

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

EFFETS DE LA TEMPÉRATURE SUR LE MÉTABOLISME MITOCHONDRIAL
CARDIAQUE

THÈSE DE DOCTORAT

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOLOGIE DE

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR

HÉLÈNE LEMIEUX

NOVEMBRE 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Je dédie cette thèse à mes parents, Suzanne et Laurier Lemieux

*Votre amour et votre soutien m'ont conduit sur la route
de mes plus grandes passions*

*“If you can't measure something,
You don't know anything about it”*

Lord Kelvin

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Pierre Blier, qui m'a confié ce magnifique projet de doctorat me permettant de franchir le pont entre la biologie comparative et la biologie médicale. Merci de ta confiance, de ton temps, de ta passion, de ton soutien personnel, scientifique et financier, de ta patience, mais aussi, de ta simplicité et de ton humour. Les 14 années d'apprentissage dans ton laboratoire resteront à jamais gravées dans ma mémoire comme un moment de pur bonheur. Je ne te remercierai jamais assez pour la formation que tu m'as apportée et pour m'avoir aidé à tracer le chemin de mon avenir. Ce magnifique projet n'aurait été possible sans le soutien scientifique et financier de mon codirecteur, le Dr. Jean-Claude Tardif.

Un merci tout particulier à Erich Gnaiger (Daniel Swarovski Laboratory, General and Transplant Surgery Laboratory, Innsbruck Medical University), qui par sa contribution a donné une nouvelle dimension au projet. Les séjours en Autriche ont été très intenses, tant au niveau de l'apprentissage scientifique que de la découverte de la culture, en particulier des différents Schnaps. Ces séjours chaleureux dans les Alpes m'ont aussi permis de faire des rencontres très particulières. Parmi ces personnes, je tiens à remercier tout spécialement Steven C. Hand (Louisiana State University) qui en plus de partager plusieurs journées et soirées inoubliables, a aussi contribué significativement à la révision du manuscrit correspondant au Chapitre II de cette thèse. Cheers Steve!

Toujours dans le groupe de recherche d'Erich Gnaiger, je voudrais aussi remercier Assegid Garedeu pour son aide dans les analyses effectuées en Autriche (Chapitre III) ainsi que Jacob Troppomair, le directeur du Daniel Swarovski Laboratory, pour son accueil. Merci aussi aux membres suivants de ce groupe de recherche qui, à un moment ou à un autre, m'ont apporté leur soutien scientifique, technique ou personnel : Michaela Schneider, Brigitte Haffner, Thomas Schachner,

Philip Reisinger, Felix Aigner, Eveline Wallnöfer, Michael Thomas, Bernhard Holzknicht et Robert Sucker. Merci aussi à tous les gens avec qui j'ai partagé de bons moments durant les cours très intensifs de respirométrie à haute résolution dans le petit village autrichien de Schröcken. Et enfin, pour l'accueil et le divertissement loin de mon pays, merci à Andrea et Carolina Gnaiger, Miriam, Lucas, Philippe, Lena, Walter, Simone, Francesca et tous les autres...

Un court séjour dans le laboratoire de Biologie et Biochimie Cellulaire du Vieillissement (Université Denis Diderot, Paris 7) m'a permis de mieux comprendre les effets des huiles présentes dans l'alimentation sur le vieillissement des mitochondries cardiaques (données présentées dans la Conclusion générale). Merci en particulier à Anne Laure Bulteau qui m'a accueillie chaleureusement, appris de nouvelles techniques et fait découvrir la merveilleuse ville de Paris. Et merci aussi à Bertrand Friguet, entre autre pour cette mémorable soirée dans un restaurant asiatique.

Merci à Jean-Denis Dutil pour sa participation au Chapitre II. J'ai apprécié chaque moment de nos collaborations.

Merci à tous ceux et celles qui ont fait partie des comités d'évaluation des différentes étapes de mon doctorat. Pour le comité d'orientation, merci à Jean-Marc Grandbois et Jacques Gagnon. Pour le comité d'examen de synthèse, merci à Jacques-André St-Pierre et France Dufresne. Et enfin, un merci tout particulier au jury qui a évalué ma thèse soit le Dr. Averill (présidente du jury, Université du Québec à Montréal), le Dr. Rossignol (évaluateur externe, Université Victor Segalen-Bordeaux 2), le Dr. Couture (INRS Eau, Terre et Environnement) ainsi que mon directeur et mon codirecteur ci-haut mentionnés.

Un grand merci à Étienne Hébert-Chatelain, Véronique Desrosiers et Marig Hammon, qui en tant qu'assistant de recherche, ont pris soin des rats impliqués dans

les deux premiers chapitres de cette thèse. Ils m'ont sauvé d'un étourdissement perpétuel dû à mes allergies à ces petites bêtes.

Cette thèse n'aurait été possible sans les bourses qui m'ont été accordées par le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (années 2004 et 2005), par le Fond Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (année 2006), par mon directeur de recherche (fin 2006 et début 2007), et par Oroboros Instruments (Innsbruck, Autriche, début année 2007).

Dans le laboratoire du Dr. Blier, de grandes amitiés sont nées. Des amitiés qui ont conduit à de nombreux fous rires, à des moments intenses, à de mémorables souvenirs que je transporterai avec moi tout au long de ma vie. Je souhaite de tout cœur que ces amitiés se poursuivent et se développent conduisant à des retrouvailles tout aussi intenses et en de multiples projets de collaborations. Un merci tout particulier à Véronique Desrosiers et Sophie Breton avec qui j'ai partagé de nombreux moments inoubliables. Et à la belle «gang» du laboratoire de Biologie Intégrative pour tous les échanges, scientifiques ou non, je suis énormément reconnaissante.

Je n'aurais pas survécu à ces années très intenses de doctorat sans ces gens qui me permettaient de décrocher de temps en temps de mes histoires de mitochondries. Merci aux membres de ma famille: Suzanne, Laurier, France, Myriam, Chantal, Myriam, Nicola, Sarah, Élise, Mathieu, Samuel, Naomie, Sébastien, Claudio. Merci aussi à mes amies, en particulier Vio, Dany, Frankie, Julie-Anne et François, Lyse et Mme Morin, Claude. Et enfin, merci à mes voisins M. et Mme Guy pour avoir pris soin de ma maison pendant mes séjours en Europe.

Et enfin, à tous ceux et celles qui ont ri lorsque j'ai affirmé vouloir faire un doctorat en 3 ans et demi... dépôt initial en 3 ans et 1 mois... vous aviez sous estimé mon acharnement!

AVANT-PROPOS

Les trois articles présentés dans cette thèse sont en grande majorité le fruit de mon laborieux travail, tant au niveau de la planification, de la mise au point des techniques, des analyses, du traitement des données et de la rédaction. Pour les articles des Chapitres I et II, le Dr. Blier a contribué à la planification des expériences et à la correction des manuscrits. Le Dr. Tardif a contribué à la correction des 3 Chapitres. Les Drs. Blier et Tardif se sont partagés les coûts des expériences (Chapitres I et II) et des séjours en Autriche (Chapitre III). Le Dr. Gnaiger s'est impliqué activement dans toutes les étapes du Chapitre III, incluant les coûts. Le Dr. Dutil a participé au Chapitre II en fournissant les poissons et en participant à la correction du manuscrit.

Le Chapitre I est sous presse dans *Comparative Biochemistry and Physiology - A. Molecular and Integrative Physiology*. Une partie des résultats des Chapitres I et III ont été publiés sous forme de 3 résumés de présentation dans un congrès dans un numéro spécial de la revue *Biochimica Biophysica Acta* (voir les références au début des chapitres). Le chapitre III sera soumis bientôt dans *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	viii
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xvi
RESUME.....	xviii
INTRODUCTION GENERALE	1
LA STRUCTURE DE LA MITOCHONDRIE.....	2
LA MITOCHONDRIE EN TANT QU'USINE DE PRODUCTION D'ENERGIE.....	5
LA MESURE DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE.....	9
STADES RESPIRATOIRES ET RATIOS DE CONTROLE DU TAUX DE RESPIRATION.....	11
LE COTE SOMBRE DE LA MITOCHONDRIE : LES RADICAUX LIBRES.....	14
LES AUTRES FONCTIONS DE LA MITOCHONDRIE	15
<i>La génération et la détoxification des radicaux libres</i>	16
<i>L'homéostasie du calcium</i>	21
<i>La mort cellulaire programmée et la mort cellulaire nécrotique</i>	22
LE LIEN ENTRE LES MITOCHONDRIES ET CERTAINES MALADIES	22
<i>Nutrition, membranes, stress oxydant et maladies cardiovasculaires</i>	22
<i>Mutations de l'ADN mitochondrial et nucléaire</i>	24
<i>Ischémie-reperfusion</i>	25
EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA BIOLOGIE FONCTIONNELLE	26
<i>Ectothermie et endothermie</i>	27
<i>Les adaptations face aux variations de température corporelle</i>	28
<i>Hypothermie et hyperthermie chez les endothermes</i>	29
DÉCORTIQUER LES EFFETS DE LA TEMPÉRATURE	31
OBJECTIFS DU PROJET	32

CHAPITRE I	35
COMPOSITION MEMBRANAIRE	35
DOES MEMBRANE FATTY ACID COMPOSITION MODULATE MITOCHONDRIAL FUNCTIONS AND THEIR THERMAL SENSITIVITIES?	35
RESUME EN FRANÇAIS	36
ABSTRACT	37
INTRODUCTION	38
MATERIALS AND METHODS	41
<i>Animals</i>	41
<i>Isolation of heart mitochondria</i>	42
<i>Oxygen consumption of mitochondrial complexes</i>	43
<i>Mitochondrial affinity for pyruvate</i>	44
<i>CS activity and protein concentration</i>	44
<i>Fatty acid composition of mitochondrial membranes</i>	45
<i>Calculations</i>	45
<i>Chemicals</i>	45
<i>Statistical analysis</i>	46
RESULTS	49
<i>Rat weight and fatty acid composition of heart mitochondria</i>	49
<i>Mitochondrial functions at different temperatures</i>	49
<i>Pyruvate-stimulated mitochondrial respiration</i>	50
DISCUSSION	56
ACKNOWLEDGEMENTS	61
CHAPITRE II.....	62
DECORTIQUER LES DIFFERENTES ETAPES	62
THE IMPORTANCE OF PYRUVATE DEHYDROGENASE IN THE DETERMINATION OF THERMAL SENSITIVITY OF HEART MITOCHONDRIA	62
RESUME EN FRANÇAIS	63
ABSTRACT	64
INTRODUCTION	65

METHODS	68
<i>Animals</i>	68
<i>Isolation of heart mitochondria</i>	68
<i>Mitochondrial oxygen consumption</i>	69
<i>Enzymatic analysis</i>	70
<i>Protein concentrations</i>	73
<i>Chemicals</i>	74
<i>Statistical analysis</i>	74
RESULTS	75
DISCUSSION	84
ACKNOWLEDGMENTS	89
CHAPITRE III	91
REGULATION DU METABOLISME MITOCHONDRIAL	91
MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CONTROL BY TEMPÉRATURE AND SUBSTRATE COMBINATIONS, AND EXCESS CAPACITY OF CYTOCHROME C OXIDASE IN PERMEABILIZED FIBERS OF THE MOUSE HEART	91
RESUME EN FRANÇAIS	92
ABSTRACT	93
INTRODUCTION	94
MATERIALS AND METHODS	96
<i>Preparation of permeabilized myocardial fibers</i>	96
<i>High-resolution respirometry</i>	97
<i>Determination of CcOX excess capacity</i>	98
<i>Enzyme analysis</i>	98
<i>Data analysis</i>	98
RESULTS	99
<i>Mitochondrial respiration as a function of substrates</i>	99
<i>Effect of temperature on OXPHOS flux control</i>	101
<i>CcOX excess capacity</i>	102
<i>CcOX excess capacities and temperature</i>	103
DISCUSSION	112

ACKNOWLEDGMENTS	116
CONCLUSION GENERALE	117
LA PDH ET LA TEMPERATURE CHEZ LE RAT	117
LA PDH ET LA TEMPÉRATURE : COMPARAISON DE DEUX ESPÈCES	121
AUTRES ETAPES CRITIQUES A BASSE TEMPERATURE	123
MEMBRANES ET THERMOSENSIBILITE DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE	124
MEMBRANES ET STRESS OXYDANT	125
MEMBRANES ET ADAPTATION AU FROID	129
CHANGEMENTS DES PROPORTIONS DES DIFFERENTES ETAPES	130
D'AUTRES QUESTIONS A SOULEVER	131
POUR CONCLURE	132
BIBLIOGRAPHIE	134

LISTE DES FIGURES

Figure 0.1 : Structure de la mitochondrie.....	3
Figure 0.2 : Structure de la membrane mitochondriale.....	3
Figure 0.3 : Le cycle de l'acide citrique et les principales étapes de productions d'équivalents réduits pour approvisionner le système de transport des électrons.	6
Figure 0.4 : Schéma du système de transport des électrons et de la phosphorylation oxydative.	8
Figure 0.5 : Convergence du transport des électrons au niveau de la jonction ubiquinone et du pool de NADH.....	11
Figure 1.1: Oxygen consumption by heart mitochondria measured at different states for rats fed with four experimental diets.	53
Figure 1.2: Thermal sensitivity expressed as Q10 values for the mitochondrial functions in the heart ventricles of rat.	54
Figure 1.3: Effect of experimental diets on the maximal rate of respiration (V_{max}) and Michaelis-Menten constant for pyruvate (K_{mapp}) for mitochondria from rat heart ventricles at 5 and 35°C.	55
Figure 2.1: Mitochondrial functions measured at different temperatures in heart ventricles mitochondria of rat and Atlantic wolffish (<i>Anarhichas lupus</i>).	76
Figure 2.2: Effect of temperature on State 4 and RCR of mitochondrial respiration in heart ventricles mitochondria.	77
Figure 2.3: Ratios of the mitochondrial functions over the activity of Complex IV measured at each experimental temperature in the heart of rat and Atlantic wolffish (<i>Anarhichas lupus</i>).	80
Figure 2.4: Ratios of the mitochondrial functions over the activity of PDH at different temperatures in the heart of rat and Atlantic wolffish (<i>Anarhichas lupus</i>).	81
Figure 2.5: Q_{10} s of mitochondrial functions in the heart ventricles of A) Rat and B) Atlantic wolffish (<i>Anarhichas lupus</i>).	83
Figure 3.1: Respiration of permeabilized mouse heart fibers at 37 °C in multiple substrate/inhibitor protocols.	104
Figure 3.2: Respiration of permeabilized mouse heart fibers in multiple substrate/inhibitor protocols at different temperatures (for 37 °C and	

abbreviations see Figure 3.1).	106
Figure 3.3: Azide titration and Complex IV threshold in permeabilized mouse heart fibers at different temperature.	108
Figure 4.1 : Évaluation de la quantité de lipides peroxydés dans les mitochondries cardiaques de rats nourris avec différents types d'aliments formulés.....	127
Figure 4.2 : Évaluation de la quantité de protéines carbonylées dans les mitochondries cardiaques des rats nourris avec différents types d'aliments formulés	128

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 0.1 : Liste des principaux acides gras présents qui se retrouvent dans les systèmes biologiques.....	4
Tableau 0.2 : Définition des stades respiratoires dans les mitochondries isolées donnée par (17).....	12
Tableau 0.3 : Définition des stades respiratoires.....	13
Table 1.1: Composition of the experimental diets (g/100 g).....	47
Table 1.2: Fatty acid composition of the experimental diets (g/100 g lipids).....	48
Table 1.3: Effects of the experimental diets on fatty acid composition of heart mitochondrial membranes.	52
Table 3.1: Review of literature data on convergent electron input into the Q-cycle, in comparison with <i>in vivo</i> oxygen consumption in mammal muscle tissues.....	110
Table 3.2: Temperature multiplication factors and thermal sensitivities for mitochondrial respiratory fluxes in different metabolic states in permeabilized mouse heart fibers.	111
Tableau 4.1 : Résumé de la thermosensibilité (exprimée par le Q_{10}^1) des différentes fonctions mitochondriales en condition hypothermiques chez les mammifères (souris et rat) et chez un poisson d'eau froide, le loup Atlantique (<i>Anarhichas lupus</i>).....	119

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP	Adenosine diphosphate / Adénosine diphosphate
ANT	Adenine nucleotide translocase / Adénine nucléotide translocase
ATP	Adenosine triphosphate / Adénosine triphosphate
CAT	Catalase
CcOX	Cytochrome <i>c</i> oxidase / cytochrome <i>c</i> oxydase
CS	Citrate synthase
ETF	Electron-transferring flavoprotein / Flavoprotéine de transfert des électrons
ETS / STE	Electron transport system / Système de transport des électrons
FADH ₂	Flavin adenine dinucleotide reduced / Flavine adénine dinucléotide réduite
GDH	Glutamate dehydrogenase / Glutamate déshydrogénase
GM	Glutamate+malate
GMP	Glutamate+malate+pyruvate
GMPS	Glutamate+malate+pyruvate+succinate
GpDH	Glycerolphosphate dehydrogenase /Glycérolphosphate déshydrogénase
GPx	Glutathione peroxidase / Glutathione peroxydase
GSH	Reduced glutathione / Glutathione réduit
IDH	Isocitrate dehydrogenase / Isocitrate déshydrogénase
MDH	Malate dehydrogenase / Malate déshydrogénase
MUFA	Monounsaturated fatty acid / Acides gras monoinsaturé

NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide reduced / Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
ODH	Oxoglutarate dehydrogenase / Oxoglutarate déshydrogénase
OXPHOS	Oxidative phosphorylation / Phosphorylation oxydative
PDH	Pyruvate dehydrogenase / Pyruvate déshydrogénase
PM	Pyruvate+malate
PUFA	Polyunsaturated fatty acid / Acides gras polyinsaturé
Q	Ubiquinone
RCR	Respiratory control ratio / Ratio de contrôle respiratoire
SDH	Succinate dehydrogenase / Succinate déshydrogénase
SFA	Saturated fatty acid / Acides gras saturé
SOD	Superoxide dismutase / Superoxyde dismutase
S/R	Succinate with rotenone / Succinate en présence de roténone
TCA	Tricarboxylic acid / Acide tricarboxylique
UI	Unsaturation index / Indice d'insaturation

RESUME

La température a un effet prononcé sur les réactions physiologiques. Le métabolisme mitochondrial, qui permet de produire de l'énergie en présence d'oxygène (mode aérobie) ne fait pas exception à cette règle. Le muscle cardiaque est hautement dépendant de la production d'énergie générée par les mitochondries pour accomplir ses fonctions de pompage du sang. Bien qu'en général les mammifères régulent leur température corporelle autour de 37 °C, des variations thermiques peuvent se produire en période d'hibernation ou dans certaines situations cliniques (hypothermie induite pour la préservation d'un organe en vue d'une transplantation ou pour la protection du cœur durant la chirurgie ou hyperthermie lors d'un épisode de fièvre).

Pour comprendre les effets de la température sur le métabolisme mitochondrial, les organismes ectothermes (qui ne régulent pas leur température corporelle) constituent un matériel biologique privilégié. Lorsqu'ils font face à une chute de température corporelle, ces espèces modifient la composition de leurs membranes cellulaires et mitochondriales. Une augmentation de la proportion des acides gras possédant des liens insaturés leur permet de conserver la fluidité membranaire, malgré l'effet rigidifiant d'une baisse de température. Les processus enzymatiques assurant la production d'énergie aérobie sont en bonne partie de protéines imbriquées dans la membrane mitochondriale interne, et donc possiblement affectés par la fluidité de cette membrane. L'objectif du **Chapitre I** était de déterminer l'impact d'un changement de composition membranaire sur les fonctions physiologiques ainsi que sur leur thermosensibilité dans les mitochondries de cœur de rat. Des variations dans la composition des membranes mitochondriales ont pu être induites par une modification du type d'huile (riche en gras saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés) et du contenu en antioxydant (probucol) dans l'alimentation. Les différences de composition en acides gras des membranes mitochondriales cardiaques n'ont cependant pas engendré de différences au niveau de la respiration mitochondriale ou de sa thermosensibilité. Les résultats du Chapitre I ne supportent pas l'hypothèse d'un rôle primordial de la composition en acides gras des membranes sur les fonctions des protéines qui y baignent.

La respiration mitochondriale est un processus complexe qui implique différentes réactions reliées entre elles. Ces réactions sont toutes influencées par la température mais pas nécessairement de la même façon. Dans le **Chapitre II**, nous avons décortiqué la respiration mitochondriale pour quantifier et comparer les effets de la température sur ces différentes étapes. Le but visé était d'identifier les sites pour lesquels la température peut causer une pression sélective particulièrement forte. Pour répondre à cette importante question, nous avons proposé une approche comparative en étudiant une espèce de poisson adaptée à des températures basses (le loup Atlantique, *Anarhichas lupus*) et une espèce qui conserve une température corporelle

constante (le rat). La comparaison de la thermosensibilité de la respiration mitochondriale et de différentes étapes impliquées dans ce processus (Complexes I, II, III et IV du système de transport des électrons, ATPase, citrate synthase et pyruvate déshydrogénase) chez ces deux espèces a permis de démontrer clairement qu'une étape particulière, la pyruvate déshydrogénase, est parfaitement corrélée à la sensibilité thermique de la respiration mitochondriale. Cette enzyme n'étant pas située dans la membrane, les résultats corroborent ceux obtenus dans le Chapitre I et laissent supposer un contrôle de la respiration mitochondriale par des étapes situées avant l'entrée des électrons du système de transport des électrons.

L'acquisition de nouvelles connaissances concernant les effets de la température et de différents substrats énergétiques sur le métabolisme mitochondrial chez les mammifères est aussi d'une grande importance dans la détection des maladies mitochondriales. La plupart des études qui tentent de détecter des anomalies du système respiratoire dans les mitochondries isolées ou les fibres cardiaques perméabilisées de mammifères effectuent des mesures entre 20 et 30 °C, mais rarement à la température physiologique (37 °C). Ces études utilisent des substrats énergétiques qui sont loin des conditions physiologiques rencontrées par les mitochondries dans leur environnement cellulaire. De plus, un problème survient régulièrement pour mettre en relation une mutation génétique affectant l'ADN mitochondrial et la détection d'une baisse de production d'énergie au niveau des mitochondries. Le manque de corrélation entre les analyses génétiques et la performance physiologique semble lié à l'excès apparent de certaines composantes des voies mitochondriales. C'est le cas du Complexe IV du système de transport des électrons. Lorsqu'une maladie survient et qu'elle supprime une partie de l'activité de ce complexe, la mesure de l'excès d'activité disponible permet d'évaluer précisément les implications potentielles de cette anomalie sur la production d'énergie. L'objectif du **Chapitre III** était de mieux comprendre les effets de la température et de différents substrats énergétiques sur la détermination d'une anomalie mitochondriale. Contrairement aux deux chapitres précédents qui ont travaillé avec des mitochondries isolées, dans ce troisième chapitre, nous avons utilisé des fibres cardiaques perméabilisées. Cette technique combinée à l'utilisation d'un appareil de mesure permettant une meilleure résolution, a rendu possible les mesures à 5 températures sur un tissu aussi petit que le ventricule gauche de souris. Les possibilités qui s'ouvrent grâce à l'utilisation de cette espèce sont grandes puisqu'il existe de nombreux modèles de souris génétiquement modifiées qui facilitent l'étude des anomalies reliées aux mitochondries. Les résultats démontrent clairement l'importance de travailler à la température physiologique et d'utiliser des combinaisons de substrats respectant le fonctionnement du système de transport des électrons.

Ce projet fournit une importante base conceptuelle pour des analyses futures des fonctions mitochondriales, et ce autant dans un contexte biomédical que dans l'optique de comprendre l'évolution d'espèces dans différents habitats thermiques.

Mots clés : Cœur, rat, souris, poisson, composition membranaire, sensibilité thermique, système de transport des électrons, respiration mitochondriale, phosphorylation oxydative, pyruvate déshydrogénase, complexes mitochondriaux, contrôle de la respiration mitochondriale.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le cœur est une pompe musculaire dont les contractions servent à propulser le sang, assurant un apport constant en oxygène dans les organes du corps. Chez les mammifères, le cœur contient quatre chambres séparées, deux atriums et deux ventricules. Les atriums collectent le sang provenant des vaisseaux sanguins alors que les ventricules propulsent le sang. Le ventricule droit assure la propulsion du sang veineux dans les poumons alors que le ventricule gauche permet la distribution du sang oxygéné à travers tout le corps. D'autres vertébrés, par contre, possèdent un cœur à deux ou trois chambres. Chez les poissons par exemple, le cœur se compose de deux chambres, soit un atrium et un ventricule. Le ventricule propulse le sang dans les branchies qui le ré oxygène, il est ensuite expédié à travers tout le corps avant de revenir à l'atrium.

La production d'énergie pour la contraction des fibres musculaires cardiaques, appelées myocytes ventriculaires, est en majeure partie assurée par les mitochondries, de petits organites cellulaires présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Les mitochondries contiennent les systèmes enzymatiques requis pour la production de l'énergie cellulaire en présence d'oxygène (ou mode aérobie) par un processus nommé phosphorylation oxydative (OXPHOS). L'énergie produite est présente sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Pour assurer le pompage du sang, le cœur humain peut synthétiser chaque jour environ 35 kg d'ATP (Taegtmeier, 1994) dont environ 90% vient de l'OXPHOS (Ventura-Clapier et al., 2004). Dans un tissu dépendant de la production d'énergie aérobie comme le cœur, la moindre dysfonction au niveau des mitochondries peut avoir des répercussions importantes.

Après d'intenses efforts pour comprendre comment les mitochondries produisent et utilisent l'énergie, un effort impressionnant est maintenant relié avec le développement de nouveaux outils et méthodes pour étudier la structure et les fonctions mitochondriales, pour comprendre leur régulation et pour faire le lien entre

ces petits organites cellulaires et l'apparition, l'évolution et le traitement de différentes maladies et dysfonctions. Les mitochondries jouent maintenant un rôle central dans le développement de plusieurs idées importantes de la biologie moderne.

LA STRUCTURE DE LA MITOCHONDRIE

Les mitochondries sont constituées de deux membranes imbriquées, qui délimitent deux régions spatiales : l'espace inter membranaire et la matrice ou espace central (Figure 0.1). Tout comme les membranes cellulaires, les membranes mitochondriales sont en majeure partie constituées de phospholipides. Les phospholipides sont aussi appelés molécules amphiphiliques parce qu'ils comportent deux parties distinctes, différant par leur solubilité : une tête polaire hydrophile qui est formée d'un groupement phosphate et une tête non polaire hydrophobe qui est formée de deux chaînes d'acides gras (Figure 0.2A, B). Cette divergence de solubilité des extrémités des phospholipides permet d'établir la double couche de la membrane : le groupement phosphate s'oriente vers la phase aqueuse alors que les chaînes d'acides gras se regroupent à l'intérieur de la membrane (Figure 0.2C ; Hochachka & Somero, 2002).

Les acides gras qui entrent dans la composition de ces phospholipides sont constitués d'une chaîne de carbone, dont la longueur varie, et qui est délimitée à une extrémité par un groupe méthyle (CH_3), et à l'autre, par un groupe carboxyle (COOH) (Figure 0.2B). Les liens qui unissent ces carbones peuvent être saturés (liens simples) ou insaturés (liens doubles) (Bhagavan, 2002). Les acides gras insaturés sont identifiés par la position de la première liaison double à partir de l'extrémité méthyle : si ce lien est présent au troisième carbone, l'acide gras sera identifié comme oméga-3 (ou n-3) (Kruger et al., 2003). La nomenclature utilisée identifie par exemple l'acide linoléique par le symbole C18:2n-6 , le chiffre 18 indiquant le nombre de carbones, 2 le nombre de liens doubles, et 6 la position du premier lien double à partir de

l'extrémité méthyle. Le tableau 0.1 présente une liste des principaux acides gras avec leurs noms numériques, leurs séries (n-3, n-6, etc) et leurs noms communs.

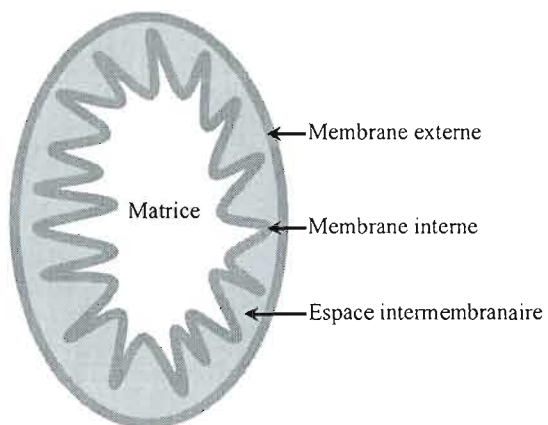


Figure 0.1 : Structure de la mitochondrie.

