0573
<i>gpx</i>	0.0128	0.0165	0.2274
<i>gst</i>	0.2583	0.1584	0.5386
Lipid peroxidation			
MDA	0.4163	0.017	0.1922

Figure 1

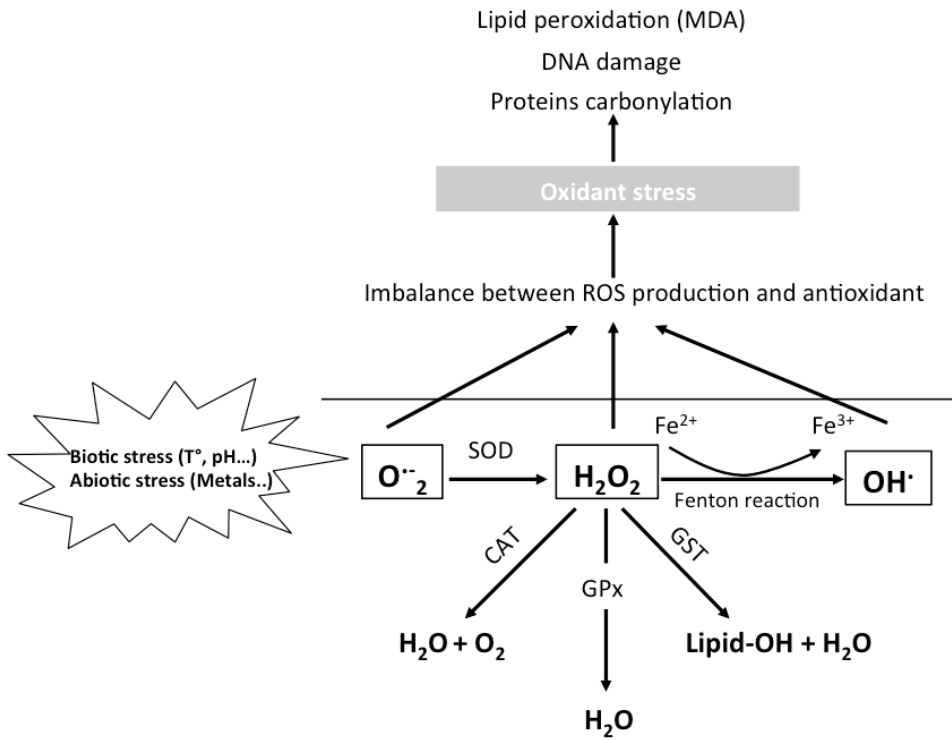


Figure 2

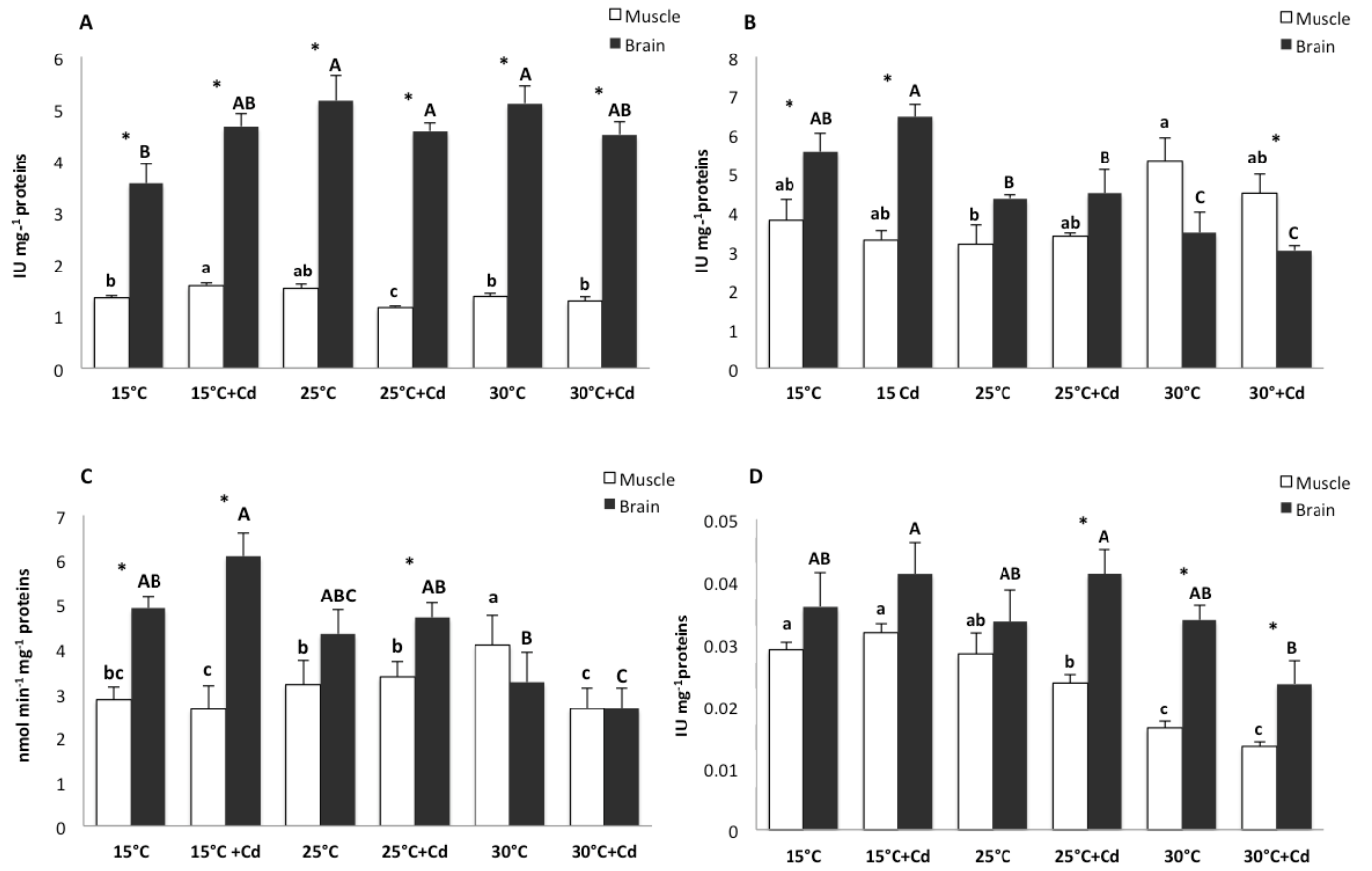


Figure 3

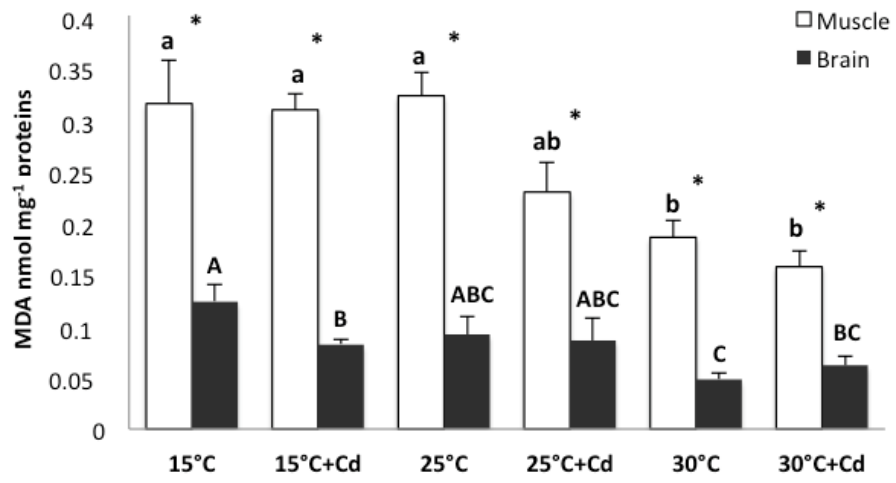


Figure 4