La mitochondrie est composée de deux membranes, l'une encerclant l'autre, créant ainsi deux régions spatiales : l'espace inter membranaire et la matrice ou espace central. La membrane externe est lisse alors que la membrane interne comprend des villosités qui augmentent sa surface.

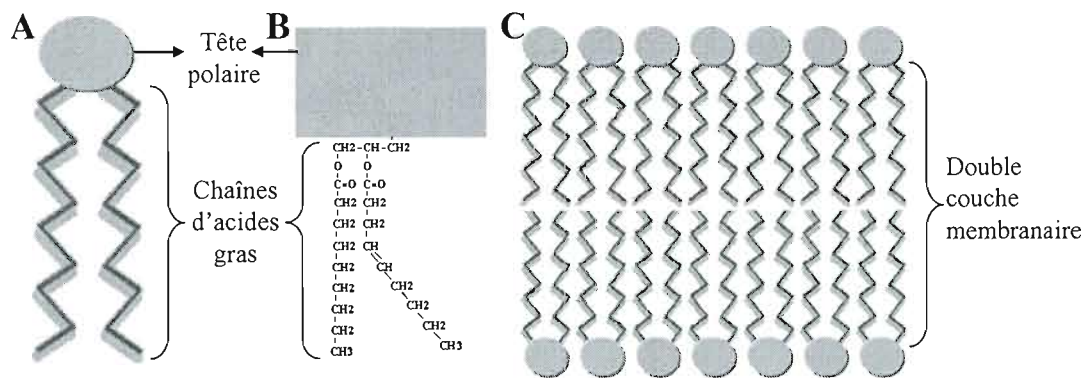


Figure 0.2 : Structure de la membrane mitochondriale.

A) Représentation schématisée d'un phospholipide. B) Description du phospholipide. C) Représentation de la disposition des phospholipides dans la double couche membranaire.

Tableau 0.1 : Liste des principaux acides gras présents qui se retrouvent dans les systèmes biologiques.

Type	Nom numérique et série	Nom commun
Saturé	C4:0	Acide butyrique
Saturé	C6:0	Acide caproïque
Saturé	C8:0	Acide caprylique
Saturé	C10:0	Acide caprique
Saturé	C12:0	Acide laurique
Saturé	C14:0	Acide myristique
Saturé	C16:0	Acide palmitique
Saturé	C17:0	Acide margarique
Saturé	C18:0	Acide stéarique
Saturé	C20:0	Acide arachidique
Saturé	C22:0	Acide behénique
Saturé	C24:0	Acide lignocérique
Monoinsaturé	C14:1	Acide myristoléique
Monoinsaturé	C16:1 n-7	Acide palmitoléique
Monoinsaturé	C18:1	Acide oléique
Monoinsaturé	C20:1	Acide gadoléique
Monoinsaturé	C22:1	Acide érucique
Monoinsaturé	C24:1	Acide nervonique
Polyinsaturé	C18:2 n-6	Acide linoléique
Polyinsaturé	C18:3 n-3	Acide linoléinique
Polyinsaturé	C18:3 n-3	Acide α -linoléinique
Polyinsaturé	C18:3 n-6	Acide γ -linoléinique
Polyinsaturé	C20:4 n-6	Acide arachidonique
Polyinsaturé	C20:5 n-3	Acide eicosapentaénoïque (EPA)
Polyinsaturé	C22:5 n-3	Acide docosapentaénoïque
Polyinsaturé	C22:6 n-3	Acide docosahexaénoïque (DHA)

La membrane externe constitue une barrière semi-perméable entre la mitochondrie et le cytosol qui permet l'échange des produits et des substrats pour les processus impliqués dans la synthèse de l'ATP, les cofacteurs des enzymes mitochondriales, les nucléotides pour la synthèse de l'ADN et de l'ARN ainsi que les protéines synthétisées dans le cytoplasme (Bay & Court, 2002). Les protéines

traversent cette membrane grâce aux complexes translocases (Paschen & Neupert, 2001) alors que les petites molécules et les ions passent à travers des canaux qui jouent un rôle important dans la régulation du flux des métabolites, les porines mitochondriales (Freitag et al., 1982).

La membrane interne, pour sa part, présente des villosités dirigées vers la matrice, qui augmentent sa surface (Figure 0.1). Les composés lipidiques, majoritairement des phospholipides, forment environ 30 à 35% du poids de cette membrane (Bhagavan, 2002) dont 20% est représenté par la cardiolipine, un phospholipide présent uniquement dans les membranes impliquées dans la production d'énergie par le métabolisme aérobie (Hoch, 1992). La membrane interne permet la diffusion de petites molécules non chargées (ex. eau, H_2O , oxygène, dioxyde de carbone, ammoniac) mais toutes les autres molécules, incluant les ions H^+ , nécessitent des systèmes de transports spécifiques (Bhagavan, 2002).

LA MITOCHONDRIE EN TANT QU'USINE DE PRODUCTION D'ÉNERGIE

Les sources de carburants ingérés par l'organisme (glucose, acides gras libres, lactate) arrivent par la circulation jusqu'aux cellules où elles sont en partie hydrolysées dans le cytoplasme (Opie, 1998). En situation de jeûne, les acides gras sont la principale source d'énergie pour le métabolisme cardiaque alors qu'après un repas, c'est le glucose qui constitue le substrat prédominant (Opie & Sack, 2002). Les substrats énergétiques sont d'abord transformés grâce au cycle de l'acide citrique, situé dans la matrice mitochondriale, en équivalents réduits ($NADH$ et $FADH_2$; Figure 0.3) qui fournissent des électrons au système de transport des électrons (STE). Le STE est formée de 4 principaux complexes enzymatiques (Figure 0.4).

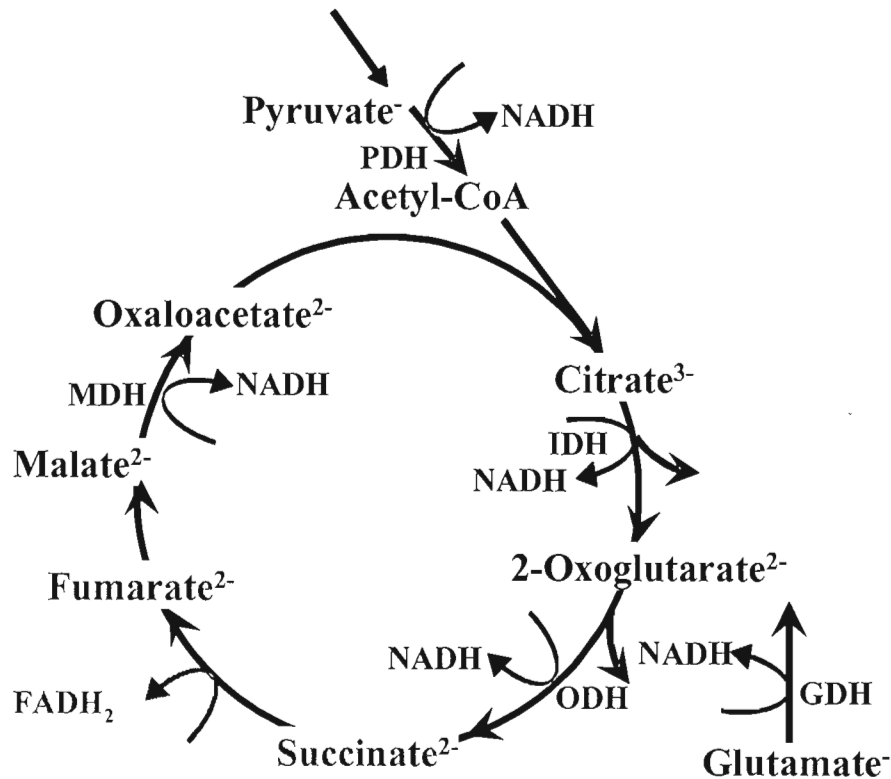


Figure 0.3 : Le cycle de l'acide citrique et les principales étapes de productions d'équivalents réduits pour approvisionner le système de transport des électrons. Les étapes de productions de NADH sont la pyruvate déshydrogénase (PDH), l'isocitrate déshydrogénase (IDH), la glutamate déshydrogénase (GDH), l'oxoglutarate déshydrogénase (ODH), la malate déshydrogénase (MDH) alors que l'étape de production de FADH₂ est la succinate déshydrogénase (modifié à partir de Gnaiger, 2007).

Le Complexe I, ou NADH-Coenzyme Q réductase, transfère deux électrons du NADH à l'ubiquinone (identifié par la lettre Q sur la figure 0.4). Il possède une forme en L dont la base est immergée dans la membrane interne (domaine membranaire) et le bras court, qui contient un site de liaison au NADH, s'étend dans la matrice.

Le Complexe II ou succinate-coenzyme Q réductase est le plus simple des

complexes mitochondriaux. La succinate déshydrogénase en constitue la plus grande des sous unités et est située du côté de la matrice, à la surface de la membrane mitochondriale interne. C'est la seule sous unité du STE qui fait partie du cycle de l'acide citrique (Figure 0.3). Elle catalyse l'oxydation du succinate en fumarate et réduit la flavine adénine dinucléotide (FAD) en FADH₂. Cette réaction provoque le transfert de 2 électrons du FADH₂ à l'ubiquinone.

Le Complexe III ou coenzyme Q-cytochrome *c* réductase catalyse l'oxydation de l'ubiquinol et le transfert des électrons au transporteur mobile, le cytochrome *c*. Le complexe III, contient deux centres de réaction pour l'ubiquinone, Q_P et Q_N (Brandt & Trumpower, 1994). Les deux centres sont situés dans la membrane mitochondriale interne. Le centre Q_P se trouve du côté de la matrice alors que le centre Q_N est situé du côté de l'espace inter membranaire. L'oxydation de deux électrons donneurs (oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone) se produit au niveau du centre Q_P. Ces électrons sont acceptés et divisés en deux voies, la moitié est recyclée et l'autre moitié est transférée au cytochrome *c*. Au niveau du centre Q_N, la molécule d'ubiquinone est réduite en ubiquinol, assurant le retour des électrons dans le pool quinone. Le résultat net du cycle ubiquinone est que pour chaque paire d'électrons transférée de l'ubiquinol au cytochrome, 4 protons sont pompés dans l'espace inter membranaire et deux protons sont enlevés de la matrice (Marín-García, 2005).

Le Complexe IV ou cytochrome *c* oxydase (CcOX) accepte 4 électrons du cytochrome *c* et les transfère à l'oxygène moléculaire, qui est réduit en eau, ce qui consomme 4 protons supplémentaires (Figure 0.4).

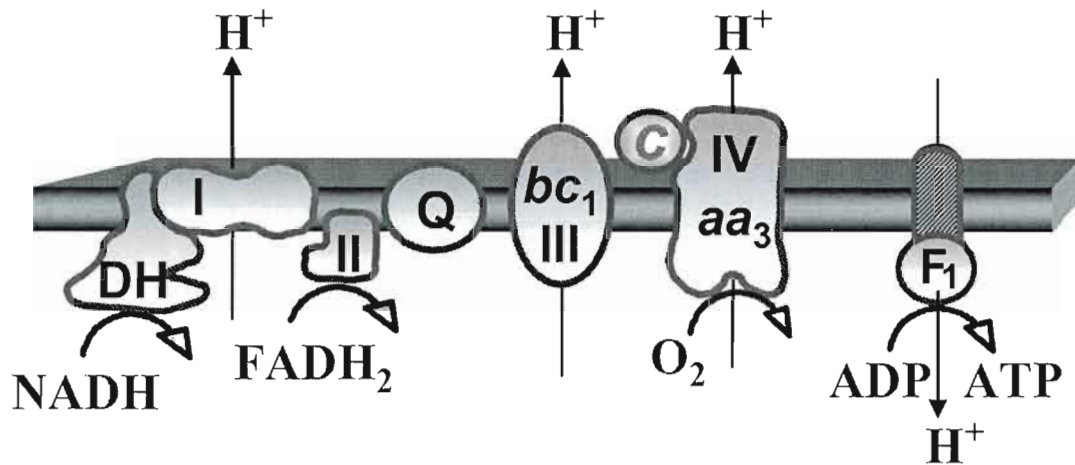


Figure 0.4 : Schéma du système de transport des électrons et de la phosphorylation oxydative.

Les 4 complexes enzymatiques sont le Complexe I (I), le Complexe II (II), le Complexe III (III) et le Complexe IV (IV). Q identifie l'ubiquinone et c le cytochrome *c* (Modifié à partir de Gnaiger, 2007).

Le système de transport des électrons assure la transformation de l'énergie électrique (électrons) en énergie chimique (ATP). Le passage des électrons dans le système respiratoire est accompagné par le transfert des protons dans l'espace intermembranaire au niveau des Complexes I, III et IV (Figure 0.4). Un gradient de protons est ainsi formé et, puisque la membrane interne est imperméable aux protons, ceux-ci reviennent dans la matrice en empruntant un canal spécifique aux protons (la sous-unité F_0 de l'ATP synthase). La force proton motrice qui propulse les protons à travers la membrane mitochondriale interne vers la matrice procure l'énergie nécessaire à la synthèse de l'ATP, catalysée par la partie F_1 (ou ATPase) de l'ATP synthase. Puisque l'énergie est conservée dans l'ATP suite à la phosphorylation de l'ADP en ATP, le processus complet est connu sous le nom d'OXPHOS, soit la synthèse d'énergie sous forme d'ATP couplée au système de transport des électrons. Une fois produit dans la mitochondrie, l'ATP peut être transporté dans le cytosol par

le système de transport ATP/ADP translocase pour y être utilisé pour la contraction (Nicholls & Ferguson, 2002).

LA MESURE DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE

La respiration mitochondriale est une quantification du transfert des électrons dans le STE par la mesure de la consommation d'oxygène. Puisque le transfert des électrons dans le STE est couplé à la synthèse d'ATP, l'ajout d'ADP et de phosphate inorganique, en plus des substrats énergétiques, est essentiel pour mesurer le taux maximal de respiration mitochondriale. En présence de mélanges simples de substrats énergétiques, comme par exemple le pyruvate et le malate, le pyruvate est transporté dans la matrice mitochondriale où l'action du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) procède à la décarboxylation oxydative, libérant de l'acétyl CoA (Bhagavan, 2002). La malate déshydrogénase, localisée dans la matrice mitochondriale, oxyde le malate en oxaloacétate. La réaction de l'oxaloacétate avec l'acétyl CoA génère du citrate qui à son tour est transformé en 2-oxoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase. Il y a alors production d'équivalent réduit sous forme de NADH aux étapes suivantes : PDH, malate déshydrogénase, isocitrate déshydrogénase et oxoglutarate déshydrogénase (Figure 0.3). Les équivalents réduits, sous forme de NADH, approvisionnent en électrons le Complexe I du STE. Les électrons sont ensuite transférés du Complexe I, à l'ubiquinone (jonction Q), au Complexes III, IV et enfin à l'oxygène, sans passer par le Complexe II (Gnaiger, 2007).

C'est le même principe qui se produit lorsque l'on fournit aux mitochondries du glutamate et du malate. Le glutamate est oxydé en 2-oxoglutarate par la glutamate déshydrogénase, une autre étape de production de NADH (Gnaiger, 2007). Le Complexe II n'est pas impliqué dans la respiration avec le malate et le pyruvate ou le glutamate. Les concentrations élevées de malate permettent d'équilibrer avec le fumarate, ce qui inhibe le flux allant du succinate au fumarate. De plus, l'oxaloacétate

agit comme inhibiteur de la succinate déshydrogénase. La transformation du succinate en fumarate et la production d'équivalents réduits sous forme de FADH_2 est ainsi prévenue (Lemasters, 1984).

Pour mesurer la respiration induite au Complexe II du STE, le succinate est ajouté en présence de roténone. La roténone inhibe les déshydrogénases reliées au NADH et renverse le statut redox du NAD en NADH. La succinate déshydrogénase est activée par le succinate et permet la transformation du succinate en fumarate, libérant du FADH_2 qui supporte le flux d'électron exclusivement au Complexe II. Tout comme les électrons entrant au Complexe I, les électrons en provenance du Complexe II sont transférés directement à l'ubiquinone (jonction Q), au Complexe III puis au Complexe IV pour terminer à l'oxygène moléculaire.

La vitesse à laquelle le cycle de l'acide citrique opère est un paramètre important du contrôle de la production d'ATP dans le cœur (Opie, 1998). La mesure de la respiration mitochondriale se doit de considérer la structure du STE et son lien avec le cycle de l'acide citrique ou avec d'autres réactions situées en amont (Figure 0.3). Le cycle de l'acide citrique n'est pas fonctionnellement fermé et le STE n'est pas linéaire comme le laisse croire son autre nom, soit la chaîne respiratoire (revue par Gnaiger (2007)). En fait, il s'agit de plusieurs chaînes de transport des électrons. Ces chaînes n'incluent pas seulement celle passant du Complexe I à l'ubiquinone ou du Complexe II à l'ubiquinone. Deux autres entrées d'électrons approvisionnent aussi directement la jonction ubiquinone sans passer par les complexes I ou II, soit la glycérophosphate déshydrogénase (GpDH) et les flavoprotéines de transfert d'électrons (ETF) (Figure 0.5).

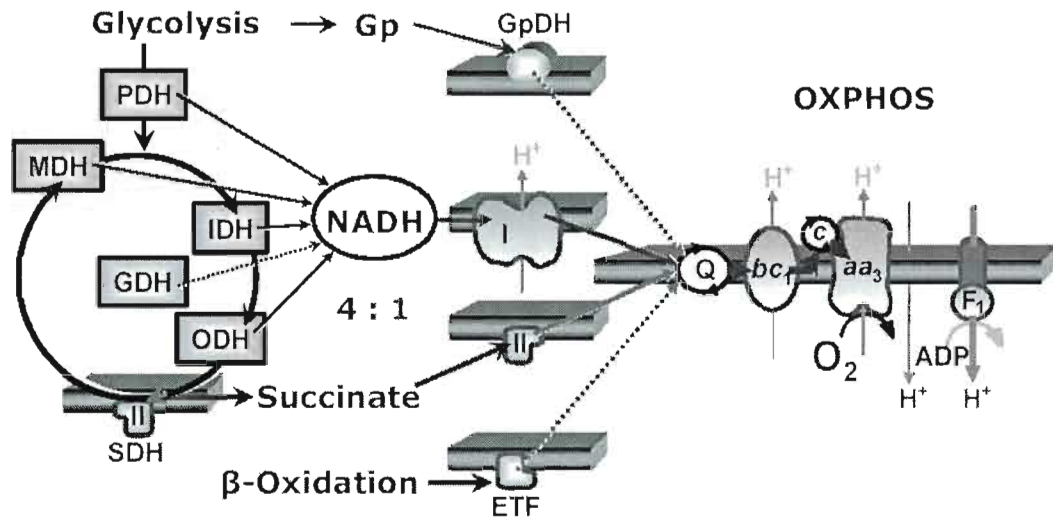


Figure 0.5 : Convergence du transport des électrons au niveau de la jonction ubiquinone et du pool de NADH.

Des électrons en provenance de la glycérophosphate déshydrogénase (GpDH), du Complexe I, du Complexe II, et des flavoprotéines de transfert des électrons provenant de la β -oxydation des acides gras (ETF), convergent à la jonction ubiquinone (Q). Le pool de NADH qui supporte l'activité du Complexe I est approvisionné par différentes déshydrogénases soient la pyruvate déshydrogénase (PDH), la malate déshydrogénase (MDH), l'isocitrate déshydrogénase (IDH), la glutamate déshydrogénase (GDH) et l'oxoglutarate déshydrogénase (ODH). Le succinate approvisionne la succinate déshydrogénase (SDH ; Complexe II). Figure tirée de Gnaiger (2007).

STADES RESPIRATOIRES ET RATIOS DE CONTRÔLE DU TAUX DE RESPIRATION

Les stades respiratoires ont été définis pour la première fois à partir de protocoles d'expériences de respirométrie avec des mitochondries isolées (Tableau 0.2; Chance & Williams, 1956). Les définitions données à ces stades, cependant, diffèrent aujourd'hui de celles proposées en 1956, même si la plupart des auteurs réfèrent toujours à Chance et Williams sans pour autant donner les mêmes définitions (Tableau 0.3). Selon la définition originale des stades respiratoires, le stade 2 était

défini comme le stade au repos avec de l'ADP présent mais avant l'addition des substrats (Tableau 0.2 ; Chance & Williams, 1956). En réalité, les substrats endogènes sont épuisés durant la phase initiale d'activation par l'ADP. Cette définition du stade 2 s'oppose donc à la définition du stade 2 obtenu en absence d'ADP mais en présence de substrats (Tableau 0.3). La terminologie utilisée pour les stades respiratoires représente donc une source de confusion dans les études en bioénergétique. Dans bien des études, le stade 4 est utilisé pour désigner les stades 2 et 4. Le stade 2 résulte cependant en une cinétique de l'oxygène différente du stade 4 (Gnaiger et al., 1998b). De plus, ces deux stades se doivent d'être distingués clairement, puisque l'activité de l'ATPase peut causer le recyclage de l'ADP à partir de l'ATP et donc, une certaine activation de la phosphorylation est possible en absence d'ADP.

Tableau 0.2 : Définition des stades respiratoires dans les mitochondries isolées donnée par Chance & Williams (1956).

Stades	[O ₂]	Niveau d'ADP	Niveau des substrats	Taux de respiration	Substance limitante
1	>0	Low	Low	Slow	ADP
2	>0	High	~0	Slow	Substrats
3	>0	High	High	Fast	Chaîne respiratoire
4	>0	Low	High	Slow	ADP
5	<0	High	High	0	Oxygène

Tableau 0.3 : Définition des stades respiratoires.

Convention proposée à partir de l'ordre typique d'addition des agents durant une expérimentation (Chance & Williams, 1956); tableau tiré de Nicholls & Ferguson, 2002).

Stades	Définition
Stade 1	Mitochondries seules, en présence de phosphate
Stade 2	Substrats ajoutés, respiration faible due au manque d'ADP
Stade 3	Apport limité d'ADP ajouté, permettant une augmentation du taux de respiration
Stade 4	Tout l'ADP est converti en ATP, la respiration ralentie
Stade 5	Anoxie

Pour atteindre le stade 4 dans un délai raisonnable expérimentalement, il faut appliquer des quantités d'ADP qui sont en dessous des concentrations physiologiques, soit en général inférieure à 0,5 mM. Seul l'application de concentrations physiologiques d'ADP, soit entre 1 et 5 mM, permet d'atteindre un taux de respiration maximal (Gnaiger et al., 2000b; Gnaiger, 2001). Le stade 3 est alors maintenu pendant une longue période ce qui permet de complexifier les protocoles avec des titrations de substrats et d'inhibiteurs pour obtenir le maximum d'information à partir d'une seule incubation. Le stade 4 peut alors être mesurée en présence d'un inhibiteur du transport de l'ADP, soit l'atractyloside, ou d'un inhibiteur de l'ATPase, soit l'oligomycine.

Si les mitochondries sont endommagées, le couplage du transfert de protons à la phosphorylation de l'ADP peut faire défaut. Dans ce cas, la consommation d'oxygène durant le stade 4 se rapproche de la consommation d'oxygène au stade 3. Le couplage des mitochondries peut donc être vérifié par le ratio de contrôle respiratoire (RCR), qui est défini conventionnellement comme le taux de respiration activé par l'ADP

(stade 3) divisé par le taux de respiration en stade contrôlé sans phosphorylation de l'ADP (stade 2 ou 4, ou par l'inhibition de l'ATPase par l'oligomycine ou l'inhibition du transport de l'ADP par l'atractyloside). En absence d'activité de l'ATPase, le même taux de respiration est mesuré au stade 2, au stade 4 ou en présence d'oligomycine ou d'atractyloside. Dans les cas où l'ATPase est responsable de l'augmentation du taux de respiration au stade 2 ou 4, le couplage des mitochondries est mesuré de façon plus fiable en présence de l'un ou l'autre de ces inhibiteurs.

LE CÔTÉ SOMBRE DE LA MITOCHONDRIE : LES RADICAUX LIBRES

La plupart des cellules peuvent produire de l'énergie sous forme d'ATP en absence d'oxygène. Dans ces conditions, le glucose est transformé en pyruvate par la glycolyse et ensuite en lactate. Ce processus appelé glycolyse anaérobie permet de produire seulement deux ATP par molécule de glucose. Pour augmenter la production d'énergie, les cellules doivent utiliser le métabolisme mitochondrial et donc l'oxygène. En mode aérobie, chaque molécule de glucose produit 36 molécules d'ATP, augmentant grandement le rendement énergétique (Nohl et al., 2003).

Dans le Complexe IV du STE, l'oxygène est complètement réduit en eau, sans passer par des formes intermédiaires partiellement réduites. Par contre, certains électrons qui voyagent dans le STE peuvent s'échapper et réduire partiellement des molécules d'oxygène. La fuite des électrons se produit principalement au niveau des Complexes I, et III (revue par Turrens, 1997), même si un rôle important du Complexe II a aussi été suggéré (McLennan & Degli Esposti, 2000).

Lorsque l'oxygène est réduit partiellement par un électron, un anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est produit. L'oxygène, sous cette nouvelle forme, est plus réactif et peut aller oxyder d'autres molécules, c'est pourquoi cet anion est appelé «reactive oxygen species» (ROS) (Turrens, 2003). L'anion superoxyde est relativement stable mais il

est aussi le précurseur de la plupart des autres ROS tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($OH\cdot$) (Marín-García, 2005). Dans des conditions *in vivo*, environ 2% de l'oxygène consommé par le système de transport des électrons de la mitochondrie est transformé en anions superoxydes (Gnaiger et al., 2000b; Abele & Puntarulo, 2004).

Les ROS attaquent et altèrent chimiquement les macromolécules cellulaires tels que les protéines, les lipides et l'ADN et causent des dommages métaboliques souvent sévères. Les dommages liés au radical hydroxyle sont les plus importants (Scheffler, 1999). Ils ciblent principalement les mitochondries puisque ce radical est très réactif et possède un temps de demi-vie court, ce qui restreint ses dommages à une distance assez proche de l'endroit où il a été produit (Pryor, 1986). Par contre, les anions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène produits par les mitochondries sont moins réactifs et peuvent voyager jusqu'au cytosol pour étendre leurs dommages à d'autres sites cellulaires (Han et al., 2003). Les dommages induits sur les lipides se produisent par une réaction en chaîne, c'est-à-dire que l'oxydation d'une chaîne d'acides gras produit un peroxyde lipidique ($RO_2\cdot$) qui à son tour va oxyder une autre chaîne de lipides et ainsi de suite (Halliwell & Gutteridge, 1999).

LES AUTRES FONCTIONS DE LA MITOCHONDRIE

Les mitochondries ne servent pas uniquement à produire de l'ATP mais elles régulent aussi un réseau complexe d'interactions cellulaires incluant : (1) la génération et la détoxification des radicaux libres; (2) l'homéostasie du calcium; (3) le transport des métabolites entre le cytoplasme et la matrice; (4) la croissance et le développement cellulaire; (5) la mort cellulaire programmée (apoptose) et la mort cellulaire nécrotique (Opie, 1998; Marín-García, 2005).

La génération et la détoxification des radicaux libres

Le défi des cellules animales est de maintenir l'équilibre entre la production des ROS et les défenses en place pour éviter des dommages aux macromolécules cellulaires. Mais plusieurs études ont démontré que les défenses antioxydantes de l'organisme semblent contrôler le niveau des ROS plutôt que de les éliminer complètement (D'Autréaux & Toledano, 2007). L'explication la plus probable pour l'élimination incomplète des ROS est qu'ils assurent une fonction physiologique (Barja, 1993). Les radicaux oxydés constituent des signaux puissants envoyés rapidement et réversiblement par les mitochondries à d'autres sites cellulaires, déclenchant une cascade intracellulaire qui conduit à des points physiologiques pour les cellules tel que la cardioprotection, la prolifération cellulaire, l'apoptose et la nécrose (Marín-García, 2005). De petites fluctuations des concentrations d'oxydants à l'intérieur des cellules semblent donc jouer un rôle dans le signallement cellulaire (Droge, 2002).

Lorsque le déséquilibre en faveur de la production des ROS est léger, il s'ensuit le vieillissement normal de la cellule (Scheffler, 1999). Au milieu des années 50, Harman a proposé que la production de ROS entraîne des dommages aux macromolécules cellulaires et que ces dommages constituent un élément majeur dans le processus de vieillissement (Harman, 1956). Cette proposition a ensuite été appuyée par plusieurs autres équipes de chercheurs (Beckman & Ames, 1998; Finkel & Holbrook, 2000; Drew & Leeuwenburgh, 2002; Droge, 2002). Chez les mammifères, par exemple, il y a une corrélation inverse entre les concentrations de macromolécules oxydées et l'espérance de vie. Dans certaines situations, le déséquilibre entre la production de ROS et leur élimination peut augmenter, on parle alors de stress oxydant. Ce déséquilibre peut survenir à la suite de l'exposition de l'animal à un stress externe de nature physique (ex. une augmentation de température

au dessus du seuil critique, les rayonnements ultraviolets, la pollution, des changements de la concentration d'oxygène) ou chimiques (toxines ou xénobiotiques), ou de certaines pathologies tel que l'ischémie-reperfusion, l'hyperoxie, l'hypoxie, les surplus de fer ou l'intoxication (Di Giulio et al., 1989; Nohl et al., 1993; Staniek & Nohl, 1999).

Les animaux possèdent des systèmes bien développés de défenses antioxydantes leur permettant de limiter les dommages dus aux ROS (Halliwell & Gutteridge, 1999). En premier lieu, les organismes peuvent limiter la production des ROS par les mitochondries en utilisant des protéines découplantes, qui permettent aux protons de s'échapper à travers la double couche membranaire. La chute du gradient de proton et donc du potentiel membranaire accélère la respiration, stimule l'oxydation des graisses et augmente la production de chaleur, mais compromet la production d'ATP. Il n'y a cependant toujours aucune relation claire entre la présence des protéines découplantes et la diminution du stress oxydant (Brand, 2000; Cannon et al., 2006).

D'autres moyens sont aussi présents pour contrôler les ROS et limiter leurs dommages plutôt que pour limiter leur production. Le premier moyen consiste à utiliser de petites molécules antioxydantes ou des enzymes antioxydantes pour capter ou neutraliser les radicaux avant qu'ils n'accomplissent des dommages. Les principales molécules antioxydantes utilisées par les cellules sont la vitamine C (ascorbate), la vitamine E (ou α -tocophérol) et le glutathione réduit (GSH; Halliwell & Gutteridge, 1999). La vitamine C permet de neutraliser l'anion superoxyde. La vitamine E récupère les radicaux peroxydes et est probablement le plus important inhibiteur de la formation de peroxydes lipidiques chez les animaux (Halliwell & Gutteridge, 1999). Le GSH permet de métaboliser le peroxyde d'hydrogène (Fernandez-Checa et al., 1998). De plus, certains transporteurs d'électrons peuvent agir comme agents réducteurs pour neutraliser certains ROS. Par exemple, le

cytochrome *c* est réduit par l'anion superoxyde, régénérant ainsi l'oxygène. Le cytochrome *c* réduit produit peut ensuite transférer des électrons au Complexe IV du STE. Ainsi, certains électrons qui s'échappent du système respiratoire mitochondrial pour produire des anions superoxydes peuvent être récupérés et contribuer à la production d'énergie (Turrens, 2003). Un autre transporteur d'électrons qui agit aussi à titre d'agent réducteur des ROS est l'ubiquinol (Beyer, 1990).

Les enzymes antioxydantes sont localisées dans une variété de compartiments cellulaires, incluant les mitochondries (ex. forme contenant du manganèse de la superoxyde dismutase, glutathione peroxydase, thioredoxine réductase), les peroxysomes (ex. catalase), les microsomes (ex. cytochrome P450) et dans le cytosol (ex. forme contenant du cuivre de la superoxyde dismutase, thioredoxine réductase). Les plus importantes enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathione peroxydase (GPx) (Halliwell & Gutteridge, 1999). La SOD catalyse la transformation de l'anion superoxyde en un radical non chargé, le peroxyde d'hydrogène. La CAT et la GPx catabolisent toutes les deux la transformation du peroxyde d'hydrogène. La CAT, présente surtout dans les peroxysomes, le transforme en eau et en oxygène moléculaire et prévient la formation du radical hydroxyle, hautement réactif et dangereux (Kehrer, 2000). La GPx, pour sa part, catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et en glutathione oxydé, en utilisant le GSH (Marín-García, 2005). Comme la GPx est présente dans la mitochondrie et dans le cytosol, le peroxyde d'hydrogène peut être éliminé de l'un ou l'autre des compartiments, dépendamment de la disponibilité du GSH (Marín-García, 2005). La mitochondrie séquestre une portion du pool de GSH grâce à des transporteurs qui permettent à celui-ci de traverser du cytosol jusqu'à la matrice mitochondriale (Fernandez-Checa et al., 1998).

Lorsque les antioxydants de faibles poids moléculaires et les enzymes antioxydantes n'ont pas réussi à neutraliser les ROS, ceux-ci engendrent des

dommages aux lipides, aux protéines et à l'ADN. Les molécules endommagées doivent alors être réparées ou éliminées. Les protéines oxydées sont généralement affectées dans leur fonction, voire complètement inactivées. L'altération des protéines semble constituer un facteur majeur dans le déclin des fonctions mitochondriales (Friguet, 2003) ainsi que dans la dégénérescence cellulaire et de nombreuses maladies (ex. Alzheimer, Parkinson, diabète, syndrome de détresse respiratoire, défaillance rénale chronique et arthrite rhumatoïde) qui apparaissent au cours du vieillissement (Dalle-Donne et al., 2003). Les dommages aux protéines sont réversibles seulement s'ils touchent les résidus cystéines et méthionines, grâce à la présence de systèmes spécifiques de réversion de l'oxydation. Par contre, si l'oxydation touche n'importe quel autre acide aminé, les dommages sont irréversibles et la protéine doit alors être éliminée (Friguet et al., 2000).

La principale voie cellulaire de dégradation des protéines est le protéasome, un complexe multicatalytique protéolytique de haut poids moléculaire (Coux et al., 1996). En général, les protéines oxydées sont plus thermolabiles et deviennent plus susceptibles à la dégradation par le protéasome. Cependant, les protéines très endommagées par l'oxydation peuvent devenir résistantes à la dégradation et s'accumuler. Le protéasome peut être attaqué par les ROS et certains produits de la peroxydation des lipides comme le 4-hydroxy-2-nonenal (Friguet, 2003). La diminution d'activité du protéasome durant le vieillissement permet d'expliquer, au moins en partie, l'accumulation de protéines anormales dans les cellules des différents tissus (Friguet et al., 2000). D'autres systèmes de maintenance des protéines sont également disponibles pour réparer ou dégrader les protéines endommagées par l'oxydation, mais leur importance est moindre (Friguet, 2003). Il s'agit du système peptide méthionine sulfoxide réductase (corrige l'oxydation de la méthionine au sein des protéines), du système thiorédoxine/thiorédoxine réductase (réduit les ponts disulfures entre deux cystéines à l'intérieur des chaînes polypeptidiques) et de la protéase Lon (Bota et al., 2002; Bakala et al., 2003).

Tout comme l'oxydation des protéines, la peroxydation des lipides est considérée comme un phénomène majeur par lequel les radicaux d'oxygène peuvent causer des dommages aux tissus. Les dommages aux lipides conduisent à une altération des propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires, qui affecte les fonctions vitales (Rikans & Hornbrook, 1997). Les acides gras polyinsaturés (PUFAs) situés dans les membranes mitochondriales sont plus facilement peroxydables (Barja et al., 1994; Pamplona et al., 1996). Les ROS réagissent avec les PUFAs en enlevant un proton des systèmes doubles liens conjugués, créant ainsi un radical peroxyde ($\text{LOO}\cdot$) qui initie ensuite la chaîne de peroxydation lipidique (Halliwell & Chirico, 1993). Le degré d'insaturation des membranes cellulaires dans le cœur des vertébrés a été corrélé négativement avec la durée de vie maximum (Pamplona et al., 2000). Un faible degré d'insaturation des biomembranes dans les tissus post-mitotiques des espèces qui vivent longtemps peut avoir des avantages en diminuant la sensibilité à la peroxydation lipidique et en prévenant les dommages aux autres macromolécules dues aux dérivés de la peroxydation lipidique (revue par (Pamplona et al., 2002). Le vieillissement entraîne une augmentation de la proportion d'acides gras polyinsaturés dans les membranes mitochondriales (Lee et al., 1999).

Les cellules disposent aussi de systèmes enzymatiques très sophistiqués pour réparer l'ADN (nucléaire et mitochondrial) endommagé (Friguet, 2003). Des mutations ou délétions s'accumulent quant même suite à un stress ou au vieillissement (Vijg, 2000). Dans la mesure où ces dommages affectent la fidélité de la transcription et de la traduction, des protéines aberrantes peuvent être produites. Ces protéines sont plus susceptibles aux modifications par l'oxydation (Dukan et al., 2000). Il semble que des modifications de l'ADN mitochondrial, notamment une large délétion dont la fréquence augmente avec l'âge, serait en cause dans le déclin de l'activité de certaines fonctions mitochondriales (Friguet, 2003).

En général, les niveaux de défenses antioxydantes sont moins importants dans

les mitochondries cardiaques que dans les mitochondries hépatiques. Selon le consensus général, il semble cependant que les capacités antioxydantes du cœur soient suffisantes, dans des conditions normales de productions de ROS, mais insuffisantes lorsque la productions de ROS augmente à la suite d'un stress, d'une maladie cardiaque, ou d'un épisode d'ischémie (Chen et al., 1994).

L'homéostasie du calcium

Le calcium (Ca^{2+}) est un important facteur contrôlant les fonctions cellulaires. Les variations de la concentration du calcium intracellulaire interviennent dans l'initiation des phénomènes électriques et mécaniques (ex. dépolarisation, contraction des muscles lisses ou striés, sécrétion hormonale, activation d'enzymes). Le calcium est aussi un important régulateur de la respiration mitochondriale. Le pool de calcium cytosolique est limité et doit être finement contrôlé. Dans le cytoplasme des cellules, les organites possédant des membranes (ex. mitochondries, réticulum endoplasmique) sont équipés de système de transport du calcium, permettant une stabilisation rapide et précise de la concentration de calcium dans le cytoplasme cellulaire (Marín-García & Goldenthal, 2002).

Cette régulation est très importante parce qu'en présence de concentrations de calcium cytoplasmique supérieures à $0.5 \mu\text{M}$, les mitochondries accumulent le calcium. Lorsque les mitochondries excèdent leur capacité à accumuler le calcium, il se produit une chute drastique du potentiel membranaire, la libération du calcium accumulé, le gonflement de la matrice et la rupture de la membrane externe. Ce phénomène est appelé la transition de perméabilité mitochondriale et à la mort cellulaire programmée (voir section suivante) (revue par Nicholls & Ferguson, 2002).

La mort cellulaire programmée et la mort cellulaire nécrotique

Les cellules meurent par deux voies principales, soit la nécrose et l'apoptose (ou mort cellulaire programmée). Des dysfonctions mitochondriales sont impliquées dans les deux voies (Nicholls & Ferguson, 2002). La nécrose est une forme passive de mort cellulaire qui se produit habituellement dans une région particulière d'un tissu après un évènement provoquant un déficit de l'apport de sang, comme une attaque cardiaque, un infarctus, une hémorragie ou une infection. La nécrose culmine en bris des membranes plasmiques (Nicholls & Budd, 2000). L'apoptose est caractérisée par une série complexe de changements biochimiques ordonnés, qui implique le métabolisme et la digestion du contenu cellulaire, et culminent en la mort cellulaire, avec une libération réduite du contenu de la cellule. Contrairement à la nécrose, lors de l'apoptose il n'y a ni inflammation, ni gonflement. L'apoptose est initiée par une variété de stimuli externes et d'évènements moléculaires tel que le stress oxydant, la transition de perméabilité mitochondriale ou la libération du cytochrome c. L'apoptose implique habituellement des cellules uniques et isolées qui peuvent induire la mort cellulaire programmée dans un organe particulier à différentes périodes dans le temps (Bernardi et al., 2001).

LE LIEN ENTRE LES MITOCHONDRIES ET CERTAINES MALADIES

Le système respiratoire mitochondriale est souvent endommagée, ce qui résulte en une augmentation de la génération des ROS et une diminution des fonctions mitochondriales.

Nutrition, membranes, stress oxydant et maladies cardiovasculaires

Les sociétés occidentales d'aujourd'hui font face à une augmentation de la prévalence de diverses maladies incluant des maladies cardiovasculaires, des cancers,

des maladies inflammatoires et auto-immunes. Ces maladies ont toutes été reliées aux lipides présents dans l'alimentation, entre autre à une diminution du ratio d'acides gras omega-3/omega-6 (Simopoulos, 2002a). La composition en acides gras de l'alimentation influence la composition des membranes cellulaires et mitochondriales, entraînant des effets sur les propriétés fonctionnelles des protéines enlisées dans ces membranes. Les complexes du système de transport des électrons et de l'OXPPOS sont associés à la membrane mitochondriale interne et jouent un rôle central dans le métabolisme cardiaque, ce qui a conduit plusieurs équipes de chercheurs à étudier les effets de l'alimentation sur ces protéines (McMurchie, 1988; Yamaoka et al., 1988; McMillin et al., 1992; Demaison et al., 1994; Bernardier, 2001; Jeejeebhoy & Sole, 2001; Quiles et al., 2001; Padma & Devi, 2002; Mataix et al., 2004; Ovide-Bordeaux & Grynberg, 2004).

Les acides gras oméga-3 sont présents dans les huiles provenant des plantes terrestres, principalement sous forme d'acides gras à 18 carbones (acide α -linoléique, C18:3n-3). Les poissons et les fruits de mer, pour leur part, contiennent des acides gras oméga-3 à longues chaînes (acide eicosapentaénoïque, C20:5n-3 et acide docosahexaénoïque, C22:6n-3; voir tableau 0.1). Contrairement aux acides gras saturés qui ont été associés à de nombreux effets négatifs sur la santé, les acides gras polyinsaturés de type oméga-3 ont démontré une influence positive dans le traitement ou la prévention de l'hypertension, de la maladie de Crohn, de l'arthrite rhumatoïde et de l'asthme ainsi que pour diminuer les risques d'arrêt cardiaque primaire, de maladies des artères coronaires et provoquer la diminution des triglycérides dans la sérum sanguin (Holub, 2002; Simopoulos, 2002a; Bhatnagar & Durrington, 2003; Kris-Etherton et al., 2003; Ruxton et al., 2004). Un rôle positif de ces mêmes acides gras a aussi été suggéré pour prévenir de nombreux désordres psychiatriques (Freeman, 2000). Puisque l'acide α -linoléique peut être transformé en acides gras EPA et DHA dans le corps humain (Bhagavan, 2002), le bénéfice pour la santé de consommer des huiles végétales devrait être le même que celui relié à la

consommation d'acides gras marins. Il y a cependant très peu d'évidences que la consommation d'huile végétale riche en acide α -linoléique procure le même bénéfice pour prévenir et traiter les maladies chroniques telles que les maladies coronaires.

Une des conséquences d'un changement de la composition en acides gras des membranes mitochondriales suite à un ajustement du type d'acides gras dans l'alimentation est un changement de la résistance de ces membranes au stress oxydant. Un faible degré d'insaturation des biomembranes peut conférer un avantage en diminuant leur sensibilité à la peroxydation lipidique et en prévenant les dommages induits par cette peroxydation sur d'autres macromolécules (Pamplona et al., 2000) tels que les protéines du système de transport des électrons. Des études contredisent cependant cette observation en démontrant qu'une diète riche en acides gras omega-3 polyinsaturés à longue chaînes augmente le contenu des membranes en ce type d'acides gras et peut renverser certains effets néfastes du vieillissement, incluant une faible production d'énergie par les mitochondries (Pepe, 2005).

Mutations de l'ADN mitochondrial et nucléaire

La mitochondrie possède son propre génome appelé génome mitochondrial. Une partie des protéines mitochondriales est codées par ce génome alors que l'autre partie est codée par le génome nucléaire (Scheffler, 1999). Les anomalies du STE peuvent donc résulter de mutations affectant les sous unités protéiques de ces deux génomes, et provoquent un groupe d'affectations variées appelées maladies mitochondriales (Wallace, 2000). La plupart des mutations pathogènes de l'ADN mitochondrial affectent le cœur, en plus d'être associées avec une variété d'autres manifestations cliniques au niveau du muscle squelettique et des système nerveux central, endocrinien et rénal (revue par Luft et al., 1962; Wallace, 1999; Wallace, 2000).

Des progrès importants en biologie moléculaire ont permis d'améliorer de façon très marquée la caractérisation des défauts génétiques qui conduisent à ces maladies mitochondriales. Il demeure cependant des difficultés pour faire le lien entre l'apparition d'une mutation pathogène de l'ADN mitochondrial ou la présence d'une anomalie d'un complexe donné du STE ou de l'OXPPOS et l'apparition de symptômes cliniques spécifiques (Schon, 2000; DiMauro & Schon, 2001). Les manifestations cliniques et symptômes associés à des défauts génétiques et biochimiques similaires divergent selon les patients ou tissus. Le manque de corrélation entre la localisation d'une mutation de l'ADN mitochondrial et la détection d'une baisse de production d'énergie par les mitochondries semble lié à l'excès apparent de certaines composantes du STE (Rossignol et al., 1999; Rossignol et al., 2000; Rossignol et al., 2003). Dans ce contexte, il devient important de bien évaluer le coefficient de contrôle exercé par chacune des étapes individuelles du STE et ce dans des conditions qui tiennent compte autant que possible de la complexité du système de production d'énergie des mitochondries.

Ischémie-reperfusion

L'ischémie du myocarde est un déficit d'oxygène au cœur qui se produit lorsque l'apport de sang au cœur est insuffisant par rapport aux besoins du tissu. Lorsque le déficit d'oxygène compromet le métabolisme mitochondrial, le cœur peut utiliser la créatine phosphate pour produire de l'ATP. À l'intérieur de la cellule, la créatine est convertie en phosphocréatine par l'ATP, une réaction catalysée par la créatine kinase. Dans le muscle squelettique, la phosphocréatine régénère l'ATP à partir de l'ADP, maintenant ainsi un haut niveau d'ATP requis durant l'exercice. Le cœur, cependant, fonctionne normalement en mode aérobie, et possède un pool de phosphocréatine réduit (Marín-García, 2005).

Dans la région du cœur qui manque d'oxygène, l'oxydation des acides gras et

du pyruvate diminue et la production d'ATP est rapidement compromise par l'épuisement des réserves de créatine phosphate. L'augmentation de l'hydrolyse de l'ATP et l'accumulation de lactate provoquent une diminution du pH et l'acidose intracellulaires, et une inhibition des fonctions contractiles cardiaques. De plus, l'ischémie du myocarde induit une réduction de l'activité des Complexes IV et V et une augmentation des niveaux de délétions de l'ADN mitochondrial (Lesnefsky et al., 2001b). Une ischémie prolongée conduira à la déplétion de l'ATP et finalement à la mort cellulaire nécrotique (Marín-García, 2005).

Paradoxalement, pour les mitochondries fonctionnelles, les dommages ischémiques se font sentir principalement durant la reperfusion. L'activation de l'OXPPOS cause une augmentation de l'accumulation des ROS avec une augmentation de la peroxydation lipidique, qui résulte en des niveaux de cardiolipines plus faibles dans la membrane interne et des effets conséquents sur l'activité du Complexe IV (Paradies et al., 1999). L'ischémie-reperfusion est un médiateur de l'ouverture du pore de transition de perméabilité, et peut causer l'apoptose (Gottlieb et al., 1994).

EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA BIOLOGIE FONCTIONNELLE

L'étude des effets de la température est un des domaines les plus prolifiques de la biologie fonctionnelle (pour des revues, voir (Prosser, 1986; Cossins & Bowler, 1987; Johnston & Dunn, 1987; Hochachka & Somero, 2002). La popularité de la biologie thermique vient de sa grande signification pour les systèmes biologiques. La température affecte pratiquement tous les aspects de la physiologie d'un organisme, de la structure de base des macromolécules jusqu'à la vitesse à laquelle les réactions chimiques se produisent. Une hausse de température augmente le mouvement et l'énergie des molécules qui interagissent et ainsi accélère les vitesses des réactions. Virtuellement, tout à l'intérieur d'un organisme dépend de son environnement

thermique, et les mitochondries ne font pas exception à cette règle.

Ectothermie et endothermie

La plus grande proportion de la biomasse terrestre évolue dans des environnements froids (≤ 5 °C ; Margesin & Schinner, 1999). C'est d'une importance capitale quand on sait que la majorité des organismes vivants, soit les ectothermes, sont incapables de réguler leur température corporelle. Les ectothermes sont poïkilothermes lorsque leur température change en fonctions de l'environnement. Par contre, lorsque les organismes ectothermes utilisent des moyens comportementaux pour sélectionner leur température corporelle, ils ne sont pas considérés comme des organismes poïkilothermes (Hochachka & Somero, 2002). Les ectothermes comprennent la majorité des animaux à l'exception près des oiseaux, des mammifères, de certains insectes et de quelques cas isolés de poissons (ex. thon) et de reptiles (ex. femelle python en période de reproduction). Étant donné que ces organismes sont en équilibre thermique avec leur environnement, les constituants de leurs cellules, incluant les mitochondries, doivent être en mesure de survivre aux fluctuations de température rencontrées.

L'effet marqué et généralement dominant que joue la température sur les patrons de distribution des organismes ectothermes procure une forte justification pour étudier les effets marqués de la température sur les systèmes vivants à tous les niveaux d'organisation, incluant le métabolisme mitochondrial. De telles études offrent des outils importants pour mieux comprendre comment les changements de température (dus entre autre aux changements climatiques) vont affecter et la physiologie, l'écologie et la distribution des organismes. Elle permet de répondre à des questions telles que comment le métabolisme mitochondrial a évolué pour répondre aux besoins énergétiques dans des environnements et des conditions thermiques variables et parfois extrêmes? Ou encore comment les fluctuations de

températures corporelles qui se produisent durant la journée, la saison et à plus grande échelle, vont affecter ces organismes?

Il en est autrement pour les espèces endothermes, tel que la plupart des mammifères, qui sont capables de conserver des températures corporelles relativement stables (homéothermie) par une combinaison de génération de chaleur (endothermie) et un contrôle serré des échanges de chaleur avec l'environnement (thermorégulation). Le terme hétérotherme est alors utilisé pour désigner les endothermes qui choisissent de changer leur température corporelle en fonction de l'environnement. C'est le cas par exemple des mammifères hibernants, qui réduisent leur température corporelle et leur taux métabolique durant les saisons où la vie est compromise par les conditions environnementales de température et de disponibilité de nourriture. Les organismes endothermes homéothermes pour leur part, conservent une température corporelle stable (Hochachka & Somero, 2002).

Les adaptations face aux variations de température corporelle

Les processus associés aux membranes sont généralement plus sensibles aux changements de température que les processus qui se produisent dans la phase aqueuse de la cellule. Cette sensibilité est due aux effets prononcés de la température sur les propriétés physiques des lipides membranaires. La fluidité d'une membrane est déterminée par plusieurs variables physiques et chimiques. La température de fusion des acides gras diffère selon la longueur des chaînes et leur contenu en doubles liens : les acides gras plus courts et/ou plus insaturés sont plus fluides (Hochachka & Somero, 2002) suggérant que les membranes jouent un rôle clé dans les limites de tolérance thermique des organismes.

Des organismes aussi divers que des plantes (Uemura & Steponkus, 1997), des bactéries (Hebert, 1981), des poissons (Clarke, 1987) et des mammifères hibernants

(Aloia, 1988) modifient la composition lipidique de leurs membranes cellulaires et mitochondriales suite à l'acclimatation ou l'adaptation à une température corporelle variable. Suite à une baisse de température corporelle, ils augmentent la proportion des acides gras insaturés et le nombre de liens doubles à l'intérieur des acides gras insaturés (adaptation homéovisqueuse; (Sinensky, 1974) et/ou augmentent le ratio de phosphatidyl éthanolamine/phosphatidyl choline (adaptation homéophasique (Hazel, 1995). Ces adaptations permettent de baisser la température de transition à laquelle les phospholipides passent de la phase fluide à la phase gel (White & Somero, 1982; Hazel, 1988; Gracey et al., 1996) et de conserver la structure de la membrane à basse température (Hazel, 1995). Selon la plupart des études, ces modifications contribuent à préserver les fonctions des protéines enlisées dans les membranes suite à une baisse de température (revues de Sinensky, 1974; Hazel, 1988; Gracey et al., 1996; Hochachka & Somero, 2002).

D'autres caractéristiques des mitochondries ont été associées aux organismes faisant face à des environnements froids soit (1) l'augmentation de la quantité de mitochondries et des protéines mitochondriales (Guderley & St-Pierre, 2002); (2) des changements qualitatifs dans les capacités enzymatiques ou des affinités pour le substrat (revue par (Somero, 1997; Hochachka & Somero, 2002; Guderley, 2004; Das, 2006); (3) des changements de densités des villosités des membranes dans lesquelles les protéines mitochondriales baignent (revue par Guderley, 2004); et (4) la régulation du découplage (Das, 2006). Mais il reste encore beaucoup d'études à faire pour réellement comprendre comment la température agit le processus complexe du métabolisme mitochondrial.

Hypothermie et hyperthermie chez les endothermes

Les mammifères conservent en général une température corporelle constante; ils sont dits endothermes. Quel est l'intérêt d'étudier les effets des variations de

température corporelle sur la physiologie des mammifères? L'avantage est justement le fait qu'ils soient très sensibles aux variations de température. Cette sensibilité en fait de bons modèles pour mieux comprendre la complexité et les limitations du métabolisme reliées à la température. De plus, outre les périodes d'hibernation chez certains mammifères, l'étude de la sensibilité thermique des cellules de mammifères peut avoir des applications cliniques intéressantes.

L'hypothermie est la méthode la plus efficace pour réduire temporairement et réversiblement le métabolisme cardiaque. Cette méthode est utilisée extensivement pour protéger le cœur des effets néfastes anticipés de l'ischémie. L'hypothermie atténue les mécanismes de production d'énergie mitochondriale (respiration mitochondriale et OXPHOS) durant l'ischémie, conduisant à une réduction de la synthèse d'ATP. Lors de la reperfusion du cœur (retour à la température physiologique), la respiration mitochondriale est plus fonctionnelle et l'ATP est régénéré plus rapidement.

C'est le chirurgien cardiaque canadien Wilfred Bigelow qui a été le premier à utiliser l'hypothermie en chirurgie cardiaque. Probablement grâce à ses recherches antérieures sur les engelures, il s'est réveillé une nuit avec l'idée de baisser la température corporelle pour réduire le métabolisme et diminuer les besoins en oxygène et ainsi permettre d'arrêter la circulation pour pratiquer une opération sur le cœur. Après près de 10 ans d'expérimentation sur des animaux, la première opération à cœur ouvert sur un humain a été réalisée en 1954, grâce à l'hypothermie (Bigelow, 1984). Ce n'était alors que le début de la longue histoire de l'utilisation de l'hypothermie pour des applications chirurgicales. L'hypothermie fait maintenant partie intégrale de la chirurgie cardiaque contemporaine.

L'hypothermie cardiaque est utilisée dans différentes situations cliniques. Une diminution de température de quelques degrés permet de combattre les effets néfastes d'une ischémie causée soit par l'arrêt de la circulation sanguine durant les chirurgies

cardiaques (Bigelow et al., 1950; Lewis & Taufic, 1953; Swan et al., 1953; Gibbon, 1954), par un infarctus du myocarde (Bigelow et al., 1950; Lewis & Taufic, 1953; Swan et al., 1953; Gibbon, 1954; Hale & Kloner, 1999; Dae et al., 2002; Kloner & Rezkalla, 2004), ou par l'occlusion d'une artère coronaire (Hale & Kloner, 1999). Une diminution plus importante de température (jusqu'à autour de 4 °C) permet de protéger le cœur d'un donneur en vue d'une transplantation (Sealy, 1989). Cependant, le cœur conservé à basse températures en vue d'une transplantation offre une durée de conservation très courte (pas plus de 6 heures), par rapport aux reins (36 heures), au pancréas (24 heures) et au foie (12 heures) (Fuller, 1987; Gnaiger et al., 2000a). Les dommages aux mitochondries cardiaques reliés à la baisse de température suivie d'une reperfusion sont reconnus comme un facteur limitant la préservation du cœur chez les mammifères. Les effets néfastes encourus incluent une réduction de la production d'ATP (Gnaiger et al., 2000a), une augmentation du stress oxydatif (Rauen et al., 1997; Camara et al., 2004), un débalancement ionique (Martin et al., 1972; Southard & Belzer, 1980), des dommages aux membranes, la libération du cytochrome *c* et une induction de l'apoptose et de la nécrose (Gnaiger et al., 2000a). Des effets similaires se font aussi sentir chez les mitochondries de mammifères exposées à des températures élevées (≥ 40 °C; Qian et al., 2004).

DÉCORTIQUER LES EFFETS DE LA TEMPÉRATURE

La production d'énergie dans les mitochondries implique de nombreuses réactions. Par le passé, très peu d'études ont tenté de décortiquer ce processus pour mieux comprendre les effets de la température. Deux études principales se sont toutefois démarquées, l'une dans le foie de rat (Dufour et al., 1996) et l'autre dans le ver à tabac (*Manduca sexta*; Chamberlin, 2004). Ces études ont utilisé une approche nommée «top-down control analysis» dans laquelle ils ont séparé l'OXPPOS en trois sous-systèmes liés par un intermédiaire commun et unique, la force proton motrice.