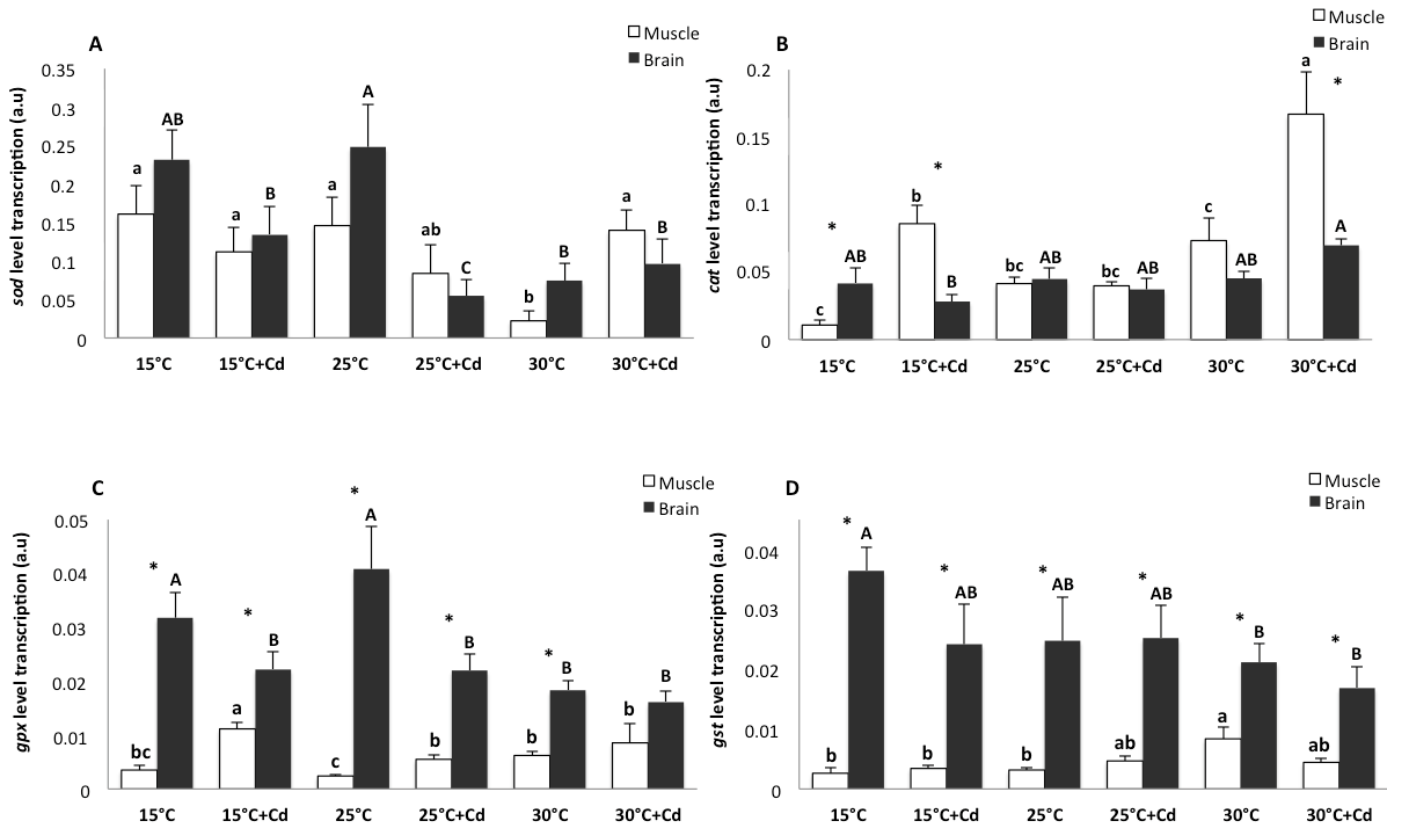


Figure 5

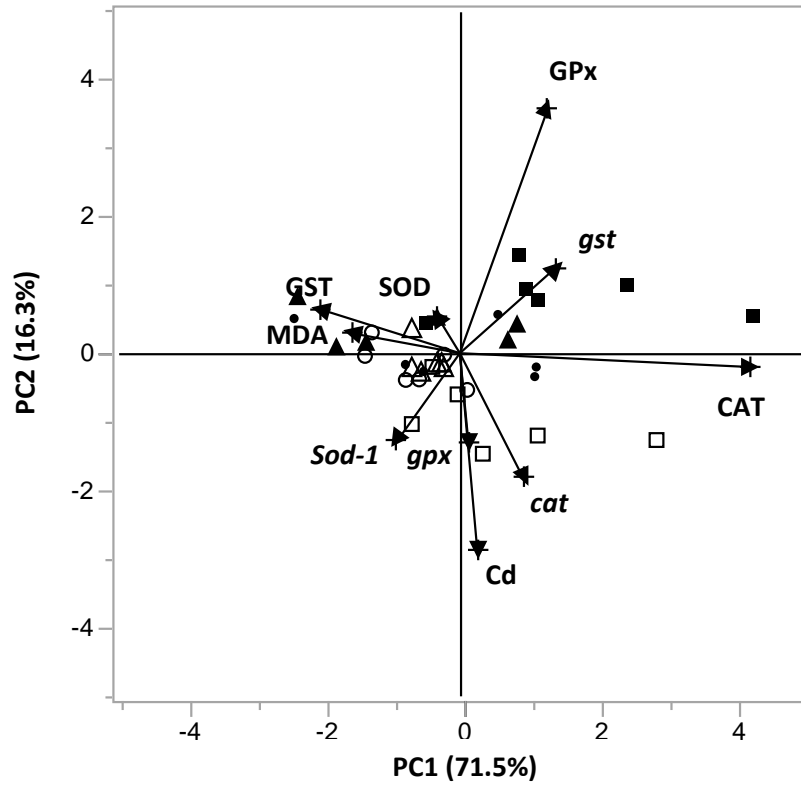


Figure legends

Figure 1: The balance between reactive species (ROS) production and elimination and consequences of oxidative stress.

Figure 2: Antioxidant enzyme activities of A) SOD, B) CAT, C) GPx and D) GST for each experimental condition in fathead minnow muscle and brain (mean \pm SEM (n=6)). Significant differences between means within a tissue are indicated by different letters (P<0.05). Asterisks denote significant differences between muscle and brain (P<0.05).