Le premier sous-système assure l'oxydation des substrats et comprend la PDH, le cycle de l'acide citrique, le système de transport des électrons et le transport des métabolites. Les deux autres sous-systèmes sont la libération des protons et le système de phosphorylation (F_1F_0 -ATPase, adénine nucléotide translocase). Alors que le premier système permet de générer une force proton motrice, les deux autres systèmes assurent la dissipation de cette force.

Ces analyses révèlent que la température provoque des changements de respiration mitochondriale (supportée par le succinate, stade 3 en présence d'ADP) qui sont principalement dictés par le système d'oxydation des substrats chez l'organisme ectotherme, soit le ver à tabac. Chez le rat, le contrôle entre 25 et 37 °C est aussi exercé principalement par le système d'oxydation des substrats alors qu'à basse température (4 °C) le contrôle est partagé entre le système d'oxydation des substrats et le système de phosphorylation. Ces analyses présentent un intérêt certain mais ne permettent malheureusement pas de déterminer quelles réactions parmi celles impliquées dans l'oxydation des substrats dictent la thermosensibilité de la respiration mitochondriale. Pour mieux comprendre comment la température agit sur la production d'énergie par les mitochondries, il incombe maintenant de pousser plus loin dans la décortication du métabolisme mitochondrial.

OBJECTIFS DU PROJET

L'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre les effets de la température sur le métabolisme mitochondrial cardiaque.

Le **Chapitre I** vise à étudier l'effet des changements de composition en acides gras des membranes sur les fonctions mitochondriales et leur thermosensibilité dans les mitochondries cardiaques de rats. Nous voulons donc vérifier si l'augmentation de l'insaturation des acides gras membranaires suite à l'adaptation ou l'acclimatation à

basse température corporelle représente réellement un avantage pour la production d'énergie mitochondriale. De façon à modifier la composition membranaire sans occasionner d'autres modifications reliées à l'acclimatation à basse température, des rats sont nourris avec des aliments contenant différents types d'huiles. Trois groupes de rats sont nourris pendant 4 mois avec des aliments variant uniquement dans le type d'huile soit l'huile de noix de coco (riche en gras saturés), l'huile d'olive (riche en gras monoinsaturés) et l'huile de poisson (riche en gras polyinsaturés à longues chaînes de type oméga-3). Vu la grande susceptibilité des acides gras hautement polyinsaturés à la peroxydation (Piche et al., 1988), nous avons aussi ajouté un quatrième aliment à base d'huile de poisson mais avec un supplément d'un puissant antioxydant, le probucol. Le profil d'acides gras des membranes mitochondriales est ensuite mis en relation avec le taux de respiration mitochondriale maximal (induit au niveau du Complexe I, II et IV) à trois températures (5, 21 et 37 °C). Le taux de respiration maximal est atteint par les mitochondries lorsque l'apport en substrat est illimité. Dans les cellules, cependant, les complexes mitochondriaux fonctionnent souvent en dessous de la vitesse maximale. Nous avons aussi évalué l'affinité des mitochondries pour le pyruvate à différentes températures (5 et 35 °C) pour permettre de mesurer des changements plus subtils des fonctions mitochondriales et du transport du substrat à l'intérieur de la mitochondrie.

Dans le **Chapitre II**, la biologie comparative est aussi utilisée pour mieux comprendre comment les fonctions mitochondriales s'ajustent à des changements de température. L'objectif de ce chapitre est de comparer la sensibilité thermique de différents éléments fonctionnels de la mitochondrie avec la sensibilité thermique de la respiration mitochondriale. En étudiant un endotherme (le rat), donc à priori un organisme très sensible aux variations de température, et un organisme ectotherme (le loup Atlantique, *Anarhichas lupus*) très bien adaptés aux variations de températures corporelles, nous envisageons d'identifier les éléments responsables de l'altération des propriétés fonctionnelles des mitochondries à basse ou à haute température.

Le **Chapitre III** vise à faire le pont entre les connaissances acquises dans les deux premiers chapitres et le domaine de la biologie médicale. La détection des dysfonctions du STE chez les mammifères est souvent réalisée dans des conditions qui ne correspondent pas aux conditions physiologiques. Dans les cellules *in vivo*, les mitochondries fonctionnent avec un mélange complexe de substrats énergétiques alors que les mesures du taux de respiration mitochondriale se font le plus souvent avec un mélange très simplifié. En général, la respiration mitochondriale est aussi mesurée à une température entre 20 et 30 °C (pour une revue des températures utilisées voir le tableau 4 dans N'Guessan et al., 2004). Le manque de connaissance sur l'influence que cette température non physiologique peut avoir par rapport à ce qui se passe à 37 °C est cependant flagrant chez les mammifères. Dans ce chapitre, nous allons évaluer l'impact que peut avoir la température et les substrats utilisés dans le diagnostic des anomalies mitochondriales et dans l'estimation du contrôle réel exercé par différentes étapes du métabolisme mitochondrial (CcOX et système de phosphorylation).

Ce projet de doctorat est utile tant d'un point de vue fondamental que d'un point de vue appliqué. Il aide à comprendre les effets de la température sur le métabolisme mitochondrial. Il offre aussi de nombreuses possibilités d'amélioration des techniques de détection des anomalies mitochondriales. Enfin, il aide à comprendre les effets de situations cliniques affectant la température sur la production d'énergie par les mitochondries cardiaques.

CHAPITRE I

COMPOSITION MEMBRANAIRE

DOES MEMBRANE FATTY ACID COMPOSITION MODULATE MITOCHONDRIAL FUNCTIONS AND THEIR THERMAL SENSITIVITIES?

Lemieux¹, H., P.U. Blier¹ & J.-C. Tardif²

¹Laboratoire de Biologie Intégrative, Université du Québec, 300, allée des Ursulines,
Rimouski, Québec, Canada, G5L 3A1

²Institut de Cardiologie de Montréal, 5000, rue Bélanger, Montréal, Québec, Canada,
H1T 1C8, Canada

Une partie des résultats de ce chapitre a été publiée dans le résumé de conférence
suivant :

Blier, P.U., H. **Lemieux**, A.L. Bulteau, B. Friguet & J.-C. Tardif. 2006. Does the fatty
acid composition affect metabolic functions and oxidative stress status in rat heart
mitochondria? *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (5-6, Suppl. 1): 404.

Sous presse dans la revue *Comp. Biochem. Physiology A. Molecular and Integrative
Physiology*

RESUME EN FRANÇAIS

Nous avons étudié les effets d'un changement de composition en acides gras des membranes mitochondriales cardiaques induite par l'alimentation sur les fonctions et la sensibilité thermique des complexes du STE. Quatre groupes de rats ont été nourris avec des aliments dont la composition en huile (huile de noix de coco, huile d'olive, ou huile de poisson) et en antioxydant variait (avec ou sans probucol). Après 16 semaines d'alimentation, les mitochondries cardiaques des rats nourris à l'huile de noix de coco et à l'huile d'olive se démarquent des mitochondries des rats nourris à l'huile de poisson par un contenu plus faible en acides gras polyinsaturés à longues chaînes et un indice d'insaturation réduit. Ces différences de la composition en acides gras ne peuvent être reliées à des différences de la respiration mitochondriale induite au niveau des Complexes I, II et IV ou de la thermosensibilité de ces complexes. Les mitochondries cardiaque du groupe de rats nourris à l'huile de noix de coco démontrent un affinité pour le pyruvate réduite à 5 °C ($K_{\text{mapp}} = 6.4 \pm 1.8$) comparée à tous les autres groupes ($K_{\text{mapp}} = 3.8 \pm 0.5$; 4.7 ± 0.8 ; 3.6 ± 1.1 , pour les huiles d'olive, de poisson et de poisson+probucol, respectivement). Du moins chez le rat, nos résultats ne supportent pas un rôle prépondérant de la composition en acide gras des membranes sur les fonctions des protéines mitochondriales qui y baignent ou sur leurs thermosensibilités.

Mots clés : Coeur de rat, composition en acides gras des membranes, sensibilité thermique, système de transport des électrons, huile de poisson, huile de noix de coco, huile d'olive, probucol

ABSTRACT

In our study, we investigated the effect of modifying fatty acid modification of heart mitochondrial membranes by dietary intervention on the functions and thermal sensitivity of electron transport system complexes embedded in the inner mitochondrial membrane. Four groups of rats were fed diets differing in their fat (coconut, olive or fish oil) and antioxidant (fish oil with or without probucol) contents. After 16 weeks of feeding, the coconut and olive oil groups had lower long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids contents and a lower unsaturation index compared to both fish oil groups. These differences in fatty acid composition were not related to any differences in the mitochondrial respiration rate induced at Complexes I, II or IV, or to differences in their thermal sensitivity. The coconut oil group show a lower mitochondrial affinity for pyruvate at 5°C ($K_{mapp} = 6.4 \pm 1.8$) compared to any other groups ($K_{mapp} = 3.8 \pm 0.5$; 4.7 ± 0.8 ; 3.6 ± 1.1 , for olive, fish oil and fish oil and probucol groups, respectively). At least in rat heart, our results do not support a major impact of the fatty acid composition of the mitochondrial membrane on the function of mitochondrial enzymatic complexes or on their temperature sensitivity.

Keywords: Rat heart, membrane fatty acid composition, thermal sensitivity, electron transport system, fish oil, coconut oil, olive oils, probucol

INTRODUCTION

The electron transport system (ETS) is a multi-component system composed of four enzymatic complexes (Complexes I, II, III and IV) enfolded within the inner mitochondrial membrane. The coupling of the ETS with the phosphorylation system allows the aerobic production of ATP. Several studies have suggested that ETS enzymes activities may be regulated by the membrane's fatty acid composition (Brand et al., 1991; Dahlhoff & Somero, 1993; Brand et al., 1994a; Brand et al., 1994b; Brookes et al., 1998; Vazquez-Memije et al., 2005; Kraffe et al., 2007). The effect of changes in membrane composition on mitochondrial respiratory capacity should be of particular importance in the heart, a tissue highly reliant on energy production by mitochondria.

However, studies on the effect of diet modulation on the fatty acid composition of mitochondrial membrane did not show consistent effect on mitochondrial functions. For example, animals supplemented with fish oil, which is rich in long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), showed an increased PUFA content in their mitochondrial membranes. Following these changes in membrane composition, decrease (Yamaoka et al., 1988), increase (McMillin et al., 1992), and lack of change (Royce & Holmes, 1984; Padma & Devi, 2002) in mitochondrial respiration rate and/or Complex IV (cytochrome *c* oxidase) activity were observed. The reaction could vary according to the substrates provided as cardiac mitochondria of rat fed a diet rich n-3 fatty acid showed a lower rate of succinate oxidation but similar rate of glutamate+malate, pyruvate+malate, or palmitoyl carnitine+malate oxidation compared to the reference or the n-6 fatty acid fed groups (Pepe et al., 1999). The real impacts of fatty acid modifications on the functions of proteins embedded in the inner mitochondrial membrane are therefore not clearly understood.

The diet's fatty acid composition is not the only factor affecting mitochondrial membrane fatty acid profile in animals. Acclimation and adaptation to low body

temperature have also been shown to modify the fatty acid and phospholipid composition of cellular and mitochondrial membranes (Caldwell & Vernberg, 1970; Sinensky, 1974; Aloia, 1988; Hazel, 1988; Hazel & Williams, 1990; Hazel, 1995; Kraffe et al., 2007). Temperature exerts strong effects on the physical properties of the cell's lipid component and on the membrane's phospholipid bilayer. During acclimation to low temperature, ectothermic animals usually increase the proportion of unsaturated fatty acids and the double bonds inside the unsaturated fatty acids in their membranes; these changes are known as homeoviscous adaptation (review by Sinensky, 1974; Hazel, 1988; Hazel & Williams, 1990; Cossins, 1994). Other suggested membrane adaptations to low temperature were the change in proportion of phospholipids classes (increase in phosphatidylethanolamine relative to phosphatidylcholine) and increase in cholesterol content (Hazel & Williams, 1990; Crockett & Hazel, 1995; Hazel, 1995). According to previous studies, these adaptations preserve the membrane in a fluid liquid-crystalline phase and avoid the compact gel phase at low temperatures (reviewed by Hazel, 1984; Hazel, 1995; Gracey et al., 1996; Abele & Puntarulo, 2004). Thermally induced changes in the physical state of lipids may modify the barrier properties of the membrane (Quinn, 1985; Drobnis et al., 1993; Hansen, 1993; Lande et al., 1995) and the function of membrane-embedded proteins, such as ion pumps (Silvius & McElhaney, 1980), transporters (Thilo et al., 1977) and enzymes (Sandermann, 1978; Innis & Clandinin, 1981; Quinn, 1981; McMurchie et al., 1983; Kraffe et al., 2007). For example, cold acclimation was associated with higher specific activity of succinate dehydrogenase (Complex II; Hazel, 1972), F_0F_1 -ATPase (Itoi et al., 2003) and cytochrome *c* oxidase (Wodtke, 1981; Kraffe et al., 2007) in fish skeletal muscle.

The acclimation or adaptation to low temperature is a complex process during which the animals face many changes other than membrane composition. These changes occur at the level of the organisms (e.g., rate of respiration, feeding, growth and locomotion; Hochachka & Somero, 2002), the organs (e.g., modification in

ventricular mass and in heart performances; Gamperl & Farrell, 2004), the organelles (e.g. changes in mitochondria content; Crockett & Sidell, 1990; Johnston et al., 1998), or the molecules (e.g., protein catalytic capacity and substrate affinity; Somero, 1997; Hochachka & Somero, 2002). As some of those changes could contribute to the preservation of mitochondrial function at low temperature, evidence that variation in membrane fatty acid composition are responsible for change in membrane protein functions is correlative rather than causal. The causal links between membrane fatty acids composition and the change in membrane protein functions remains to be clearly established.

Our study addressed the effect of changes in mitochondrial membrane composition on the function of mitochondrial proteins and their thermal sensitivities. The choice of an endothermic species as the model and of the modification of the membrane fatty acid composition with diet allowed us to avoid the multiple changes that occur with thermal acclimation of an ectotherm species. The rat heart also constitute an interesting model according to the increasing evidences in the literature of a link between the prevalence of cardiovascular disease and the type of lipids present in the diet in mammals (Simopoulos, 2002b; Din et al., 2004; Ruxton et al., 2004). Furthermore, as the endotherms mitochondria are more influenced by temperature compared to ectotherm mitochondria (Smith, 1977; Berner, 1999), the impact of membrane composition on the thermal sensitivity of mitochondrial metabolism could be more easily observed in rat heart. Rats were fed with one of the three diets: one rich in saturated fatty acids (SFAs; coconut oil), another rich in monounsaturated fatty acids (MUFAs; olive oil) or a diet rich in long-chain PUFAs (fish oil). As PUFAs are more susceptible to lipid peroxidation (Piche et al., 1988) that may influence the membrane properties, another group of rats were fed with fish oil supplemented with probucol, a liposoluble antioxidant. We first measured the maximal respiration rate of different ETS complexes (I, II, and IV) and citrate synthase (CS) at 3 temperatures (5, 20 and 35°C) in heart mitochondria of the

different diet groups. Maximal oxygen consumption is an indication of the catalytic capacity if it is provided with unlimited and non-inhibiting amounts of substrates. CS activity was used as an indicator of the mitochondrial content. Secondly, we evaluated the change in the apparent affinity of mitochondria for pyruvate (the apparent Michaelis-Menten constant, K_{mapp}) at different temperatures and attempted to relate this to the mitochondrial membrane composition. Pyruvate was chosen because previous studies showed the limitation of mitochondrial respiration with pyruvate+malate as substrates at low temperatures in rat heart (Lemieux H, Tardif J-C, Dutil J-D and Blier PU, unpublished data, Université du Québec, Rimouski, Canada).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Eighty male Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St. Constant, Québec, Canada) weighing 67.1 ± 8.6 g were individually housed and maintained at a temperature of 20°C and a 12h:12h light : dark cycle. The rats received water *ad libitum* and were randomly assigned to one of the four experimental diets (n=20/diet) that differed only in fatty acid composition and antioxidant (probucol) content (Tables 1.1 and 1.2). Rats were fed controlled rations for 16 weeks. The following daily rations were used: 4.4 g for days 1 and 2, 6.9 g from day 3 to 7, 9.7 g for week 2, 13.8 g for week 3, 16.9 g for week 4, 19.0 g for week 5-8, 20.0 g for week 9-16. These diets and rations were adequate to fulfill the essential fatty acid requirements for normal development (Bhagavan, 2002). At the end of the feeding period, rats (496.2 ± 27.0 g) were starved for 15-17 h and then anaesthetized with ketamine (87.5 mg/kg body mass⁻¹) and xylazine (2.5 mg/kg body mass⁻¹) injected intraperitoneally. Animal experiments were approved by the local animal ethics committee in

compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Isolation of heart mitochondria

Cardiac mitochondria were prepared by the method of Gnaiger & Kuznetsov (2002) without trypsin addition. Immediately after weighing, ventricles were rinsed with ice-cold isolation medium (300 mM sucrose, 0.2 mM EDTA, 10 mM Hepes and 0.1% BSA, pH 7.2; Gnaiger & Kuznetsov, 2002). Both ventricles (about 1 g) from a freshly isolated heart were carefully minced, washed free of blood, and suspended in 10 volumes of ice-cold isolation medium. The tissue was homogenized with a tight-fitting Teflon/glass homogenizer (5 strokes) followed by centrifugation for 10 min at 600 g (4 °C). The supernatant was decanted and centrifuged at 8000 g for 15 min (4 °C). The pellet was washed with 1 ml of isolation medium to remove the fluffy upper layer. The tightly packed dark pellet was resuspended in 10 ml of isolation medium and centrifuged for 10 min at 8000 g (4 °C). The pellet was washed and resuspended in 1.5 ml of isolation medium before centrifugation in a microtube for 10 min at 8000 g (4 °C). The final pellet was directly used for measurement of the fatty acid composition of mitochondrial membranes or suspended in 500 µl of mitochondria preservation medium to a final mitochondrial protein concentration of 7-15 mg protein·ml⁻¹ for measurement of mitochondrial functions. The mitochondria preservation medium (Gnaiger et al., 2000a), with slight modifications) contained 110 mM sucrose, 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 60 mM K-lactobionate, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM taurine, 20 mM histidine, 20 mM Hepes, 1% BSA, 20 µM Vitamin E, 1.0 µM leupeptine, 3.0 mM glutathione reduced, 2 mM pyruvate, 2 mM malate and 2 mM Mg-ATP (pH 7.1). For measurement of mitochondrial affinity for pyruvate, mitochondrial preservation medium was prepared without malate, pyruvate and Mg-ATP. The mitochondrial preparations were stored on ice and used for mitochondrial respiration measurements. A portion of each mitochondrial suspension

was diluted in four volumes of 25 mM potassium phosphate buffer with 5 mM MgCl₂ (pH 7.2) and homogenized 10 seconds with a Tissue Tearor (Biospec Products Inc., Bartlesville, OK, USA). This portion was separated into aliquots and immediately frozen at -80°C for citrate synthase activity, protein content and fatty acid composition determinations.

Oxygen consumption of mitochondrial complexes

Mitochondrial oxygen consumption was measured using an oxygraph Oxyg 32 (Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, Norfolk, England). The respiration chambers were maintained at the incubation temperature with a circulating refrigerated water bath. Measurements were done in a final volume of 500 µl at 5°C and 1000 µl at 20 and 35°C. The mitochondrial respiration medium contained 200 mM sucrose, 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM taurine, 20 mM HEPES and 0.2% BSA (pH 7.2; Gnaiger & Kuznetsov, 2002). Malate (2 mM) and pyruvate (10 mM) were added for measurement of the State 2 (in the absence of ADP) of Complex I. We added 1 mM ADP to measure the active State 3 of Complex I. Respiration was stimulated by the addition of 10 µM of cytochrome *c* (State 3c). Complex I was inhibited with 3 µM rotenone, and Complex II was measured after addition of 10 mM succinate. Complex IV was measured following the inhibition of Complex III with 5 µM antimycin a and the addition of ascorbate (5 mM) and N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD, 0.5 mM). Oxygen flux due to autoxidation of TMPD and ascorbate was subtracted from the total oxygen flux (Gnaiger et al., 1995; Gnaiger et al., 1998a). Respiratory control ratios (RCRs) for Complex I-induced respiration were calculated as State 3/State 2. Measurements were done successively at 5, 20 and 35°C. Two replicate measurements were averaged for each individual at each temperature. For each temperature and group, 6 mitochondrial preparations were analyzed. The

polarographic system was calibrated with distilled water saturated with ambient air at the incubation temperature.

Mitochondrial affinity for pyruvate

To measure affinity for pyruvate, mitochondria were exposed to increasing pyruvate concentrations (1.02-63.81 μM at 5°C and 4.09-196.74 μM at 35°C) in the presence of malate (2 mM), cytochrome *c* (10 μM) and ADP (2 mM). The pyruvate-stimulated respiration above basal oxygen consumption was plotted to determine maximal oxygen consumption (V_{max}) and the apparent Michaelis constant for pyruvate (k_{mapp}); k_{mapp} represents the apparent mitochondrial affinity for pyruvate. Measurements were done at 5 and 35°C. For each temperature and group, 6 mitochondrial preparations were analyzed.

CS activity and protein concentration

CS activity was measured using an UV/Vis spectrophotometer (Ultrospec 2100 Pro, Biochrom, Cambridge, USA) equipped with a circulating refrigerated water bath. Activity was monitored at 412 nm to detect the transfer of sulphhydryl groups to 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB; extinction coefficient: 13.6 $\text{ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) in the presence of 0.3 mM acetyl-CoA and 0.5 mM oxalacetic acid in a medium with 20 mM HEPES and 10 mM potassium phosphate (pH 8.1). All assays were run at least in duplicate and repeated until differences between replicates were less than 5%. Enzymatic activities were expressed in $\text{U} \cdot \text{mg protein}^{-1}$. Total protein content in mitochondrial preparations was determined using the bicinchoninic acid method (Smith et al., 1985).

Fatty acid composition of mitochondrial membranes

Mitochondria (10 μ l) were hydrolyzed by mixing with 5 M hydrochloric acid (40 μ l) and acetonitrile (360 μ l) in a Teflon-capped tube (Johnson, 2000). The mixture was heated for 1 hour at 100 °C, cooled and the fatty acids extracted with hexane (1 ml). The hexane was evaporated in a stream of nitrogen and the residue was dissolved in chloroform. The fatty acid profiles of the diets and isolated mitochondria were determined by fast capillary gas chromatography according to Mondello et al. (2006). The identification of fatty acids has been determined by comparison of retention time with a standard (Supelco 37 FAME Mix) and confirmed by mass spectroscopy. For each group, 6 mitochondrial preparations were analyzed.

Calculations

Q_{10} values for mitochondrial functions were calculated according to the following formula:

$$Q_{10} = (\text{Rate}^{t_2} / \text{Rate}^{t_1}) \exp(10 / (t_2 - t_1)).$$

The double bond index (DBI) was calculated according to the following formula (Pamplona et al., 2000):

$\text{DBI} = \sum \% \text{ of unsaturated fatty acids} * \text{number of double bonds of each unsaturated fatty acid.}$

Chemicals

All chemicals were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO., USA).

Statistical analysis

Statistica software[®] was used for statistical analyses and Enzyme kinetics (Sigma plot) for the calculation of k_{mapp} and V_{max} . Results were expressed as mean \pm standard deviation. Brown-Forsythe tests were used to test the homogeneity of variances between the experimental diet groups. Data that showed heteroscedasticity were log transformed to meet the assumption and to proceed with the following tests. Differences between the fatty acid composition of heart mitochondrial membranes, k_{mapp} , and V_{max} of pyruvate were tested with one-factor ANOVAs (factor=diet group) followed by a posteriori Newman-Keuls tests. Differences between diet groups for mitochondrial functions (States 2, 3 and 3c of Complex I, Complex II, Complex IV, RCRs, CS activity, Q_{10}) were measured with two-factor (diet group and temperature or temperature range) ANOVAs. When significant differences were detected, the means were further compared by a posteriori Tukey multiple test. Differences between respiratory states and complexes at each measurement temperature (5, 20 and 35°C) and differences between Q_{10} for the different states and functions were assessed using paired t-tests. Significance was set at the 5% level. Results are presented without transformations.

Table 1.1: Composition of the experimental diets (g/100 g).

Ingredient	Coconut oil	Olive oil	Fish oil	Fish oil & Probucol
Protein	20.68	20.68	20.68	20.44
Carbohydrate (dextrin, sucrose)	63.20	63.20	63.20	62.48
Total fat	8.00	8.00	8.00	8.00
Safflower oil	0.65	-	0.90	0.90
Coconut oil	7.35	-	-	-
Olive oil	-	8.00	-	-
Fish oil	-	-	7.10	7.10
Minerals & vitamins	3.92	3.92	3.92	3.92
Probucol	0.00	0.00	0.00	1.00
Fibers (cellulose & insulin)	4.19	4.19	4.19	4.16
T-butylhydroxyquinone	0.0164	0.0164	0.0164	0.0164

Proteins included casein and DL-methionine. Values are mean of 2 measurements.

Table 1.2: Fatty acid composition of the experimental diets (g/100 g lipids).

	Coconut oil	Olive oil	Fish oil	Fish oil & Probucol
C6:0	0.63	-	-	-
C8:0	7.07	-	-	-
C10:0	5.29	-	-	-
C12:0	41.72	-	-	-
C14:0	15.69	-	0.41	-
C16:0	9.24	11.65	2.70	2.41
C16:1	-	0.79	-	-
C18:0	2.85	3.58	2.84	2.87
C18:1n9	12.37	75.28	13.84	13.63
C18:2n6 (linoleic)*	5.14	7.74	4.11	3.95
C18:3n3 (linolenic)*	-	0.96	0.59	0.58
C20:0	-	-	0.53	0.57
C20:1n9	-	-	2.23	2.28
C20:4n6 (arachidonic)*	-	-	2.48	2.48
C20:5n3 (EPA)	-	-	37.85	37.86
C22:0	-	-	-	1.39
C22:1n9	-	-	1.85	1.92
C23:0	-	-	1.85	1.83
C24:0	-	-	4.26	4.18
C22:6n3 (DHA)	-	-	24.46	24.05
Σ SFA	82.49	15.23	12.59	13.25
Σ MUFA	12.37	76.07	17.92	17.83
Σ PUFA	5.14	8.70	69.49	68.92
n-3	0.00	0.96	62.90	62.49
n-6	0.00	7.74	6.59	6.43
n-3/n-6	0.00	0.12	9.54	9.71
DBI	22.65	94.43	373.84	370.99
Total essential fatty acids*	5.14	8.70	7.18	7.01

*Essential fatty acids: linoleic, linolenic and arachidonic acids (adult daily ration: 10 g linoleic acid/day). Values are mean of 2 measurements. DBI = Σ % of unsaturated fatty acids * number of double bonds of each unsaturated fatty acid.

RESULTS

Rat weight and fatty acid composition of heart mitochondria

Initial and final body weight did not vary among the study groups. Mean initial and final body mass for the pooled diet groups were 67.1 ± 8.6 g and 496.2 ± 27.0 g, respectively (data not shown). Table 1.3 shows the pattern of fatty acid composition in heart mitochondrial membranes following 16 weeks of feeding with the different experimental diets. The fatty acid profile was significantly modified by the diet. The SFA content in the mitochondrial membranes from heart of animals fed a diet rich in SFAs (coconut oil) or rich in MUFAs (olive oil) decreased compared to the groups fed a PUFA-rich diet (fish oil and fish oil+probucol groups). MUFA content in mitochondrial membranes was higher in the coconut and olive oil groups compared to the fish oil groups. Total mitochondrial membrane PUFAs showed no differences between experimental diet groups, whereas the unsaturation index was higher in the fish oil groups. Content of individual PUFAs in mitochondria varied significantly between groups. Mitochondria from the coconut and olive oil groups showed higher C18:2n-6 and lower long-chain n-3 fatty acid (C20:5n-3, C22:5n-3 and C22:6n-3) contents compared to both fish oil groups. The total highly polyunsaturated n-3 fatty acids as well as the ratio n-3 to n-6 were significantly higher in fish oil groups compared to coconut and olive oil groups. Mitochondria from the coconut and olive oil groups differed only by the content in the C22:5 PUFA and C16:1 MUFA which showed a higher content in the coconut oil group.

Mitochondrial functions at different temperatures

Complexes I, II and IV-supported respiration rates increased with temperature and reached a maximum at 35°C. The respiration rate of Complex I-supported respiration at 35 °C (3.95 ± 0.28 nmol·s⁻¹·mg protein⁻¹) is similar with other value in rat heart isolated mitochondria at or near physiological temperature [2.65 nmol·s⁻¹·mg protein⁻¹ measured by Cairns et al. (1998) and around 6 nmol·s⁻¹·mg protein⁻¹

measured by Gnaiger et al., (2000a)]. There were no differences between dietary groups in mitochondrial respiration of Complexes I (State 2, State 3 or State 3c), II or IV at the three measurement temperatures (Fig. 1.1A, B, C), or in the activities of CS at 35°C (1.43 ± 0.12 U·mg protein⁻¹ for coconut oil, 1.59 ± 0.40 U·mg protein⁻¹ for olive oil, 1.62 ± 0.16 U·mg protein⁻¹ for fish oil, 1.59 ± 0.11 U·mg protein⁻¹ for fish oil+probucol; results not shown). Quality of mitochondrial preparations was indicated by the cytochrome *c* test and the RCR values. The integrity of the outer mitochondrial membrane was shown by the very small effect of addition of cytochrome *c* (effect significant only at 20°C; $P < 0.05$). The stimulation of respiration by the addition of ADP was measured by the RCR_{3/2}, and indicated good coupling of mitochondria in all groups (RCR_{3/2} values were not significantly different among groups; 5.0 ± 2.6 at 35 °C; results not shown). At low temperature, the Complex I-induced respiration rate was higher compared to the Complex II-induced respiration whereas the reverse pattern was observed at 35°C. The Complex IV-induced respiration rate was much higher compared to those of Complex I and II at all measurement temperatures (Figure 1.1).

The thermal sensitivity (expressed as Q_{10}) of mitochondrial complexes and CS activity were not different among groups (Fig. 1.2). Succinate-supported (Complex II) respiration had a significantly higher thermal sensitivity compared to Complex I, Complex IV and CS ($P < 0.05$). The thermal sensitivity of Complex I- and II-supported respiration was about two times higher between 5 and 20°C compared to the temperature range of 20 to 35°C. In contrast, the thermal sensitivity of Complex IV-supported respiration and CS activity increased slightly at higher temperatures.

Pyruvate-stimulated mitochondrial respiration

In the presence of malate+ADP, the basal oxygen consumption rate was accelerated by the stepwise addition of pyruvate at 5°C and 35°C, and the curves

were used to calculate the apparent V_{max} and k_{mapp} for pyruvate. As observed for the V_{max} measured with saturating substrate concentrations (Fig. 1.1), V_{max} extrapolated from Michaelis-Menten curves (Figure 1.3A) showed no difference among diet groups either at 5°C or 35°C. Mitochondrial apparent affinity for pyruvate showed significant differences only at 5°C with a higher k_{mapp} (lower affinity) in the coconut oil group compared to other three groups (Fig. 1.3B).

Table 1.3: Effects of the experimental diets on fatty acid composition of heart mitochondrial membranes.

	Coconut oil SFAs	Olive oil MUFAs	Fish oil PUFAs	Fish oil & Probucol (PUFAs)	P
C16:0	9.42 ± 1.94	9.33 ± 1.14	9.94 ± 1.42	11.20 ± 1.17	NS
C16:1	3.00 ± 0.98 ^a	nd ^b	0.44 ± 0.87 ^b	1.17 ± 1.37 ^b	0.004
C18:0	20.70 ± 1.35 ^b	22.44 ± 1.06 ^b	27.11 ± 2.51 ^a	26.65 ± 2.13 ^a	0.001
C18:1n9	11.91 ± 3.34 ^{ab}	13.05 ± 1.08 ^a	7.70 ± 1.17 ^c	9.15 ± 1.06 ^{bc}	0.007
C18:1	7.03 ± 0.59	5.96 ± 0.46	6.18 ± 0.80	6.48 ± 0.55	NS
C18:2n6	24.83 ± 1.31 ^a	27.14 ± 1.49 ^a	13.91 ± 1.87 ^c	17.19 ± 2.84 ^b	<0.001
C20:4n6	19.62 ± 4.43	18.72 ± 2.88	17.96 ± 2.15	15.64 ± 1.87	NS
C20:5n3 (EPA)	nd ^c	nd ^c	3.84 ± 0.63 ^a	3.04 ± 0.27 ^b	<0.001
C22:5	2.12 ± 1.56 ^a	0.33 ± 0.67 ^b	nd ^b	nd ^b	0.011
C22:5n3	nd ^b	0.34 ± 0.68 ^b	2.51 ± 0.58 ^a	2.57 ± 0.46 ^a	<0.001
C22:6n3 (DHA)	1.40 ± 0.31 ^c	2.69 ± 0.41 ^c	10.43 ± 3.08 ^a	6.93 ± 2.25 ^b	<0.001
ΣSFA	30.01 ± 2.83 ^b	31.77 ± 1.79 ^b	37.05 ± 3.71 ^a	37.84 ± 1.53 ^a	0.003
ΣMUFA	21.71 ± 3.74 ^a	19.01 ± 1.49 ^{ab}	14.31 ± 0.63 ^c	16.80 ± 2.87 ^{bc}	0.006
ΣPUFA	45.62 ± 4.97	48.89 ± 3.15	48.64 ± 3.68	45.36 ± 2.34	NS
Σn-3	1.37 ± 0.31 ^c	3.03 ± 0.87 ^c	16.78 ± 2.93 ^a	12.53 ± 1.98 ^b	<0.001
Σn-6	44.24 ± 4.72 ^a	45.82 ± 2.32 ^a	31.85 ± 1.30 ^b	32.77 ± 2.26 ^b	<0.001
n-3/n-6	0.031 ± 0.005 ^c	0.064 ± 0.015 ^c	0.520 ± 0.087 ^a	0.379 ± 0.073 ^b	<0.001
DBI	167 ± 23 ^b	167 ± 13 ^b	207 ± 23 ^a	183 ± 12 ^{ab}	<0.001

Units are percentage of total fatty acids. Data are means ± s.d., n=4 rats per diet group.

SFA: saturated fatty acids

MUFA: monounsaturated fatty acids

PUFA: polyunsaturated fatty acids

DBI: Double bond index = \sum % of unsaturated fatty acids * number of double bonds of each unsaturated fatty acid

P: Probability for ANOVA with significant differences at $p < 0.05$; the specific differences between groups are indicated by letter, values in a row with one similar letter do not differ significantly (Newman-Keuls *a posteriori* test, $p > 0.05$)

Nd: not detected

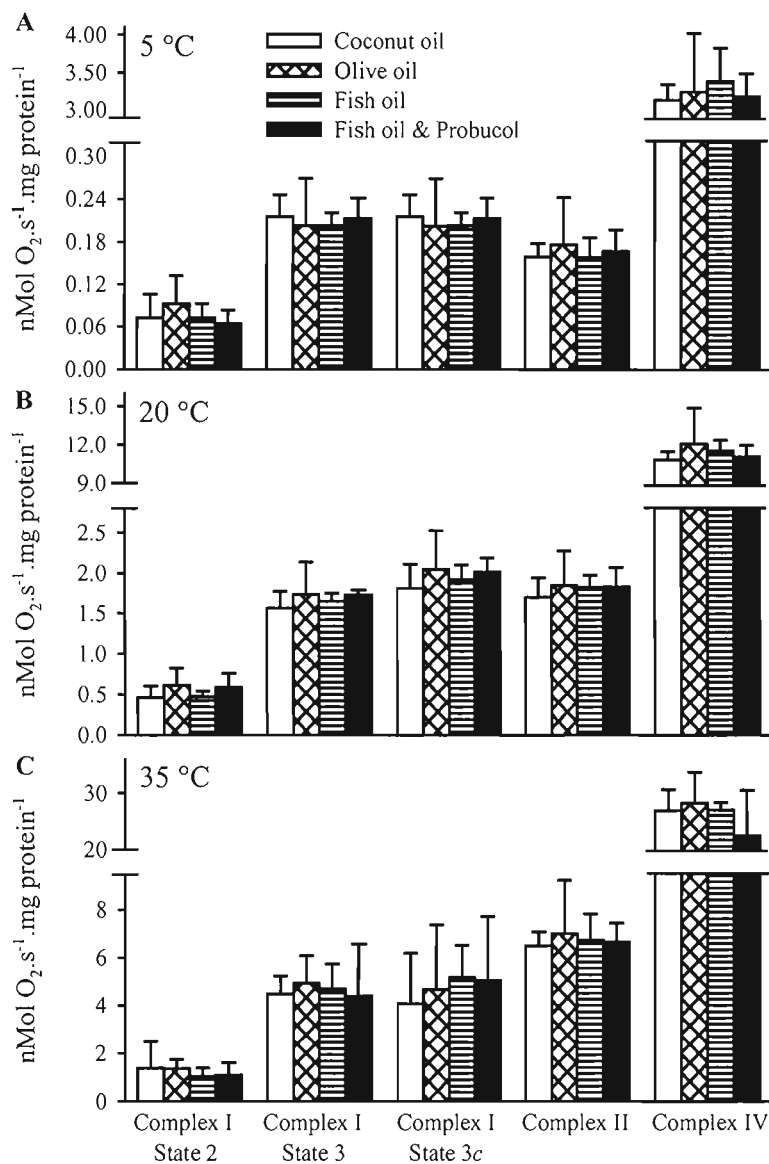


Figure 1.1: Oxygen consumption by heart mitochondria measured at different states for rats fed with four experimental diets.

The measurements were done at 5°C (A), 20°C (B) and 35°C (C). The stepwise titration protocol started with the measurement of Complex I with malate+pyruvate (State 2) followed by addition of ADP (State 3) and cytochrome *c* (State 3c). Complex II was measured by blocking Complex I respiration with rotenone and the addition of succinate. The protocol was then continued by blocking Complex II with malonic acid and III by antimycin a and by measuring Complex IV respiration with the addition of TMPD and ascorbate. Bars are means \pm s.d. of 5 to 6 mitochondrial preparations made of 5 to 6 rat hearts.

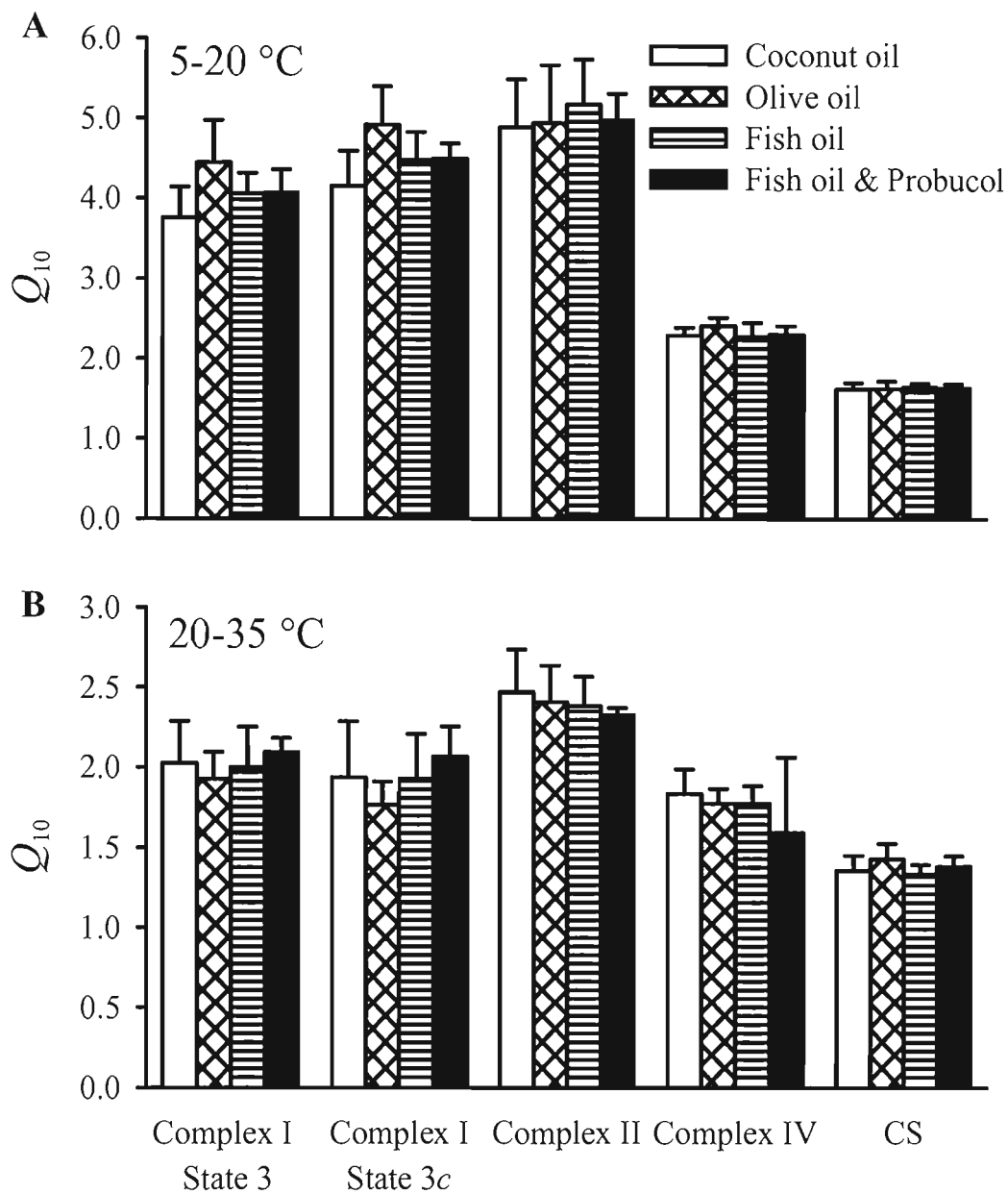


Figure 1.2: Thermal sensitivity expressed as Q_{10} values for the mitochondrial functions in the heart ventricles of rat.

A) Q_{10} s between 5 and 20°C and (B) Q_{10} s between 20 and 35°C. Bars are means \pm s.d. of 5 to 6 mitochondrial preparations made of 5 to 6 rat hearts.

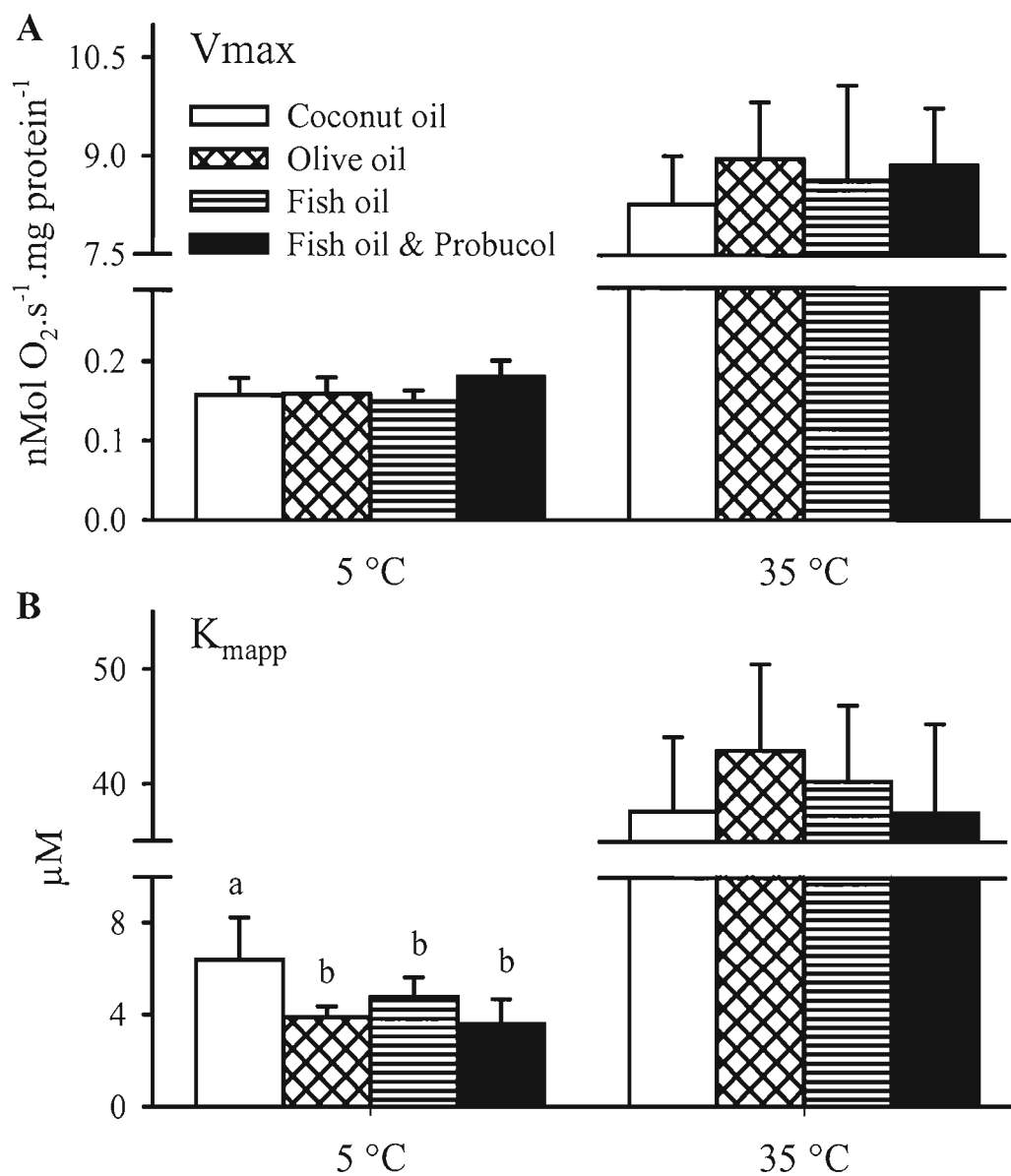


Figure 1.3: Effect of experimental diets on the maximal rate of respiration (V_{max}) and Michaelis-Menten constant for pyruvate (K_{mapp}) for mitochondria from rat heart ventricles at 5 and 35°C.

Bars are means ± s.d. of 5 to 6 mitochondrial preparations made of 5 to 6 rat hearts. Columns with different letters are significantly different at p<0.05.

DISCUSSION

Following the modification of mitochondrial membrane composition by dietary intervention, we observed that a global change in fatty acid composition was not a major modulator of oxygen consumption in rat heart close to physiological temperature (35 °C). Different results have been reported about the impact of changes in membrane fatty acid composition on ETS enzyme function in mammals. Several studies have not taken into consideration the importance to supply of adequate concentrations of essential fatty acids (EFA; linoleic, linolenic and arachidonic acids) in the diet or the duration of the feeding period. An EFA-deficient diet has been associated with a decrease in mitochondrial respiration and activity or turnover of respiratory chain enzymes in rat heart and liver (Haeffner & Privett, 1975; Williams et al., 1975; Yamaoka et al., 1988). The decrease in oxidative phosphorylation efficiency associated with a PUFA-deficient diet (Piquet et al., 2004) or a beef tallow fat diet (Abuirmeileh & Elson, 1980b; Abuirmeileh & Elson, 1980a) in rat liver mitochondria may therefore be related to the lack (0% in PUFA-deficient diet) or low content (3.4% of total fat in beef tallow diet) of EFAs in these studies. The duration of the experimentation can also affect the outcome of the data and their interpretation. A short period (e.g. one month) may not for example allow the incorporation of fatty acids into mitochondrial membrane phospholipids or the adjustments of cell function to counteract the new membrane composition. This may be particularly true for heart tissue, which is more resistant to change compared to liver or skeletal muscle (Mataix et al., 1998).

In our study, we used a long period of feeding (16 weeks) and diets respecting the EFA requirement. Our results are in accordance with other studies that showed no impact of different composition of n-3 or n-6 in the diet on rat heart mitochondrial respiration when Complex I substrates (malate, pyruvate, glutamate) were supplied (Royce & Holmes, 1984; Demaison et al., 1994; Pehowich, 1995; Pepe et al., 1999; Ovide-Bordeaux & Grynberg, 2004). In contrast, changes of similar magnitudes in

the fatty acid composition of rat heart mitochondria have been associated with a slight decrease in State 3 of Complex II-supported respiration in the n-3 fed group, even though this diet fulfilled the EFA requirements (Pepe et al., 1999). This decrease in respiration is difficult to interpret since the consumption of a diet rich in long-chain n-3 fatty acids has been shown to increase heart efficiency in terms of work performed per unit O₂ consumed (Pepe & McLennan, 1992) and to exert a protective effect against arrhythmia (Pepe & McLennan, 1996; Padma & Devi, 2002; McLennan & Abeywardena, 2005), or ischemia (Hock et al., 1987; McMillin et al., 1992; McLennan et al., 1993; Yang et al., 1993a; Yang et al., 1993b; Demaison et al., 1994; Pepe & McLennan, 1996; Padma & Devi, 2002).

If the impact of membrane composition on protein function is not clear at the physiological temperature, it could have been revealed by comparison of thermal sensitivities and functional properties of mitochondria at a lower temperature. Cardiac mitochondria from rat are expected to be optimal around a relatively constant physiological temperature of 37°C. If membrane composition and fluidity have *per se* mechanistic impact on the thermal sensitivity of ETS complexes, this should be revealed by rat heart mitochondria, were a high impact of lowering temperature is suspected. In the mammalian system, we did not observe any significant changes in thermal sensitivity of mitochondrial complexes or in their maximal catalytic capacity at low temperature following a major increase in long-chain n-3 PUFAs and DBI in the mitochondrial membrane. The changes in fatty acid composition of the heart mitochondrial membrane in this study, however, were similar to, or more pronounced than, the changes observed in red muscle mitochondria from thermally acclimated trout rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Kraffe et al., 2007). Cold acclimated rainbow trout presented similar SFA, PUFA and DBI, a decrease of 19% of MUFA content and an increase of 34% of the n-3/n-6 ratio in their total phospholipids compared to warm acclimated trout. Those changes in fatty acids composition following cold acclimation occurred in parallel with an increase of function of

mitochondrial proteins such as Complex I-supported respiration and cytochrome *c* oxidase activity (Kraffe et al., 2007). In our study, fish oil diet was associated with a decrease of 25% of MUFA, an increase of around 900% of the n-3/n-6 ratio and an increase of 20% of the DBI, but we observed no change in mitochondrial respiration.

A few reasons can explain the lack of changes in mitochondrial function in our study compared to trout acclimated to cold temperature. The first one is that the changes in membrane composition we observed were not present specifically within the microenvironment of the ETS proteins. A second reason suggests that the regulation of mitochondrial metabolism in rat heart may be driven by different steps when compared to ectotherm species, leading to different impacts of membrane composition according to the position of the controlling step. For example, if the ETS Complexes I to IV in rat heart are in excess at low temperature compared to previous steps such as pyruvate dehydrogenase (PDH; Lemieux H, Tardif J-C, Dutil J-D and Blier PU, unpublished data, Université du Québec, Rimouski, Canada) or phosphorylation system (Quentin et al., 1994), their regulation by membrane fatty acid composition should not affect the overall oxygen consumption or ATP production rates by mitochondria. By showing the high thermal sensitivity of Complexes I and II respiration, our results support determination thermal sensitivity of ETS at low temperature by more than one step in rat heart. When provided with pyruvate and malate, mitochondrial respiration does not involve the activity of succinate dehydrogenase (Complex II) and the respiration with succinate and rotenone does not involve the activation of Complex I, but both reactions are strongly reduced at 5°C. In contrast, the respiration with ascorbate and TMPD (Complex IV), which also involve a membrane embedded proteins, remains more active at 5 °C. Since the modulation of ETS capacity at low temperature varies between species and depend on function related or not to membranes, it seems that the complexity of changes needed to preserve ETS functions during low temperature acclimation involve other modifications than membrane unsaturation. A third possibility to

consider for explaining the lack of change in mitochondrial function in our study is that the increase in unsaturation of mitochondrial membrane following cold acclimation in ectotherms is not essential for preservation of ETS functions. Low temperature acclimation allows an unselective modification of cellular and mitochondrial membranes. This is due to the suppression at low temperature of *de novo* synthesis of fatty acids by cytosolic fatty acid synthase complex, whereas the production of unsaturated fatty acids by desaturase is still active (reviewed by Hazel & Williams, 1990). It does not mean that the increase in unsaturation of membrane presents an advantage for all protein functions related to membranes. Studies in mammals cells have shown that enrichment of cells with unsaturated fatty acids may improve the chilling resistance (e.g. oocytes from ruminants; Zeron et al., 2002) but may also increased susceptibility to cold-induced oxidative stress (e.g. endothelial cells; Zieger et al., 2006). In our study, however, even the heart mitochondria enriched in unsaturated fatty acids and protected against oxidative stress with probucol do not showed improved activity at low temperature.

To the extent that different membrane functions should be affected by temperature, transport functions could be expected to be highly impaired by temperature changes. Several transporters (Ledesma & Rial, 2004), including the pyruvate carrier (Hildyard & Halestrap, 2003), allow the passage of metabolites across the mitochondrial inner membrane. The mode of action of these carriers is similar to the catalytic cycle of an enzyme with a substrate-binding site whose access from either side of the membrane is controlled by gates. There is mounting evidence that an altered carrier function could be the underlying mechanism for many pathophysiological situations (Ledesma & Rial, 2004). The affinity of mitochondria for pyruvate may reflect the functional status of the transporter. The lack of change in the affinity of mitochondria for pyruvate at 35°C between the dietary groups in our study agree with the results of Ovide-Bordeaux & Grynberg (2004), who observed no changes in k_{mapp} of heart fibers for ADP in rats fed with diets differing in fatty acid

compositions. At the normal body temperature, k_{mapp} values of enzymes seems to be highly conserved, even in differently adapted species (Hochachka & Somero, 2002). This conservation is also revealed in mitochondria by the similarities of k_{mapp} for pyruvate in mitochondria from rat heart at 35°C (around 40 μM) and from rainbow trout red muscle between 8 and 22°C (45 μM ; Blier & Guderley, 1993).

At low temperatures, the apparent affinity of rat heart mitochondria for pyruvate increases (k_{mapp} of 4-6 μM at 5°C) and we observed differences between dietary groups, with a lower affinity in the coconut oil group compared to the three other groups. It is difficult to relate differences between dietary groups to the membrane fatty acid composition, since the coconut and olive oil groups showed almost no difference in mitochondrial fatty acid content. In cold acclimated rainbow trout, the increase in n-3 fatty acids and MUFAs is associated with a decrease in mitochondrial affinity for ADP at low temperatures (5°C) and an increase at high temperatures (15°C; Kraffe et al., 2007). The increase in k_{mapp} for pyruvate could be related to the modulation of the PDH activity since this enzyme partly dictates the concentration of pyruvate inside the mitochondria and therefore its rate of transportation. A modification of the diet's oil content has been previously shown to alter the PDH activity (Pepe et al., 1999). Furthermore, the k_{mapp} of mitochondria for pyruvate observed in our study is similar to that of PDH for pyruvate in mammals (Cooper et al., 1974; Roche & Cate, 1977; Pettit & Reed, 1982). This suggests that PDH at least partly determines the mitochondrial affinity for pyruvate (Blier & Guderley, 1993). If lipids from the diet and membrane composition influence the mitochondrial production of energy at low temperatures, the mechanisms responsible of this metabolic modulation may therefore be much more complex than the sole adjustment of maximal catalytic capacity of the ETS system through fine tuning of membrane fluidity. This might explain why V_{max} measurements did not reflect the differences shown by the k_{mapp} . The lack of correlation between the differences in k_{mapp} and the global fatty acid composition also suggests that more specific changes

related to properties other than fatty acid composition alone (such as particular phospholipid composition; Senault et al., 1990) should influence mitochondrial functions. Thermal acclimation of rainbow trout also gave rise to differences in k_{mapp} for ADP not necessarily related to membrane phospholipids or fatty acids composition, as short term exposure to high temperature also influenced the affinity in muscle mitochondria (Kraffe et al., 2007).

In summary, our results do not support a major impact of the fatty acid composition of the mitochondrial membrane on the function of mitochondrial ETS complexes or on their temperature sensitivity in rat heart. Our data, however, did not exclude the possibility that more specific changes in particular domains of the membranes are needed to exert an effect on protein functions, or that key proteins other than ETS Complexes I to IV could be influenced by the membrane fatty acid composition.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Dr Blier. Dr Tardif holds the Pfizer and Canadian Institutes of Health Research chair in atherosclerosis. H.Lemieux received scholarship from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and from «Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies». We thank Mariig Hamon, Véronique Desrosiers and Étienne Hébert-Chatelain for animal care.