Figure 3: Lipid peroxidation measured as malondialdehyde for each experimental condition in fathead minnow muscle and brain (mean \pm SEM (n=6)). Significant differences between means within a tissue are indicated by different letters (P<0.05). Asterisks denote significant differences between muscle and brain (P<0.05)

Figure 4: Relative transcription levels of genes involved in antioxidant defense A) *sod*, B) *cat*, C) *gpx* and D) *gst* for each experimental condition in fathead minnow muscle and brain (mean \pm SEM (n=6)). Significant differences between means within a tissue are indicated by different letters (P<0.05). Asterisks denote significant differences between muscle and brain (P<0.05).

Figure 5: Biplot of principal component analysis (PCA) integrating antioxidant defense enzyme activities and the transcription levels of their corresponding genes, lipid peroxidation and Cd concentration in fathead minnow muscle at three different temperatures in control and Cd-exposed fish. Each point represents an individual fish.

● 15°C; ○ 15°C-Cd; ▲ 25°C; △ 25°C-Cd; ■ 30°C and □ 30°C-Cd.

Annexe

Annexe 1 : Composition chimique de l'eau (deminéralisée) reconstituée pour l'hébergement des menés à grosse tête (Lapointe et al., 2011)

Composé chimique	Concentration (mg l⁻¹)
CaCl ₂	35,3
MgSO ₄	32,8
NaHCO ₃	51,2
KCl	2,1
NaBr ₃	0,55
CaSO ₄	3,4

Annexe 2

Les différents types d'analyses effectuées en fonction des tissus chez les deux espèces

Espèce	Tissu	Acides gras des membranes cellulaires	Essais enzymatiques		Peroxydation lipidique (MDA)	Niveau d'expression des gènes (Désaturases Élongases Enzymes antioxydantes)	
			Défense antioxydante				Capacité oxydative
			(SOD- CAT- GST- GPx-GSH)				(CCO- CS)
Perchaude	Muscle	x	x	x	x		
Mené à grosse-tête	Muscle	x	x	x	x	x	
	Cerveau	x	x	x	x	x	

Annexe 3

Composition du tampon d'homogénéisation (pH = 7,5)

- HEPES (20 mM)
- EDTA (1 mM)
- TRITON X-100 (0,1%)

Annexe 4

Composition des substrats spécifiques (mM) pour les dosages enzymatiques

	CCO	CS	GST
Tampon phosphate pH=7 (1M)			
Tampon phosphate pH=8 (1M)			
Tampon phosphate pH=6,5 (50 mM)			
Cyt C	0,07		
KFeCN	0,33% (w/v)		
Tris		100	
DTNB		0,1	
Acétyl CoA		0,1	
Oxaloacétate		0,3	
CDNB			120
GSH			1

Annexe 5

Préparation de la solution RNA $later$

- i) Produits et solutions nécessaires
 - Eau MilliQ stérile
 - Sulfate d'ammonium
 - EDTA 0,5 M (18,61 g/100 ml, pH to 8 ajusté avec l'hydroxyde de sodium NaOH)
 - Citrate de sodium 1M (29,4 g/100 ml)

- ii) Préparation de la solution
 - 40 ml EDTA
 - 25 ml citrate de sodium
 - 700 g sulfate d'ammonium
 - 935 ml d'eau MilliQ

Mettre le mélange en agitation sur une plaque chauffante jusqu'à la dissolution complète du sulfate d'ammonium

Laisser refroidir

Ajuster le pH de la solution à 5,2 en utilisant l'acide sulfurique (H₂SO₄, 1M)

Conserver à température ambiante ou à 4°C

Annexe 6

La variance expliquée des trois composantes principales exprimant les variables significatives de chaque composante.

Les valeurs en gras représentent les variables (les AG membranaires, CCO et CS dans le muscle de la perchaude) significativement corrélées aux différentes composantes principales.

	Composante principale 1	Composante principale 2	Composante principale 3
16:0	0,0855	-0,0943	0,2637
18:0	0,0062	0,0274	0,0376
18:1n7	-0,0102	0,0242	0,0075
18:1n9	0,0620	0,0280	0,0783
20:4n6	0,0263	0,0511	0,2348
20:5n3	0,1234	0,0090	0,1161
22:6n3	0,0563	-0,0296	0,0257
AGS	0,0392	-0,0278	0,3597
AGMI	0,0511	-0,3536	0,1483
AGPI	0,4743	0,7290	0,3578
AGPI n-3	0,7353	-0,1019	-0,6050
AGPI n-6	-0,4404	0,5632	-0,4491
AGPI n-9	0,0766	0,0257	0,0806
CCO	0,0002	0,0006	-0,0003
CS	0,0004	-0,0004	-0,0002