CHAPITRE II

DÉCORTIQUER LES DIFFÉRENTES ÉTAPES

THE IMPORTANCE OF PYRUVATE DEHYDROGENASE IN THE DETERMINATION OF THERMAL SENSITIVITY OF HEART MITOCHONDRIA

Lemieux¹, H., J.-C. Tardif², J.-D. Dutil³ & P.U. Blier¹

¹Laboratoire de Biologie Intégrative, Université du Québec, 300, allée des Ursulines,
Rimouski, Québec, Canada, G5L 3A1

²Institut de Cardiologie de Montreal, 5000 rue Bélanger, Montreal, Quebec, Canada,
H1T 1C8

³Institut Maurice Lamontagne, Ministère des Pêches et des Océans, 850 route de la
mer, Mont-Joli, Québec, Canada, G5H 3Z4

RESUME EN FRANÇAIS

La respiration mitochondriale implique plusieurs réactions reliées entre elles qui sont influencées par la température. Des études précédentes se sont questionnées sur les mécanismes par lesquels la température affecte la respiration mitochondriale mais aucune n'a quantifiée les impacts de la température sur les réactions individuelles impliquées dans ce processus. Nous avons mesuré la sensibilité thermique de la respiration mitochondriale et des différentes étapes individuelles impliquées dans le processus dans le cœur d'un organisme endotherme (le rat) et d'un organisme ectotherme adapté à un climat tempéré froid (le loup Atlantique, *Anarhichas lupus*). La respiration mitochondriale supportée par le malate et le pyruvate et l'activité maximale de la pyruvate déshydrogénase (PDH), de la citrate synthase (CS), des Complexes I à IV du système de transport des électrons et de l'ATPase ont été mesurées à différentes températures chez le loup Atlantique et chez le rat. La respiration mitochondriale dans les mitochondrie de cœur de rat montre une sensibilité thermique inhabituellement élevée à basse température (exemple : Q_{10} près de 5 entre 5 et 15 °C) et qui est parfaitement corrélée avec la sensibilité thermique de l'activité de la PDH entre 5 et 35 °C. Le stade 3 de la respiration (5 et 25 °C) et l'activité de la PDH (5 à 35 °C) sont clairement plus faible chez le rat comparé au loup Atlantique. Au contraire, les activités des Complexes I à IV du système de transport des électrons, de l'ATPase et de la CS montrent une sensibilité thermique moins importante et des activités similaires chez le rat et le loup Atlantique. Nos résultats font ressortir le parallèle entre la diminution de la respiration mitochondriale et la diminution de l'activité de la PDH dans les mitochondries de cœur de rat exposées à des températures sous la température physiologique.

Mots clés : Basse température, respiration mitochondriale, système de transport des électrons, pyruvate déshydrogénase, complexes mitochondriaux

ABSTRACT

Mitochondrial respiration involves several interacting reactions influenced by temperature. Earlier studies have addressed the mechanisms by which temperature has an effect on mitochondrial respiration but none has quantified the impact of temperature on individual steps of this process. We measured the thermal sensitivity of mitochondrial respiration, as well as that of individual steps involved in this process in the heart of both an endothermic species (rat) and a cold temperate ectothermic species (Atlantic wolffish, *Anarhichas lupus*). In rat heart, mitochondrial respiration in the presence of pyruvate, malate, and ADP (State 3), showed unusually high thermal sensitivity (e.g. Q_{10} close to 5 between 5 and 15 °C) which correlate perfectly with the thermal sensitivity of pyruvate dehydrogenase (PDH) activity between 5 and 35 °C. State 3 respiration (5 and 25 °C) and PDH activity (5 to 35 °C) were clearly lower in rat compare to wolffish. In contrast, Complexes I to IV of the electron transport system, ATPase, and CS, showed lower thermal sensitivity and similar activity in rat compared to wolffish. Our results highlight a parallel between the decrease in mitochondrial respiration and the decrease in PDH activity below the physiological temperature in rat, and suggest an important role of PDH activity in the determination of thermal sensitivity of mitochondrial respiration in rat heart.

Keywords: Low temperature, mitochondrial respiration, electron transport system, pyruvate dehydrogenase, mitochondrial complexes

INTRODUCTION

Through its marked influence on the rate of chemical reactions, temperature plays a key role in setting constraints on all physiological functions, including mitochondrial respiration. The thermal constraint may appear at low temperature due to the low kinetic energy available for the enzymes to reach activation status, or at high temperature, due to thermal denaturation of the proteins. The cardiac muscle is highly reliant on aerobic metabolism generated in the mitochondria, and thus the effect of temperature on mitochondrial respiratory capacity is of particular importance in this tissue.

In ectotherms, the environment largely dictates body temperature. Various forms of adaptation allowed fish to increase their cardiac performance in response to low-temperature acclimation. These adaptations included an increase in ventricular mass, cell hypertrophy, and a decrease in thermal sensitivity of heart rate, cardiac output, and maximum power output, which permitted the maintenance of these functions at a high rate at low temperature (reviewed by Gamperl & Farrell, 2004).

In contrast, since mammals body temperature is usually keep constant, we can suspect a higher impact of thermal change on rat cardiac mitochondria. This offers a valuable system to point out the steps involved in mitochondrial metabolism where temperature variation represents a major constraint. Understanding the effect of temperature on mammalian heart metabolism may also be of great relevance for particular clinical situations. Induced heart hypothermia is the standard method for myocardial protection during human heart surgery (25-35 °C; review by Ning & Chen, 2006) and organ transplant preservation (1-4 °C; Sealy, 1989) and has also shown promising results to limit ischemic damage during myocardial infarction (Hale & Kloner, 1999; Dae et al., 2002; Kloner & Rezkalla, 2004). The drop in temperature required to obtain benefits during surgery or myocardial infarction (30 to 34 °C) is modest while deep hypothermia (0 to 4 °C) is used to preserve the heart for

transplantation.

Although cardioprotection by hypothermia offers several possibilities in medicine, detrimental effects on mitochondria associated with cold storage-reperfusion injury (e.g., instability of respiratory complexes and liberation of cytochrome *c*) are becoming recognized as limiting factors in preservation of organs from non-hibernating mammals (Di Lisa et al., 1998; Ghafourifar et al., 1999; Gnaiger et al., 2000a). More recently, oxidative injury has been identified as the predominant event causing cell damage during deep hypothermia in bovine aortic endothelial cells (Zieger et al., 2006). The cold induced oxidative stress may be a result of an increase in production of reactive oxygen species, a temperature-dependant decrease in the activity of antioxidant enzymes or both. Heat stress may also cause severe physiological dysfunction to the cardiomyocyte mitochondria (Chien, 2000): decreased ATP content in the myocardium, reduced respiratory control ratio and oxidative phosphorylation efficiency, Ca^{2+} overload, oxidative stress, altered mitochondrial membrane permeability transition, release of cytochrome *c* in the cytosol, and finally, destruction of the mitochondrial structure (Qian et al., 2004).

Energy production in heart mitochondria involves several interacting pathways. Previous studies in rat liver (Dufour et al., 1996) and tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut (Chamberlin, 2004) mitochondria aimed at identifying the steps of the oxidative phosphorylation process that are responsible for temperature-induced changes in mitochondrial respiration. These analyses revealed that temperature-induced changes in maximal rate of mitochondrial respiration are mostly dictated by the substrate oxidation system in ectotherms. In rats, the control appeared to be shared between the substrate oxidation system and the phosphorylation system at low temperatures (4 °C) while most of the control was exerted by the substrate oxidation system at 25 and 37 °C. These control sites have been described but if we expect to clearly understand the impact of temperature on mitochondrial metabolism, individual

reactions that actually dictate thermal sensitivity remain to be identified.

Our study is aimed at quantifying the thermal sensitivity of key enzymes of the carbohydrate-supported mitochondrial metabolism in the heart and comparing it to the thermal sensitivity of whole mitochondrial respiration. In order to evaluate the involvement of each reaction in temperature-induced changes in the mitochondrial respiration pathway, we measured the thermal sensitivity of mitochondrial respiration (with pyruvate and malate), and that of individual reactions involved in the electron transport system (ETS, Complexes I to IV). We also determined the thermal sensitivity of oxidative phosphorylation (ATPase), as well as that of an enzyme of the tricarboxylic acid (TCA) cycle (citrate synthase, CS) and an important regulating enzyme of carbohydrate metabolism (PDH).

We used mitochondria isolated from cardiac ventricles from both an endotherm species (rat) and a cold temperate ectotherm species (Atlantic wolffish, *Anarhichas lupus*). Studying changes in mitochondrial functions with temperature variations in a strict stenothermal endotherm (rat) may allow the identification of the most temperature-sensitive steps in the energy production pathways. Since these organisms are presume to be adapted to a narrow range of temperature, we suspect that their mitochondrial functions are adapted to be optimal in this range and therefore highly sensitive to thermal variations. In contrast, Atlantic wolffish are exposed to a very wide range of temperatures (0 to 16 °C; Moksness & Pavlov, 1996) and are likely adapted to low temperature since optimal temperature for growth is around 11 °C (McCarthy et al., 1998). Comparing the thermal sensitivities of different steps involved in mitochondrial respiration in the rat and in the Atlantic wolffish may allow us to identify 1) the key steps limiting mitochondrial metabolism at low temperature and 2) the adjustments needed to ensure efficient cardiac mitochondrial metabolism in cold or warm environments.

METHODS

Animals

Four male Sprague-Dawley rats (Anilab, Que, Canada) were housed under standard conditions with free access to food and water until they reached 475-500 g. Rats were euthanized by inhalation of CO₂ and the heart removed and dissected to obtain both ventricles. Four Atlantic wolffish were reared in the facilities of the Maurice Lamontagne Institute (Department of Fisheries and Oceans, Mont-Joli, Canada) until they reached 800 to 1060 g. They were kept at 4.8 ± 0.8 °C during the 6 weeks and fed ad libitum every two days. Fish were killed by a blow to the head and their ventricle was quickly removed. All procedures were approved by the local ethics committee in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Isolation of heart mitochondria

Cardiac mitochondria were prepared by the method of Gnaiger & Kuznetsov (2002) without trypsin addition. Immediately after weighing, ventricles were rinsed with ice cold isolation medium (300 mM sucrose, 0,2 mM EDTA, 10 mM Hepes and 0.1% fatty acid free BSA, pH 7.2; Gnaiger & Kuznetsov, 2002). Ventricles (about 1 g for both ventricles in rats and about 0.5 g for the one ventricle in Atlantic wolffish) from freshly isolated heart were washed free of blood, and suspended in 10 volumes of ice-cold isolation medium. The tissue was homogenized with a tight-fitting Teflon/glass homogenizer (5 strokes), followed by centrifugation for 10 min at 600 g (4 °C). The supernatant was decanted and centrifuged at 8000 g for 15 min (4 °C). The pellet was washed with 1 ml of isolation medium to remove the fluffy upper layer. The tightly packed dark pellet was resuspended in 10 ml of isolation medium and centrifuged for 10 min at 8000 g (4 °C). The pellet was washed and resuspended in 1.5 ml of isolation medium before centrifugation in a microtube for 10 min at 8000 g (4 °C). The final washed pellet was suspended in mitochondria preservation

medium (500 μ l for rat, and 325 μ l for wolffish) developed by Gnaiger et al. (2000a) with slight modifications (110 mM sucrose, 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl_2 , 80 mM KCl, 60 mM K-lactobionate, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM taurine, 20 mM histidine, 20 mM Hepes, 1% fatty acid free BSA, 20 μ M Vitamin E, 1.0 μ M leupeptine, 3.0 mM glutathione, pH 7.1) to a final mitochondrial protein concentration of 9-12 mg protein \cdot ml⁻¹. The mitochondrial preparations were stored on ice and used for mitochondrial oxygen consumption measurements. A portion of each mitochondrial suspension was diluted in 4 volumes of potassium phosphate buffer (25 mM) with MgCl_2 (5 mM) at pH 7.2 and homogenized for 10 seconds with a Tissue Tearor (Biospec Products Inc., Bartlesville, OK, USA). This portion was separated in aliquots and immediately frozen at -80°C for further enzymatic activity determination.

Mitochondrial oxygen consumption

Mitochondrial oxygen consumption was measured using an oxygraph Oxyg 32 (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK). The respiration chambers were maintained at the incubation temperature with a circulating refrigerating water bath. Measurements were done in a final volume of 500 μ l at 5 $^\circ\text{C}$ and 1000 μ l at every other temperature. The mitochondrial respiration medium contained 200 mM sucrose, 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl_2 , 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM taurine, 20 mM HEPES, 0.2% fatty acid free BSA, pH 7.2 (Gnaiger & Kuznetsov, 2002). We added pyruvate (2.5 mM), malate (5 mM), and ADP (0.3 mM) to measure the active State 3 respiration. The State 4 was obtained after exhaustion of ADP and the State 4a with addition of atractyloside (1 μ M) to block adenine nucleotide translocase (ANT) and ensure no support of mitochondrial respiration from extramitochondrial ADP (contamination with extramitochondrial ATPase). According to data of McCarthy et al. (2005) and to our preliminary tests, this concentration is higher than required to

fully inhibit ANT functional content in mammalian heart that have already reached State 4. Respiratory control ratios (RCRs) were calculated as State 3/State 4 for the standard RCR and State 3/State 4a for the RCRA. Measurements were done successively at 5 °C, 15 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C and 40 °C in rats and at 5 °C, 15 °C, 25 °C, and 35 °C in Atlantic wolffish. For each animal (4 rats and 4 Atlantic wolffish), at each temperature, 2 replicate measurements were averaged. The polarographic system was calibrated with distilled water saturated with air at the incubation temperature. Respiration rates are expressed in nmol O₂ consumed per second per mg mitochondrial protein.

Enzymatic analysis

The aliquots used for enzymatic analysis (one aliquot per temperature per enzyme) were freeze-thawed three times before analysis. Enzyme activities were assayed at the same temperatures as mitochondrial respiration using a UV/VIS spectrophotometer (Ultrospec 2100 Pro, Biochrom, Cambridge, USA) equipped with a thermostated cell holder and a circulating refrigerated water bath, except for cytochrome *c* oxidase (CcOX, Complex IV) that was measured polarographically with the same oxygraph as for mitochondrial oxygen consumption. Each measurement was done in duplicate. When coefficients of variation between replicates were higher than 5%, we performed additional measurements. Enzymatic activities were expressed in U·mg protein⁻¹, where U is one μmol of substrate transformed per minute, except for CcOX that was expressed in O₂ consumed per second per mg mitochondrial protein. Each enzyme activity was measured in the same buffer as mitochondrial respiration to avoid different impact of temperature on buffer pH. The methods were tested to estimate the influence of the buffer on measured activity and for saturation of substrate for every species and assay temperature.

Complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase, EC 1.6.5.3) activity was determined according to the method of Birch-Machin & Turnbull (2001) by following the decrease in absorbance due to the oxidation of NADH at 340 nm (extinction coefficient: $6.81 \text{ ml}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$). The reaction mixture contained 20 mM HEPES, 10 mM potassium phosphate, 5 mM MgCl_2 , 2 mM KCN, $2.5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bovine serum albumin, $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ antimycin a, 0.13 mM NADH, 65 mM ubiquinone₁, pH 7.2 at room temperature. The absorbance was recorded for 2 min before the addition of 3-24 μg of mitochondrial proteins and then the activity was measured for 3 min. The blank was measured with addition of $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of rotenone.

For the measurement of Complex II (succinate: ubiquinone oxidoreductase, EC 1.3.5.1), mitochondria (4-24 μg of protein) were preincubated for 5 minutes in 20 mM Hepes, 10 mM potassium phosphate, 5 mM MgCl_2 , 20 mM succinate, pH 7.2. Antimycin a ($2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), rotenone ($2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), KCN (2 mM) and 2,6-dichlorophenolindophenol (50 μM) were then added. The reaction was initiated with ubiquinone₁ (65 μM , not added in the blank), and the enzyme catalyzed reduction of dichlorophenolindophenol (extinction coefficient: $19.1 \text{ ml}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) was measured for 3 min at 600 nm (Birch-Machin & Turnbull, 2001).

The activity of ubiquinol: cytochrome *c* oxidoreductase (Complex III, EC 1.10.2.2) was determined according to Barrientos (2002) with slight modifications. The assay was performed at 550 nm following the increase in absorbance from the reduction of cytochrome *c* (extinction coefficient: $19.1 \text{ ml}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$). The medium adjusted at pH 7.8 contained 20 mM Hepes, 10 mM potassium phosphate, 2 mM EDTA, 750 mM dodecyl maltoside (Chretien et al., 2004), $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bovine serum albumin, 100 μM decylubiquinol as the donor (Lesnefsky et al., 2001a), 240 μM KCN, 4 μM rotenone, 200 μM ATP and 6-35 μg of homogenate protein. The reaction was initiated by the addition of 40 μM oxidized cytochrome *c*. The activity of Complex III was measured for 1 min with or without 4 μM antimycin a to distinguish

the reduction of cytochrome *c* catalyzed by Complex III from the nonenzymatic reduction of cytochrome *c* by the reduced ubiquinone. Decylubiquinol was prepared by dissolving 4 mg of decylubiquinone in 200 μl of ethanol. The quinone is reduced with a few crystals of sodium borohydride and pipeted up and down until the solution became transparent. The excess of borohydride was eliminated by adding concentrated HCl to a final pH of 2-3 and the final volume of the solution was brought to 250 μl with ethanol.

The reactive medium for Complex IV (CcOX, EC 1.9.3.1) contained 20 mM Hepes, 10 mM potassium phosphate, 1 mM ADP (Wenchich et al., 2003), 250 mM sucrose, 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bovine serum albumin (Barrientos, 2002), 1 mM ascorbic acid (Wiedemann et al., 2000) and 0.45 mM n-dodecyl-B-D-maltoside (Birch-Machin & Turnbull, 2001). Mitochondria (9-12 μg proteins) were added, and the chambers closed. After equilibration of the oxygen consumption rate, 400 μM cytochrome *c* and 0.5 mM N,N,N,N-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) were added and the decrease in oxygen concentration was read for 5 minutes. Chemical background controls due to autoxidation of TMPD, ascorbate and cytochrome *c* were subtracted from the activity (Gnaiger & Kuznetsov, 2002).

Oligomycin-sensitive ATPase (EC 3.6.3.14) activity was measured by a coupled assay using lactate dehydrogenase and pyruvate kinase as the coupling enzymes (Ragan et al., 1987). The medium containing Hepes (20 mM), MgSO_4 (5 mM), sucrose (250 mM), NADH (0.35 mM), phosphoenolpyruvate (2.5 mM), pyruvate kinase (4 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$), lactate dehydrogenase (4 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$), mitochondrial preparation (10-50 μg of proteins), ATP (2.5 mM), and antimycin a (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) was equilibrated for 1 min at the measurement temperature. The decrease in absorbance resulting from NADH reduction (extinction coefficient: 6.22 $\text{ml}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) was measured during 3 min at 340 nm. Oligomycin (3 μM) was then added and the reaction was read for an additional 3 min to distinguish the ATPase activity in the

respiratory chain from the extramitochondrial ATPase activity.

Pyruvate dehydrogenase (PDH, EC 1.2.1.51) activity was measured according to Thibeault et al. (1997). NADH production was followed by coupling it to the reduction of p-iodonitrotetrazolium violet (INT; extinction coefficient: $15.4 \text{ ml}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) via an intermediate electron carrier (lipoamide dehydrogenase). The reaction medium (pH 7.8) contained 20 mM Hepes, 1 mM MgCl_2 , 0.5 mM EDTA, 0.2% triton X-100, 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bovine serum albumin, 2.5 mM NAD, 0.1 mM coenzyme A, 0.1 mM oxalic acid, 0.6 mM INT, 6 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ lipoamide dehydrogenase, 0.2 mM thiamine pyrophosphate, and 4-32 μg of protein from the mitochondrial preparation. The reaction was started with the addition of 5 mM pyruvate (omitted from the control) and the change in absorbance was read for 5 min at 500 nm.

Citrate synthase (CS, EC 4.1.3.7) activity was measured at 412 nm following the reduction of 0.1 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (extinction coefficient: $13.6 \text{ ml}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) in the presence of 0.3 mM acetyl-CoA and 0.5 mM oxalacetic acid in a medium with 20 mM Hepes and 10 mM potassium phosphate (pH 8.1).

Q_{10} values for mitochondrial functions were calculated according to the following formula :

$$Q_{10} = (\text{Rate}^{t2} / \text{Rate}^{t1}) \exp 10 / (t2 - t1).$$

Protein concentrations

Total protein content in mitochondrial preparations was determined by the bicinchoninic acid method (Smith et al., 1985).

Chemicals

All chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Statistical analysis

Statistica software© was used for all statistical analyses. Results were expressed as mean \pm standard deviation. Brown-Forsythe's tests were used to test the homogeneity of variances for mitochondrial functions between species, and among temperatures, temperature ranges (for Q_{10}) and methods of measurement (with or without atractyloside for State 4 and RCR). Data that showed heteroscedasticity were log transformed to meet the assumption and to proceed to the following tests. Differences of mitochondrial functions and ratio of mitochondrial functions between species at every temperature of measurement (5, 15, 25 and 35 °C) were assessed with a t test. To analyze differences between temperatures of measurement for State 4 and RCR within species, we used a one factor (temperature) ANOVA test followed by a posteriori Tukey multiple comparisons. Differences in Q_{10} among the different mitochondrial functions at the same temperature range and for the same species were done with ANOVAs followed by a posteriori Tukey tests except for higher temperature ranges (35-40 °C for rat and 25-35 °C for wolffish) which were assessed with a non parametric analysis (Kruskal -Wallis tests followed by a posteriori Mann-Whitney tests) due to non-heteroscedasticity of data. Differences in Q_{10} between temperature ranges for the same species and mitochondrial functions were done with ANOVAs followed by a posteriori Tukey tests except for the high temperature ranges (35-40 °C for rat and 25-35 °C for wolffish) which were assessed with a non parametric analysis (Kruskal-Wallis tests followed by a posteriori Mann-Whitney tests). A P value lower than 0.05 was considered statistically significant for each analysis. Results are presented without transformations.

RESULTS

Increasing temperature significantly increased State 3 (Fig. 2.1A) and State 4 (Fig. 2.2A, B) respiration in both species. At the highest temperatures (35 °C for wolffish and 40 °C for rat), the State 3 respiration reached a plateau level (Figure 2.1A) while State 4 kept increasing in both species (Figure 2.2A, B). State 4 respiration was measured with or without atractyloside added. The two measurements gave different values but showed similar patterns of increase with temperature. Atractyloside addition gave significantly lower State 4 respiration and higher RCR compared to measurement without atractyloside at all temperatures except at 5 °C in rat and at 35 °C in wolffish (Figure 2.2C, D). In wolffish, at low temperatures (5 and 15 °C), State 4 respiration was too low to be measured, even without atractyloside addition. At 35 °C, the high values of RCR (3.48 ± 0.36) and RCRa (8.34 ± 0.93) showed the excellent functional integrity of rat heart mitochondrial preparation but this integrity was significantly reduced at 40 °C ($P < 0.001$; RCR of 2.36 ± 0.27 and RCRa of 4.83 ± 0.69 ; Fig. 2.2C). In wolffish at 25 °C, we observed a very high RCR (8.1 ± 1.7) and RCRa (16.4 ± 0.7) but these values decreased drastically at 35 °C to reach 1.56 ± 0.43 for RCR and 2.55 ± 0.29 for RCRa (Figure 2.2D). The decreases of RCR(a) in both species at higher temperatures are principally caused by a significant increase in State 4. In rats, the State 4a respiration nearly doubled between 35 and 40 °C going from 0.48 ± 0.06 to 0.75 ± 0.15 $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$. In wolffish, the State 4a at 35 °C (1.79 ± 0.62 $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$) was more than 6 times higher than at 25 °C (0.27 ± 0.06 $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$; Figure 2.2B).

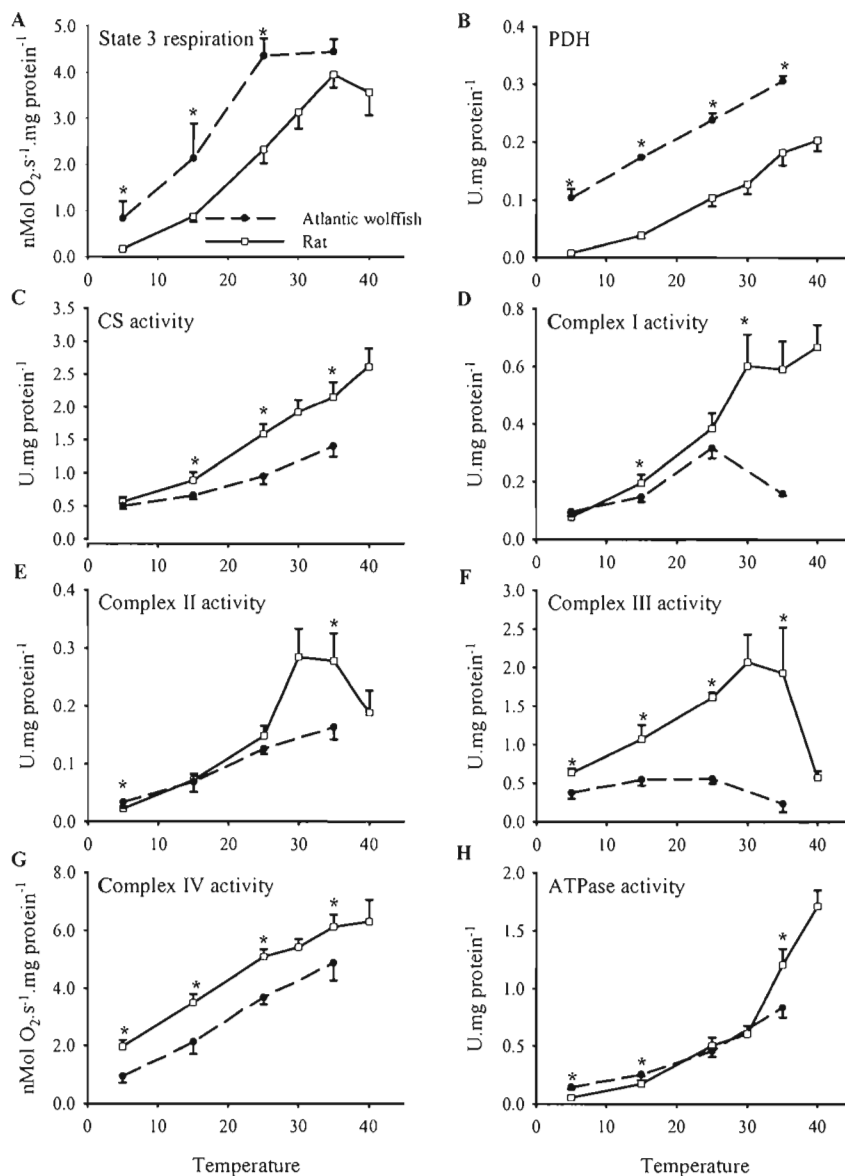


Figure 2.1: Mitochondrial functions measured at different temperatures in heart ventricles mitochondria of rat and Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*).

A) State 3 respiration with pyruvate and malate as substrates; B) Pyruvate dehydrogenase (PDH) activity; C) CS activity; D) Complex I activity; E) Complex II activity; F) Complex III activity; G) Complex IV activity; H) ATPase activity. Values are means \pm SD for 4 mitochondrial preparations. * P<0.05 for comparison between species at each temperature.

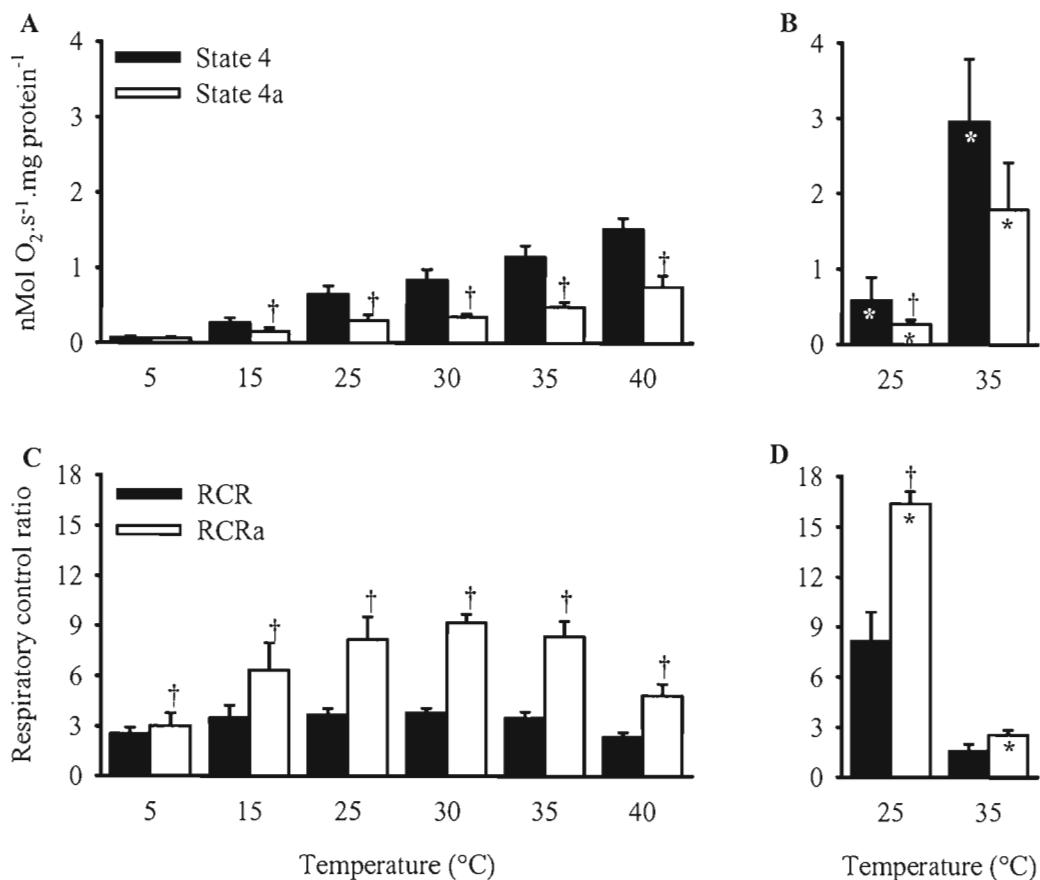


Figure 2.2: Effect of temperature on State 4 and RCR of mitochondrial respiration in heart ventricles mitochondria.

State 4 and state 4a respiration in A) rat and B) Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*). Respiratory control ratio (RCR and RCRa) in C) rat and D) Atlantic wolffish. State 4 respiration was measured after ADP depletion while state 4a was the value with addition of atractyloside. RCR was calculated as State 3/State 4, while RCRa was calculated as State 3/State 4a. Values are means \pm SD for 4 mitochondrial preparations. * $P < 0.05$ for comparison with the value for rat at the same temperature. † $P < 0.05$ for the comparison with the same measurement without atractyloside added for the same species and temperature.

The rate of State 3 respiration (Figure 2.1A) with pyruvate and malate as substrate was significantly higher in wolffish than in rat at 5 °C, 15 °C and 25 °C. PDH activity was the only mitochondrial function measured that demonstrated the same pattern, with higher activity in wolffish compared to rat between 5 and 25 °C (Figure 2.1B). ATPase activity at 5 and 15 °C and Complex II activity at 5 °C were also significantly higher in wolffish compared to rat (Figure 2.1E, H). The differences observed at low temperature, however, were small compared to those observed in State 3 respiration and PDH activity, and disappeared or were reversed at higher temperature. CS, Complexes I, III and IV (Figure 2.1C, D, F, G) showed similar or higher values in rat compared to Atlantic wolffish.

In rats, mitochondrial catalytic capacities increased until temperature reached 30 °C. Then, the activity reached a plateau level for Complexes I, II, III, and kept increasing for other mitochondrial functions (Figure 2.1). State 3 respiration reached a maximum at 35 °C ($3.95 \pm 0.28 \text{ nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$). This value is in the range of respiration measurement in rat heart isolated mitochondria at or near physiological temperature [2.65 (Cairns et al., 1998) and around 6 (Gnaiger et al., 2000a) $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$]. In contrast, CS, Complex IV, ATPase and PDH activities continuously increased from 5 °C to 40 °C. The enzymes activities in rat heart mitochondria are also comparable with literature values measured in the same tissue (in U per mg mitochondrial protein): e.g., PDH activity at 25 °C: 0.104 compared to 0.084 (Churchill et al., 2005); Complex I activity at 30 °C: 0.602 compared to 0.700-0.850 (Sammut et al., 2001); Complex III activity at 30 °C: 2.07 compared to 1.23 (Opalka et al., 2002); ATPase activity at 30 °C: 0.605 compared to 0.500 (Sammut et al., 2001); CS activity at 30 °C: 1.92 compared to 1.30 (Opalka et al., 2002).

The State 3 of respiration measured in Atlantic wolffish mitochondria at 15 °C ($2.14 \text{ nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$) was similar to the flux reported for rainbow trout heart mitochondria at the same temperature (1.6 to 2.1 $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$; West &

Driedzic, 1999). In Atlantic wolffish, State 3 respiration increased from 0.84 ± 0.09 to $4.36 \pm 1.07 \text{ nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ between 5 and 25 °C and then reached a plateau level ($4.45 \pm 1.01 \text{ nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ at 35 °C). In contrast, Complexes I and III activities started to decrease at temperatures higher than 25 °C whereas CS, Complexes II and IV, ATPase and PDH activities continued to increase through the whole range of temperatures (5 to 35 °C; Figure 2.1).

The ratio of mitochondrial respiration over the activity of Complex IV (Figure 2.3) allowed to measure the relative importance of the different mitochondrial enzymes in the two species at different temperatures. In rats, the ratio increases with temperature until it reached a plateau level at 30, 35 and 40 °C. In contrast, Atlantic wolffish showed a nearly stable ratio between 5 and 35 °C for State 3 of respiration (Figure 2.3A), Complex II (Figure 2.3D) and ATPase (Figure 2.3F) while the ratios for Complex I (Figure 2.3C), III (Figure 2.3E) and PDH (Figure 2.3B) decreased with temperature. In rat heart mitochondria, State 3 respiration and PDH activity showed particularly low values per Unit of Complex IV activity compared to wolffish. When mitochondrial functions were expressed over the PDH activity (Figure 2.4), the closer ratios between species was found for State 3 of respiration (Figure 2.4A). For other mitochondrial functions, the ratios were much higher in rat compared to wolffish, particularly at low temperature. Those ratios clearly showed the limited activity of PDH in rat heart compared to wolffish. Figures 2.3 and 2.4 clearly illustrated the important decreases in State 3 respiration and PDH activity in rat mitochondria at low temperature, whereas the other steps of the respiratory system (Complexes I to IV, ATPase) still showed activity close to the ones observed in wolffish.

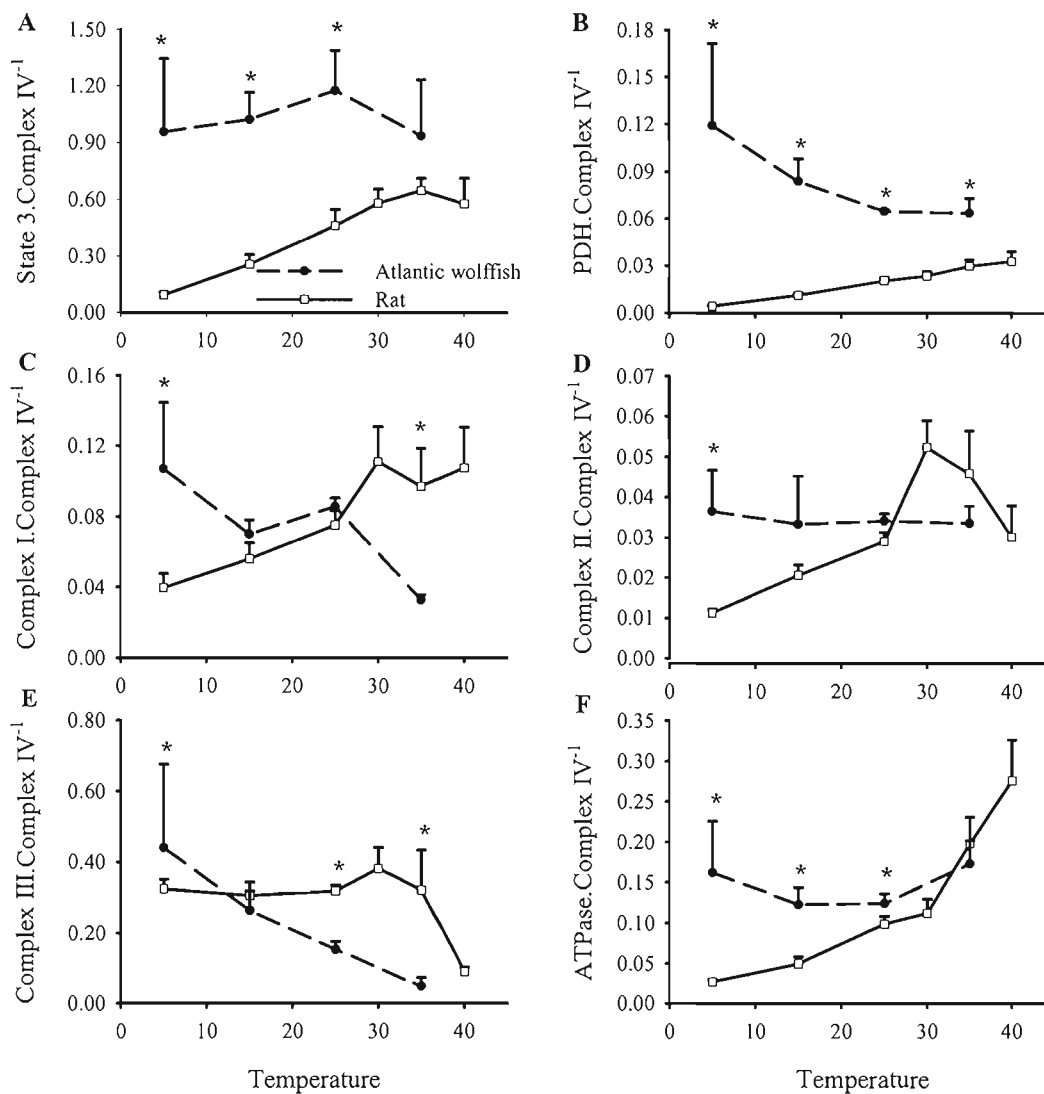


Figure 2.3: Ratios of the mitochondrial functions over the activity of Complex IV measured at each experimental temperature in the heart of rat and Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*).

A) State 3 respiration with malate and pyruvate as substrates; B) pyruvate dehydrogenase (PDH) activity; C) Complex I activity; D) Complex II activity; E) Complex III activity; F) ATPase activity. Values are means \pm SD for 4 mitochondrial preparations. * $P < 0.05$ for comparison between rat and wolffish values at the same temperature.

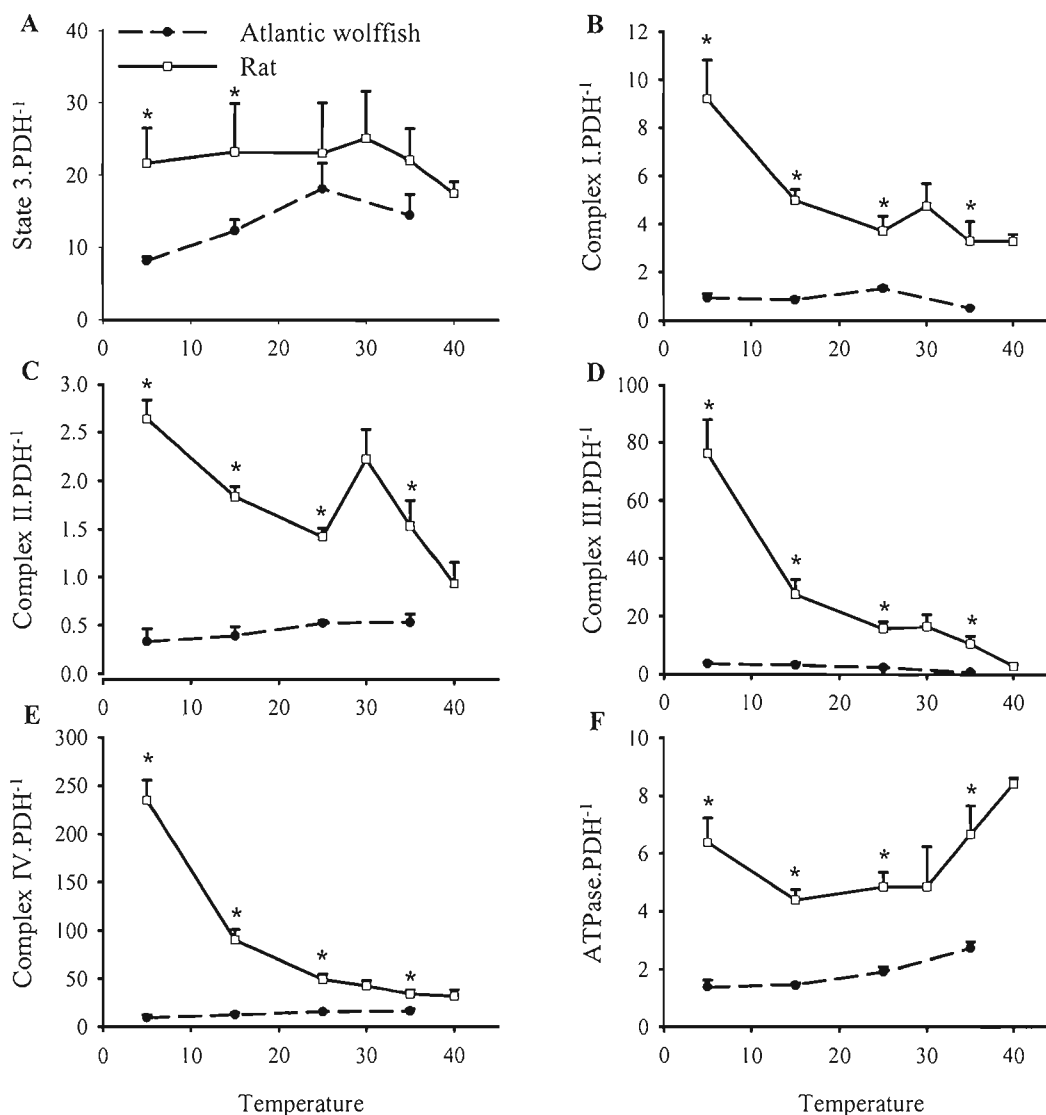


Figure 2.4: Ratios of the mitochondrial functions over the activity of PDH at different temperatures in the heart of rat and Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*).

A) State 3 respiration with malate and pyruvate as substrates, B) Complex I activity, C) Complex II activity, D) Complex III activity, E) Complex IV activity, F) ATPase activity. Values are means \pm SD for 4 mitochondrial preparations. * P<0.05 for comparison between rat and wolffish values at the same temperature.

In both species, most of the mitochondrial functions showed a decrease in thermal sensitivity (expressed as Q_{10} values, Figure 2.5) with an increase in temperature. For State 4 respiration in rats, CS activity in both species and ATPase activity in wolffish, the thermal sensitivity was similar at any temperature range. With the exception of State 4 respiration, higher thermal sensitivity was observed in rats (Figure 2.5A) compared to Atlantic wolffish (Figure 2.5B). The difference was particularly pronounced for State 3 respiration between 5 and 15 °C (Q_{10} values of 4.94 ± 0.34 and 2.52 ± 0.20 for rats and Atlantic wolffish, respectively) and PDH activity (Q_{10} values of 4.66 ± 0.27 and 1.69 ± 0.27 for rats and Atlantic wolffish, respectively). Between 5 and 35 °C, State 3 respiration showed a similar thermal sensitivity to PDH activity in rats and to Complexes II and IV in Atlantic wolffish.

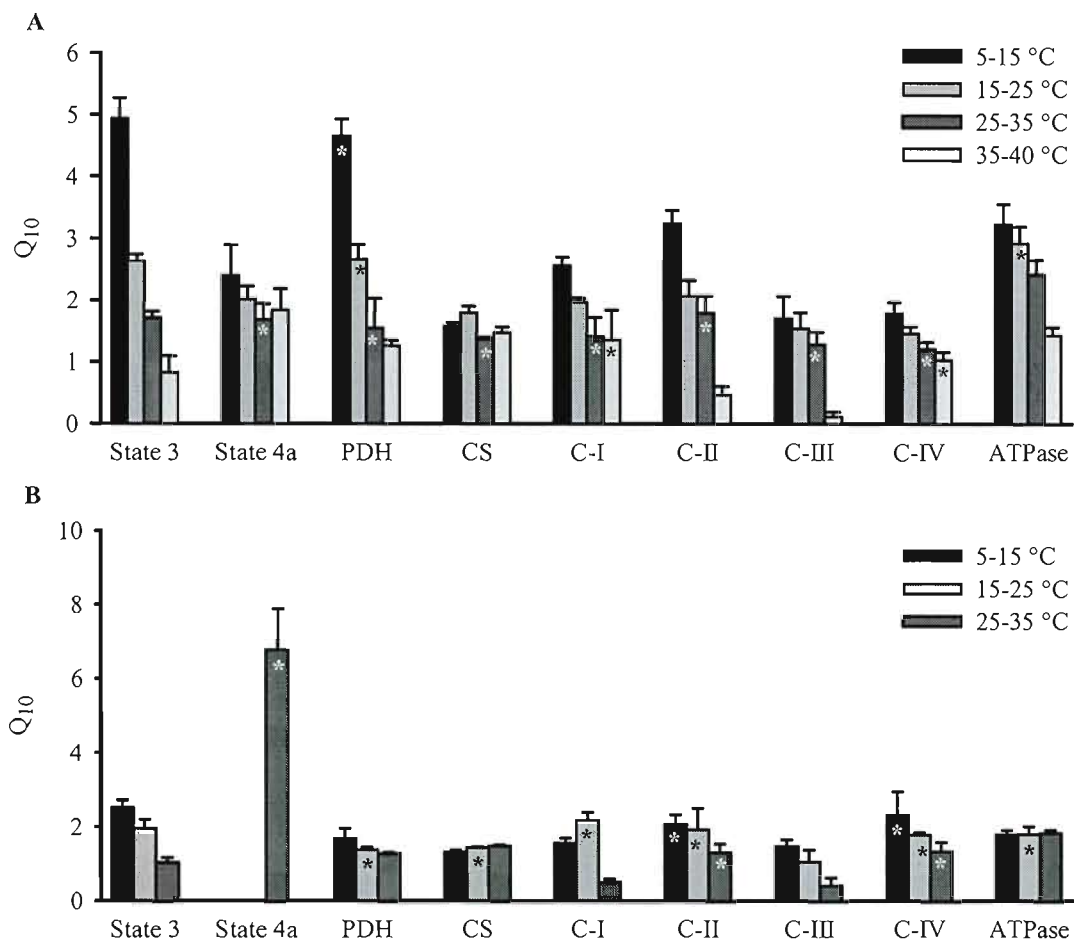


Figure 2.5: Q_{10} s of mitochondrial functions in the heart ventricles of A) Rat and B) Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*).

C-I, C-II, C-III and C-IV corresponded to Complexes I, II, III and IV. * Values are means \pm SD for 4 mitochondrial preparations. $P > 0.05$ for the comparison with the value of state 3 respiration (in the presence of malate, pyruvate and ADP) within the same temperature range and the same species.

DISCUSSION

Even though the thermal sensitivity of mitochondrial metabolism has been extensively studied in ectothermic species, the lack of an integrated view precludes a clear understanding of the impact of temperature on this complex process. In endothermic species, little is known about the thermal sensitivity of mitochondrial metabolism, particularly in the heart tissue. In the last decade, Dufour et al. (1996) and Chamberlin (2004) made a great step forward when they partially identified the process controlling mitochondrial respiration at different temperatures. Their approach does not, however, allow the identification of the individual step(s) responsible for the temperature dependence of mitochondrial metabolism. To extend these studies, we estimated the thermal sensitivity of mitochondrial respiration in parallel with the thermal sensitivity of individual reactions involved in this pathway in cardiac ventricular mitochondria of both a mammalian (rat) and an ectotherm (Atlantic wolffish) species.

Previous studies on isolated mitochondria from ectothermic and endothermic species have shown an increase in State 3 and State 4 respiration in different tissues with increases in temperature. Studies in rat hepatic mitochondria showed an increase in State 3 of succinate- (Kim & Berdanier, 1998; Samartsev et al., 2003) and glutamate+malate-supported (Rottenberg et al., 1980) respiration up to 37 °C. When the analysis was extended to 40 °C the State 3 respiration reached a plateau level whereas the State 4 kept increasing (Rottenberg et al., 1980). In rats, the thermal sensitivity of mitochondrial respiration over 35 °C appears to be tissue specific since States 3 and 4 respiration continue to increase at 40 °C in brain (Hillered & Chan, 1988). To our knowledge, the other studies of the thermal sensitivity of mitochondrial respiration in an endothermic heart did not extend its analysis to supra-physiological temperatures (Clejan et al., 1981; Lemieux et al., *sous presse*). In ectotherms, other studies have shown that increases in State 3 and State 4 respiration persist far above the upper temperature tolerance limit of the species (Dahlhoff & Somero, 1993;

Weinstein & Somero, 1998; Hardewig et al., 1999; Abele et al., 2002). State 4 corresponds to the respiration rate after the added ADP has been completely consumed. Under these circumstances, respiration rate is related to proton leak across inner membranes.

The proton leakage may occur either by the AMP/adenine nucleotide translocase (ANT) pathway (Hafner et al., 1990; Brand et al., 2005), by the uncoupling proteins (that may be slight in mammals; Brand, 2000; Ricquier & Bouillaud, 2000; Hoerter et al., 2004), by simple diffusion across the phospholipids bilayer (to a limited extent; Brookes et al., 1997), through most anion carriers (such as substrate pumps) and H⁺-transhydrogenase. State 4 respiration may also include oxygen consumption not related to proton leak when the mitochondrial preparation is contaminated by extramitochondrial ATPase which can produce ADP that might enter mitochondria through the ANT. In order to avoid this potential source of contamination, the State 4 measurements were carried out in the presence of saturating concentrations of atractyloside, a highly specific inhibitor of ANT. The higher rate of State 4 (without atractyloside) compared to State 4a (with atractyloside) observed in both species may be partly explained by the reduction of respiration from extramitochondrial ADP production and partly by a decreased proton leak through the ANT by inhibitor (Brand et al., 2005).

Mitochondria in other ectothermic species have been reported to exhibit an overall reduced State 4 compared to endothermic species, but this reduction was associated with a decreasing rate of substrate oxidation (State 3; Brookes et al., 1998). Our study is the first one to report an undetectable State 4 rate at low temperatures in an ectotherm specie (5 and 15 °C) for a mitochondrial preparation showing a high rate of State 3 respiration. The low State 4 respiration observed in wolffish compared to rat (both with or without atractyloside added) cannot be explained by low quality of the mitochondrial preparation, as the RCRs obtained in our study were similar or

higher compared to others studies in rats (Cairns et al., 1998; Swegert et al., 1999; Gnaiger et al., 2000a; Ovide-Bordeaux & Grynberg, 2004) or fish heart (West & Driedzic, 1999). The mitochondrial proton leakage stimulates respiration without energy conservation. The highly coupled mitochondria that we observed in wolffish could point to the importance of saving energy at low temperatures.

Our results suggest that PDH activity could play an important role in the determination of thermal sensitivity of mitochondrial respiration in rat heart exposed to temperatures below the physiological one (5 to 35 °C). The first indication is the similarity of Q_{10} values and patterns of State 3 respiration and PDH activity, which is particularly evident between 5 °C and 15 °C where unusually high Q_{10} values (near 5) were observed for both functions. The decrease in activity of other mitochondrial functions at low temperature was less pronounced (Q_{10} lower). For example, at 5 °C Complexes III and IV in rat kept more than 30% of maximal activity even when State 3 respiration was below 5%. The second indication of the importance of PDH activity in thermal sensitivity of mitochondrial respiration in rat heart comes from the comparison between species. The State 3 respiration is much higher in Atlantic wolffish compared to rat, whereas Complexes I to IV, ATPase, and CS showed similar or lower activity in wolffish, even at low temperature. PDH was the only measured enzyme that exhibited similar differences between species than the ones observed for State 3. This is in accordance with the results of Dufour et al. (1996) which showed the importance of the substrate oxidation system in the thermal sensitivity of mitochondrial metabolism in rat liver. However, the latter study did not identify the step(s) of the oxidation system (ETS complexes, PDH-catalyzed transformation of pyruvate to acetyl coA or conversion of acetyl-coA into reducing equivalent by the TCA cycle) that are most closely tied to the thermal sensitivity of mitochondrial respiration. The third indication of the importance of PDH in setting thermal sensitivity comes from the ratio of activity over different mitochondrial markers. PDH activity over activity of Complex IV was much higher in wolffish

compared to rat, particularly at the low temperature of 5 °C. This implies that rat mitochondria at low temperature would have to function with a low PDH activity compared to the rest of the electron transport chain and this could depress the maximal rate of mitochondrial respiration. This also explained why the State 3 respiration over PDH activity showed close value in both species, whereas Complex I to IV and ATP per units of PDH were much higher in rat, particularly at low temperature.

Our results highlight a parallel between the decrease in mitochondrial respiration and the decrease in PDH activity below the physiological temperature in rat. Several studies have demonstrated the pivotal role of PDH in regulating the rate of carbohydrate oxidation by mitochondria (reviewed by Stanley et al., 1997). This enzyme exists in active and inactive forms, which are interconvertible by phosphorylation and dephosphorylation process. The multiple regulating products acting on this enzyme allow a tight regulation of glucose metabolism in the heart according to the condition encountered by the tissue (e.g. normal condition, exercise, hypoxia; (Neely & Morgan, 1974; Randle, 1986; Stanley et al., 1997). Our results strongly suggest that PDH activity could represent a control point of mitochondrial respiration at low temperature in rat heart mitochondria, even if this control could be shared with other steps (e.g., transport of substrates and ADP). Furthermore, as PDH is not an enzyme embedded in the mitochondrial membrane, our results agree with a recent study of (Lemieux et al., sous presse) showing no relation between thermal sensitivity of rat heart mitochondrial respiration and membrane fatty acid composition.

In the Atlantic wolffish, the low thermal sensitivity of PDH activity and the high level of PDH activity prevent it from restricting the whole mitochondrial respiration at low temperature. This agree with a study of Blier & Guderley (1993) which showed that the maximal capacity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red

muscle mitochondria is not dictated by PDH. In fish adapted to survive in cold environment, PDH and CS activities keep providing a sufficient supply of electrons to the ETS. Most studies comparing cold-adapted species and mammalian or warm-adapted species have shown that the physiological functions of the cold-adapted species at cold temperatures were lower than the activity of warm-adapted species at their normal high temperature. For example, activity of CS of an Antarctic fish species at 0 °C is about one half the activity of the tropical fish at 25 °C (Kawall et al., 2002). It is generally accepted that lower metabolic capacity at low temperature may reduce some of the metabolic costs (e.g. transmembrane ions gradient, protein turnover through increased protein lifespan) and that the evolution could have favored energy saving instead of high enzymatic activity in the cold (Hochachka & Somero, 2002). According to this interpretation, the activity of mitochondrial functions in wolffish at normal habitat temperature should be much lower than in rats at 35 °C. This is the case for Complexes I to IV, ATPase and citrate synthase for which activities at 15 °C in wolffish (close to the optimal temperature for growth, 11 °C; McCarthy et al., 1998) was 2.9 to 4.7 times lower than activity at 35 °C in rats. The State 3 of mitochondrial respiration, was 1.8-fold higher in rat at 35 °C compared to wolffish at 15 °C whereas the PDH activity showed almost perfect similarity between rat at 35 °C (0.182 ± 0.022 U.mg protein⁻¹) and wolffish at 15 °C (0.172 ± 0.002 U.mg protein⁻¹). The cold-water adaptation of wolffish may have favored a sufficient increase in PDH activity to avoid the limitation of mitochondrial respiration rate observed in rat mitochondria at low temperature. In wolffish, the thermal sensitivity of mitochondrial respiration was parallel with the thermal sensitivity of Complexes II and IV within the whole range of measurement temperature (5 to 35 °C). In other ectotherm species, Complex IV has also been shown to have thermal sensitivity similar to State 3 respiration (Dahlhoff & Somero, 1993; Blier & Lemieux, 2001). The latter studies did not, however, measure activities of other complexes of ETS. Determination of thermal sensitivity of mitochondrial respiration by the catalytic capacity of Complex IV appears unlikely according to the important excess capacity

of CcOX in endothermic (Gnaiger et al., 1998a; Rossignol et al., 2000) and ectothermic species (Blier & Lemieux, 2001).

The major findings of this study can be summarized as follows. The strong and species-specific correlation between the thermal sensitivities of PDH activity and overall mitochondrial respiration suggest that this enzyme could play a major role in the determination of thermal sensitivity of mitochondrial respiration in the rat heart. The weak thermal sensitivities (normal Q_{10}) we observed for other functional steps in the rat (i.e. Complexes I to IV of the ETS, ATPase and CS) seem to exclude the possibility that these functions limit mitochondrial respiration at low temperature. Temperature adaptations through quantitative or qualitative adjustments of enzymes located prior to the ETS in the matrix could partly explain the functional conservatism of mtDNA encoded peptides in vertebrates (see Blier et al., 2001; Blier et al., 2006a). Our results call for further investigations on the kinetics and catalytic capacity of PDH in comparative studies of mitochondrial performance, in order to evaluate whether the correlations we report here in PDH activity are causal in setting the thermal sensitivity and the potential adaptation of mitochondrial respiration. The comparative studies on the ETS complexes, phosphorylation system enzyme (ATPase), and enzymes from the matrix that provides the reducing equivalents are needed to determine if mitochondrial apparatus process the required plasticity to adapt the aerobic capacity to different environmental conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Dr. Blier. H. Lemieux received scholarship from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and from «Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies. We are extremely grateful to Dr. Steven C. Hand (Department of Biological Science, Louisiana State

University, Baton Rouge, USA) for helpful comments on the manuscript. Many thanks to Étienne Hébert-Chatelain, Marig Hamon, Véronique Desrosiers, and to François Tremblay for taking care of the animals.

CHAPITRE III

RÉGULATION DU MÉTABOLISME MITOCHONDRIAL

MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CONTROL BY TEMPÉRATURE AND SUBSTRATE COMBINATIONS, AND EXCESS CAPACITY OF CYTOCHROME C OXIDASE IN PERMEABILIZED FIBERS OF THE MOUSE HEART

Lemieux^{1,3}, H., P.U. Blier¹, J.-C. Tardif² & E. Gnaiger³

¹Laboratoire de Biologie Intégrative, Université du Québec à Rimouski, 300, allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada, G5L 3A1

²Institut de Cardiologie de Montréal, 5000 rue Bélanger, Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8

³Daniel Swarovski Research Laboratory, Department of General and Transplant Surgery, Innsbruck Medical University, Innrain 66/6, Innsbruck, Autriche

Les résumés de conférences suivants contiennent une partie des résultats de ce chapitre:

Lemieux, H., A. Garedeu, P.U. Blier, J.-C. Tardif & E. Gnaiger. 2006. Temperature effects on the control and capacity of mitochondrial respiration in permeabilized fibers of the mouse heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (5-6, Suppl. 1): 201-202.

Garedeu, A., H. **Lemieux**, T. Schachner, P.U. Blier, J.-C. Tardif & E. Gnaiger. 2006. High excess capacity of cytochrome *c* oxidase in permeabilized fibers of the mouse heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (5-6, Suppl. 1): 167-168.

RESUME EN FRANÇAIS

Des combinaisons complexes de substrats sont requises pour supporter l'opération complète du cycle de l'acide citrique dans les cellules perméabilisées. La capacité respiratoire maximale est atteinte seulement en appliquant des substrats qui activent simultanément les multiples déshydrogénases et des entrées convergentes d'électrons à la jonction ubiquinone. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact de la température et de différentes combinaisons de substrats sur (i) la capacité respiratoire maximale des Complexes I+II et (ii) l'estimation de la capacité des étapes situés en aval de la jonction ubiquinone (système de phosphorylation et cytochrome *c* oxydase, CcOX). Les fibres perméabilisées ont été préparées à partir du ventricule gauche de cœur de souris. Nos résultats démontrent une limitation de la respiration du Complexe I par les substrats utilisés dans les protocoles conventionnels, puisque l'addition de pyruvate après le glutamate+malate augmente le taux de respiration de 3 fois. Le stade 3 de respiration est significativement plus élevé avec le malate+pyruvate entre 25 et 40 °C alors que le patron inverse est observé à 4 °C. La respiration du Complexe I est stimulée de 1,9 fois à 37 °C (1.5 fois à 4 °C) lors de l'ajout de succinate. Le découplage de la respiration mitochondriale provoque une faible augmentation de respiration entre 25 et 40 °C (moins de 10 %) et une augmentation plus importante à 4 °C (36 %). Les courbes de titration à l'azide du système de transport des électrons et de l'activité de la CcOX révèlent un excès de CcOX de 1.70 à 37 °C et de 7.6 fois à 4 °C. Les résultats démontrent bien les effets complexes de la température sur les fonctions mitochondriales et sur l'estimation du contrôle de la respiration mitochondriale par différentes étapes isolées.

Mots clés : Phosphorylation oxydative, capacité respiratoire, contrôle de la respiration mitochondriale, respirométrie à haute résolution, physiologie mitochondriale, capacité en excès, contrôle du flux métabolique

ABSTRACT

Complex combinations of mitochondrial substrates are required for supporting the complete operation of the citric acid cycle in permeabilized cells. The maximal respiratory capacity is reached only by providing substrates for multiple NADH-related dehydrogenases and simultaneous electron entry through Complex I and succinate dehydrogenase into the Q-cycle. The present project aimed at evaluating the impact of temperature and multi-substrate combinations on (i) Complex I-linked respiratory capacity; (ii) Complexes I+II convergent electron transport capacity and (iii) the estimation of the capacity of the step downstream of the Q-cycle, in particular the phosphorylation system and the cytochrome *c* oxidase (CcOX). Permeabilized muscle fibers were prepared from the left ventricle of mouse heart. Our results showed a limitation of Complex I-linked respiratory flux by substrates used in conventional protocols, as addition of pyruvate after glutamate+malate increased respiratory flux 3.0-fold in mouse heart. State 3 respiration was significantly higher with malate+pyruvate compared to malate+glutamate at 25 - 40 °C, but this was reversed at 4 °C. Complex-I supported respiration was further stimulated by addition of succinate by a factor of 1.9 at 37 °C, decreasing to 1.53 at 25 °C. The uncoupling effect on flux with convergent electron flow through Complexes I+II was less than 10% in mouse heart between 25 and 40 °C, but increase to 36% at 4 °C. Threshold plots from azide titrations of flux through the electron transport system (with Complexes I+II substrates, uncoupled by FCCP) versus CcOX activity revealed an excess CcOX capacity of 1.70-fold over pathway flux at 37 °C and 7.6-fold at 4 °C. Results obtained with permeabilized fibers under hypothermic incubation conditions may be extrapolated to the physiological temperature of 37 °C with extreme caution only, as there are large variations in respiration patterns with different substrates at lower temperature.

Keywords: oxidative phosphorylation; respiratory capacity; mitochondrial respiratory control; high-resolution respirometry; mitochondrial physiology; excess capacity; metabolic flux control, temperature dependence

INTRODUCTION

Contractile activity in cardiac muscle mainly depends on mitochondrial energy production generated by oxidative phosphorylation (OXPHOS). Heart function, therefore, is highly sensitive to defects in OXPHOS (Chinnery & Turnbull, 1997; Wallace, 1999), including stress-induced mitochondrial cytopathies [e.g., acute ischemia and myocardial infarct (Marín-García, 2005), ischemia-reperfusion (Kuznetsov et al., 2000; Kuznetsov et al., 2004)], degenerative mitochondrial defects [e.g., type 2 diabetes (Schrauwen & Hesselink, 2004), aging (Shigenaga et al., 1994; Ames et al., 1995)] and inherited mutations of mitochondrial or nuclear DNA (Wallace, 2000; von Kleist-Retzow et al., 2003). Similar mutations affecting mitochondrial function can give rise to dramatic variability in the clinical symptoms between patients or tissues, due to the genetic threshold effect (Wallace, 1986; Wallace, 1993; Ballinger et al., 1994). The metabolic or 'biochemical threshold effect', in turn, is due to an excess of a particular enzyme above the pathway operating under physiological conditions in the tissue. This implies that a functional impairment appears only when the capacity of the enzyme is reduced below the threshold activity (Rossignol et al., 2003). To evaluate the biochemical threshold and excess capacity of a mitochondrial enzyme, it is necessary to not only quantify the changes in enzyme activity, but to study the pathway of OXPHOS in mitochondria respiring at maximum capacity.

Mitochondrial respiration in the heart is supported by the simultaneous utilization of carbohydrates (10 to 40%; Gertz et al., 1988) and fatty acids (60 to 90%; van der Vusse et al., 1992). Electrons from NADH (linked to Complex I), FADH₂ (linked to Complex II) and from the flavoprotein-linked step of fatty acid β -oxidation, reduce coenzyme Q. At the Q-cycle, therefore, separate segments of electron flow converge from (i) Complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase), (ii) Complex II (succinate dehydrogenase) and (iii) electron-transferring factor (Figure

3.1A). Downstream of the Q-cycle, electron flow continues through the common linear segment of the electron transport system through Complex III (ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase) and Complex IV (cytochrome *c* oxidase, CcOX) to oxygen as the terminal electron acceptor. Conventional protocols for estimation of mitochondrial functions use either NADH-linked substrates or the classical succinate with rotenone combination, then separating the system into linear thermodynamic cascades, forming distinct electron chains (Chance & Williams, 1955a; Estabrook, 1967). This experimental approach is useful for the functional diagnosis of specific OXPHOS defect and for the study of respiratory control ratio and proton stoichiometry. In contrast, it does not allow the estimation of maximal respiratory capacity in physiological conditions. The convergence of electron at the Q-cycle is functionally significant in heart from rat (Costa et al., 1988), and in skeletal muscle from human (Kunz et al., 2000; Rasmussen & Rasmussen, 2000; Rasmussen et al., 2001; Capel et al., 2005; Boushel et al., 2007), rat (Llesuy et al., 1994; Garait et al., 2005), and pigeon (Rasmussen & Rasmussen, 1997), where active respiration (in the presence of ADP, State 3) increases up to 2.1-fold when succinate is added to NADH-linked substrates. Similarly, glycerol-3-phosphate (another branch of electron input into the Q-cycle; Figure 3.1A) exerts an additive effect on State 3 respiration when used simultaneously with pyruvate and malate in rabbit skeletal muscle mitochondria (Jackman & Willis, 1996). In the presence of intersubstrate competition for transport across the inner mitochondrial membrane (Haslam & Krebs, 1963), however, the effect of addition of a substrate would not be fully additive.

The present project aimed at quantifying the increase in respiratory capacity in mouse heart permeabilized fibers when using substrate combinations supporting convergent electron input through NADH and succinate (Complexes I+II) simultaneously into the Q-cycle. The measurement of maximal respiratory capacity was performed by providing multi-substrate combinations for simultaneously feeding electrons through Complex I (pyruvate, malate, glutamate) and succinate

dehydrogenase (Complex II, succinate) into the Q-cycle. The maximal reference state obtained was used for the assessment of limitation and excess of the step downstream of the Q-cycle, for instance, the phosphorylation system (adenine nucleotide translocase or ANT, phosphate carrier and ATP synthase) and the CcOX. The importance of the apparent CcOX excess is related to the regulatory functions (e.g. to avoid an excessive inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide (Antunes et al., 2004) and for maintaining a high oxygen affinity with the low CcOX turnover rate present even at maximum aerobic performance (Gnaiger et al., 1998a)). The experiment was performed at physiologically relevant temperatures, including normothermia (37 °C), hyperthermia (e.g. fever; 40 °C), and modest (25 and 30 °C) to deep hypothermia (4 °C). Modest and deep hypothermia are used to temporarily and reversibly reduce myocardial metabolism during cardiac surgery (e.g., to limit ischemic damage after myocardial infarction (Hale & Kloner, 1999; Dae et al., 2002; Kloner & Rezkalla, 2004) and organ preservation (Sealy, 1989). The heart tolerance to deep cold ischemia is rather low compared to other tissues (e.g. kidneys). Change in additive effect of substrate combinations and in estimation of apparent excess are expected with temperature, and are important in a clinical context.

Our study addresses the importance of physiological conditions allowing multiple entries of electrons into the Q cycle for the assessment of mitochondrial maximal respiratory capacity and for the estimation of the control of respiration by different steps downstream of the Q cycle.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of permeabilized myocardial fibers

Adult male mice C57 BL/6N were housed under standard conditions with free access to food and water according to the Austrian Animal Care Law. At 8 to 10 weeks of age (23 ± 3 g), animals were anaesthetized with ketamine ($80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and

xylazine ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) given intramuscularly. The heart was excised and put into 5 ml of ice-cold relaxing solution containing (in mM) 2.77 CaK_2EGTA , 7.23 K_2EGTA , 20 imidazole, 20 taurine, 6.56 MgCl_2 , 5.77 ATP, 3.95 phosphocreatine, 0.5 dithiothreitol, and 50 K-MES, pH 7.1 at 0°C . Approximately 40 mg of tissue were dissected from the left ventricle for preparation of muscle fibers. After rapid mechanical dissection of the myocardial tissue, bundles of fibers were permeabilized by gentle agitation for 30 min at 4°C in the relaxing solution supplemented with $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ saponin (Saks et al., 1998). Fibers were washed by agitation for 10 minutes in ice-cold respiration medium MIRO5 (110 mM sucrose, 60 mM K-lactobionate, 0.5 mM EGTA, $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ BSA essentially fatty acid free, 3 mM MgCl_2 , 20 mM taurine, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM K-HEPES, pH 7.1; Gnaiger et al., 2000a), immediately blotted, weighed and used for respirometric measurements.

High-resolution respirometry

Respiration was measured simultaneously in 10 respiration chambers (Oroboros Oxygraph 2k; Innsbruck, Austria), two for each of the following temperatures: 4°C , 25°C , 30°C , 37°C , and 40°C . About 8 mg of fibers at 4°C and 0.7-1.3 mg of fibers at the other temperatures were put in the different chambers, each containing 2 ml of respiration medium MIRO5 (Gnaiger et al., 2000a). The software DatLab (Oroboros Instruments) was used for data acquisition and analysis. Respiration rates were expressed per mg of fiber wet weight. The two multiple titration protocols described in Figure 3.1 were completed within less than 1 hour. Instrumental (for the protocols in Figure 3.1) and chemical (for the estimation of CcOX activity; Figure 3.3) backgrounds allowed to subtract the oxygen flux due to chamber and autoxidation of TMPD and ascorbate (in the presence of $280 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ catalase to prevent accumulation of hydrogen peroxide) from the total volume-specific oxygen flux (Gnaiger et al., 1995; Gnaiger et al., 1998a).

Determination of CcOX excess capacity

Azide titrations of maximum CcOX capacity and of maximum pathway flux were performed at 4°C, 25 °C, 30 °C, 37 °C and 40 °C (protocol described in Figure 3.3). This allowed the construction of threshold plots, i.e. plots of relative respiration rate against the percentage of inhibition of isolated CcOX activity at the same azide concentration as previously described (Letellier et al., 1994; Villani & Attardi, 1997). Uncoupled state was used for the estimation of CcOX excess capacity over ETS, as the azide also inhibit the F-ATPase (Bowler et al., 2006) and that the potassium cyanide could not be used as it competes with pyruvate which is present in the protocol. The inhibition constant (K_i) were calculated from conventional double reciprocal plots. All chemicals were from Sigma (Germany).

Enzyme analysis

The content of the chambers were removed at the end of each experimental run and the chamber was rinsed twice with 500 µl of respiration medium. The fibers were homogenized for 2 times 30 s with an Ultra-Turrax homogenizer at maximum speed and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for measurement of citrate synthase at 30 °C (Srere, 1969).

Data analysis

Statistica software[®] (Tulsa, OK, USA) was used for all statistical analyses. Results were expressed as mean ± standard deviation for 4 to 16 replicates. Data were log transformed to meet the requirement for heteroscedasticity according to Levene's test. To analyze differences between protocols for the different states and

temperatures, we used a three-factor (protocol, state and temperature) ANOVA followed by a posteriori Tukey multiple comparison tests. To determine the effects of (i) cytochrome *c* addition, (ii) second substrate addition for measurement of Complex I, (iii) convergent electron input from Complexes I+II and (iv) FCCP addition, we used a t-test for dependent samples. A P value lower than 0.05 was considered statistically significant. Results are presented without transformation.

RESULTS

Mitochondrial respiration as a function of substrates

We quantified mitochondrial respiratory capacity in permeabilized mouse heart fibers with sequential additions of substrates that supply electrons to Complexes I or II (Figure 3.1B, C). Respiratory states with multiple substrates were designed to extend conventional bioenergetic approaches by assessing OXPHOS capacity under physiological conditions. Substrates supplying electrons to Complex I produce NADH at five key steps: pyruvate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, oxoglutarate dehydrogenase and malate dehydrogenase. Initially, resting respiration (without ADP) was measured in the presence of either glutamate+malate (GM) or pyruvate+malate (PM). The relative stimulation of oxygen flux by ADP (respiratory control ratio, RCR) was 6.5 ± 1.5 with PM compared to 3.7 ± 1.0 with GM (37 °C). ADP-stimulated respiratory flux (State 3) was three-fold higher with PM compared to GM (Figure 3.1C). Addition of pyruvate to GM increased flux (PMG with ADP) by a factor of 2.6 ± 0.5 (Figure 3.1B, C). Even the addition of glutamate to PM exerted a slight stimulatory effect on respiration (factor of 1.1 ± 0.1 ; Figure 3.1C). Similarly, previous studies reported a stimulation of respiration with addition of glutamate to PM by a factor of 1.16 in rat heart mitochondria (Digerness & Reddy, 1976), 1.15 in rabbit soleus (Jackman & Willis, 1996) and 1.30 in human vastus lateralis (Winkler-Stuck et al., 2005). The catalytic

capacity of Complex I, therefore, exceeds the capacity of dehydrogenases when activated separately by either PM or GM. With succinate alone (electron input through Complex II, in the presence of the Complex I inhibitor rotenone), the respiratory capacity was similar to that observed with the NADH-linked substrate combinations (Figure 3.1C).

In isolated mitochondria or permeabilized fibers incubated with pyruvate+malate+glutamate (PMG), citrate and 2-oxoglutarate are formed and rapidly exchanged for malate by the tricarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. This limits the formation of succinate in further reaction steps of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. In addition, succinate is lost from the mitochondria through the active dicarboxylate carrier exchanging succinate for inorganic phosphate. The high malate concentration (2 mM) equilibrates with fumarate, inducing product inhibition of succinate dehydrogenase. Taken together, this prevents formation of FADH₂ (Lemasters, 1984), and Complex II is not involved in respiration with PMG. To activate succinate dehydrogenase and NADH-related dehydrogenases of the TCA cycle simultaneously, a high external succinate concentration is required (Rasmussen & Rasmussen, 1997; Rasmussen et al., 2001), thus simulating the physiological condition of convergent electron flow from Complex I and Complex II into the Q cycle (Figure 3.1A). Convergent electron flow through Complexes I+II was initiated by addition of succinate to the NADH-linked substrates (PMG), resulting in the substrate combination PMGS with ADP (Figure 3.1B). This physiological state with electron flow through Complexes I+II almost doubled respiration compared to conventional State 3, when flux is measured separately through Complex I or Complex II. Respiration increased by a factor of 1.89 ± 0.32 after addition of succinate, and was 1.70 ± 0.16 -fold higher than respiration supported by succinate+rotenone (Figure 3.1C). Neither electron input into Complex I or Complex II alone supported fluxes as high as the respiration achieved with simultaneous electron input from Complexes I+II, thus providing evidence that convergent electron flow exerted an additive effect

on respiratory capacity. Conventional protocols supplying substrates separately for electron input to either Complex I or II, therefore, underestimate mitochondrial respiratory capacity by 40-50 %.

The control exerted by the phosphorylation system on maximum coupled flux is directly reflected by the coupled/uncoupled flux ratio. This ratio was 0.95 ± 0.04 (significantly different from 1.0; $P < 0.05$) and 1.00 ± 0.02 in the two protocols (Figure 3.1C), indicating a small or no stimulation of ADP-activated flux by uncoupling.

Effect of temperature on OXPHOS flux control

Considering that most studies on permeabilized fibers and isolated mitochondria are reported at temperatures of 25 or 30 °C (see ref. N'Guessan et al., 2004), we performed the multiple substrate protocols at 25 and 30 °C, and extended this study to hypothermia (cold storage temperature of 4 °C) and hyperthermia (40 °C). Like at 37 °C, respiratory flux was higher with PM compared to GM at 25 to 40 °C, but this pattern was entirely reversed at 4 °C (Figure 3.2). At all experimental temperatures, the higher respiratory capacity in State 3 resulted in a higher RCR (for PM at 25-40 °C, and GM at 4 °C). The additive effect of succinate on mitochondrial respiratory capacity decreased from 1.9-fold at 37 °C to 1.5-fold at 25 °C. The reduction in respiration rate with temperature with the convergent electron flow through Complexes I+II reaching 2.7 % of the normothermic level at 4 °C. The control exerted by the phosphorylation system on maximum coupled flux was 0.96 at 25 and 40 °C and 0.92 at 30 °C, indicating a small stimulation of ADP-activated flux by uncoupling (significantly different from 1.0; $P < 0.05$, pooled protocols; Figure 3.2). At 4 °C, however, the uncoupling effect increased to a control ratio of 0.91 ± 0.04 and 0.60 ± 0.07 with protocols 1 and 2, respectively (Figure 3.2). Even in conditions of single electron input into the Q-cycle, flux control by the phosphorylation system increases at low experimental temperature in rat liver

mitochondria, and the RCR declines due to the limitation of state 3 respiration by the phosphorylation system (Quentin et al., 1994; Dufour et al., 1996).

CcOX excess capacity

When using substrates for electron supply through Complex I, the major control resides upstream in the dehydrogenases of the citric acid cycle, with a high apparent excess capacity of respiratory complexes downstream (Rossignol et al., 2003). In the physiological state of simultaneous electron supply through Complexes I+II, flux control is potentially shifted to Complex III or IV. We examined, therefore, the apparent excess capacity of CcOX at maximum convergent pathway flux. The pathway flux titration was performed after uncoupling and thus eliminating the slight contribution of the flux control by the phosphorylation system. Similarly, the isolated step was determined in the uncoupled state after inhibition of Complexes I, II and III (Figure 3.1B) and subsequent addition of ascorbate and TMPD (continuation of the protocol shown in Figures 3.1B and C, and Figure 3.2).

Azide titrations are shown in Figure 3.3A-D, with hyperbolic inhibition of CcOX activity. The CcOX excess capacity is illustrated by the threshold plot, which shows the relative flux through the respiratory system as a function of relative inhibition of CcOX at identical azide concentrations (Figure 3.3E-H). The threshold curve has two distinct phases related to (i) the flux control coefficient above the threshold (initial slope; dotted line) and (ii) the elimination of excess capacity below the threshold, where further inhibition of CcOX causes a linear inhibition of pathway flux (full line; Figure 3.3E-H). The threshold for inhibition of CcOX, therefore, is defined as the intercept of the initial slope in phase i with the linear phase ii. CcOX activity can be inhibited by 41 % with only a minor effect on respiratory capacity. The CcOX excess capacity is the intercept of the linear regression for phase ii with the relative flux at zero CcOX inhibition. Even when convergent electron flow

through Complexes I+II is used as the reference state, a high apparent excess capacity was observed (1.7-fold). This excess provides the enzymatic basis for a low flux control coefficient and a high functional threshold (Figure 3.3E).

CcOX excess capacities and temperature

CcOX excess capacities and thresholds were identical at 40 °C (1.61 ± 0.33 ; results not shown), 37 °C and 30 °C (Figure 3.3E, F). The increases of excess capacity and threshold value with decreasing temperature were apparent at 25 °C, and very pronounced at 4 °C (CcOX excess increased to 1.82- and 7.16-fold, and the threshold from 0.45 to 0.83 at 25 °C and 4 °C, respectively; Figure 3.3G, H). The K_i' of CcOX for azide decreased with temperature (0.130 mM at 40 °C, 0.097 at 37 °C, 0.053 at 30 °C, 0.032 at 25 °C and 0.002 at 4 °C).

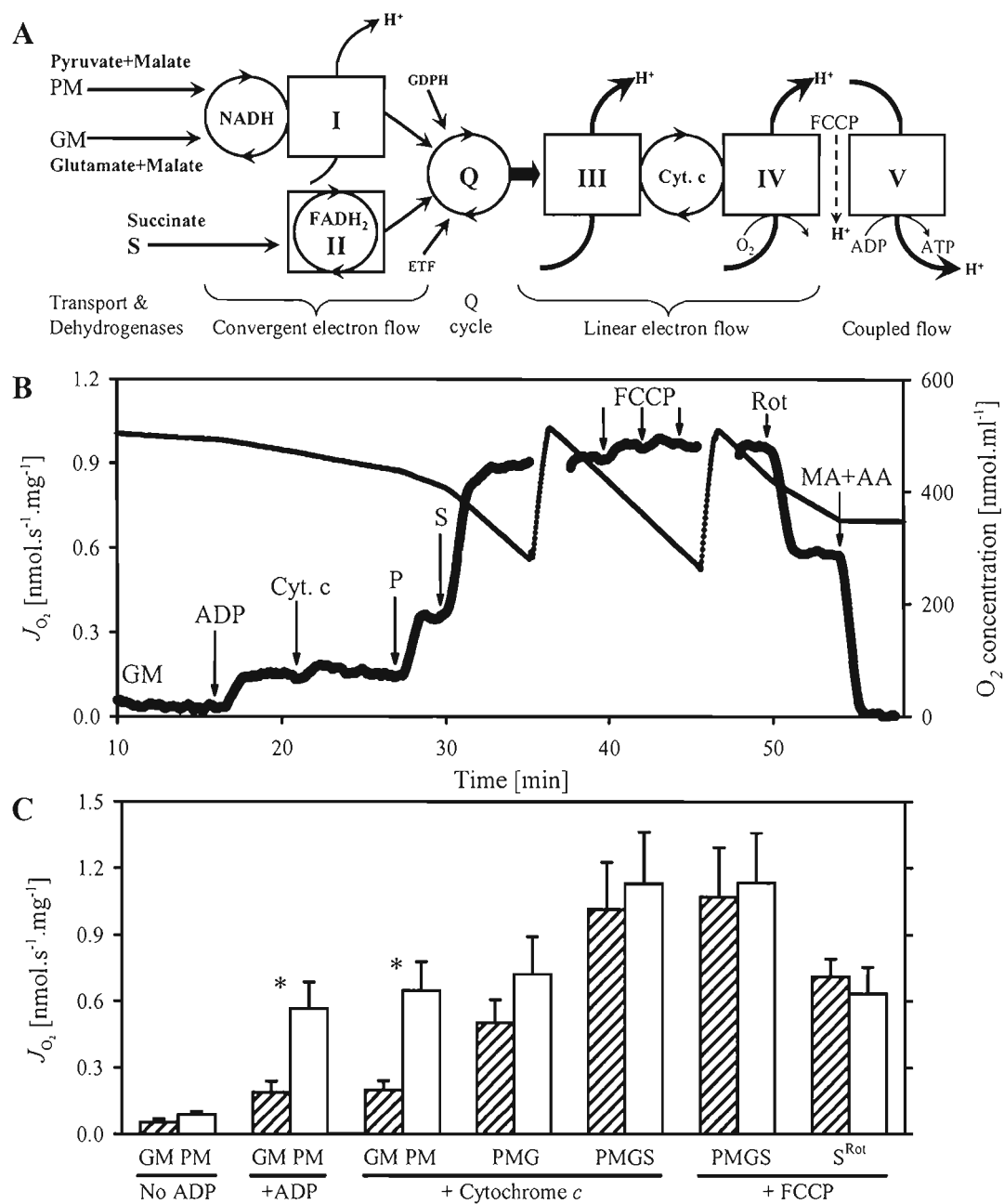


Figure 3.1: Respiration of permeabilized mouse heart fibers at 37 °C in multiple substrate/inhibitor protocols.

Figure 3.1 (continuation) A) Schematic representation of the electron transport system with convergence of electrons from Complex I, Complex II, glycerol-phosphate dehydrogenase (GDPH) and electron transferring factor (ETF), into the Q-cycle. Pyruvate+malate (PM) and glutamate+malate (GM) fed electrons from NADH into the Complex I, whereas succinate (S) allowed the formation of FADH₂ by Complex II. The electron from both Complex I and II, converge at the Q-cycle, and follow a linear pathway through the Complex III, IV and to the final acceptor, the oxygen. During electron transport, Complex I, III, and IV act as proton pumps, which allow the build of a proton gradient in the intermembrane space. The coupling of phosphorylation system (Complex V) to the electron transport allows the use of the proton potential to produce ATP from ADP. FCCP (carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) uncoupled the electron transport from the ATP production. B) High-resolution respirometric display of oxygen concentration (right axis, tick line) and respiration (left axis, bold line) as a function of time. Arrows indicate times of titration. The representative experiment (protocol 1), started with GM (State 2; 10 and 5 mM, respectively), followed by the addition of ADP (State 3; 1 mM) and cytochrome *c* (10 μM). Pyruvate (P, 5 mM) was then added as a second substrate for Complex I. Respiration with convergent electron flow through Complexes I+II was measured after addition of succinate (S; 10 mM), and after uncoupling by FCCP. Strong inhibition of Complex I by rotenone (0.5 μM; succinate-supported respiration) illustrates the additive effect of convergent electron through Complexes I+II. The residual respiration after addition of malonic acid (MA; 5 mM; inhibitor of Complex II) and antimycin a (AA; 2.5 μM; inhibitor of Complex III) showed less than 2 % of non mitochondrial respiration. C) Measurement of the different states for the two different protocols. States 2 and 3 were measured with GM (protocol 1, dashed bars; *N* = 16 experiments, Figure 3.1B) or PM (protocol 2, open bars; *N* = 7 experiments). External cytochrome *c* exerted a significant but small effect (4 and 14 % stimulation with GM and PM, respectively). * indicates significant differences between the 2 protocols for the same state. After addition of pyruvate to GM and glutamate to PM, respiratory flux was not statistically different in the two protocols (PMG). Respiration with convergent electron flow through Complexes I+II (PMGS) was slightly stimulated after uncoupling by FCCP (up to optimum concentration in the range of 0.125 to 0.375 μM), and strongly inhibited after addition of rotenone (succinate-supported respiration; S^{Rot}). Results are expressed as mean ± SD.

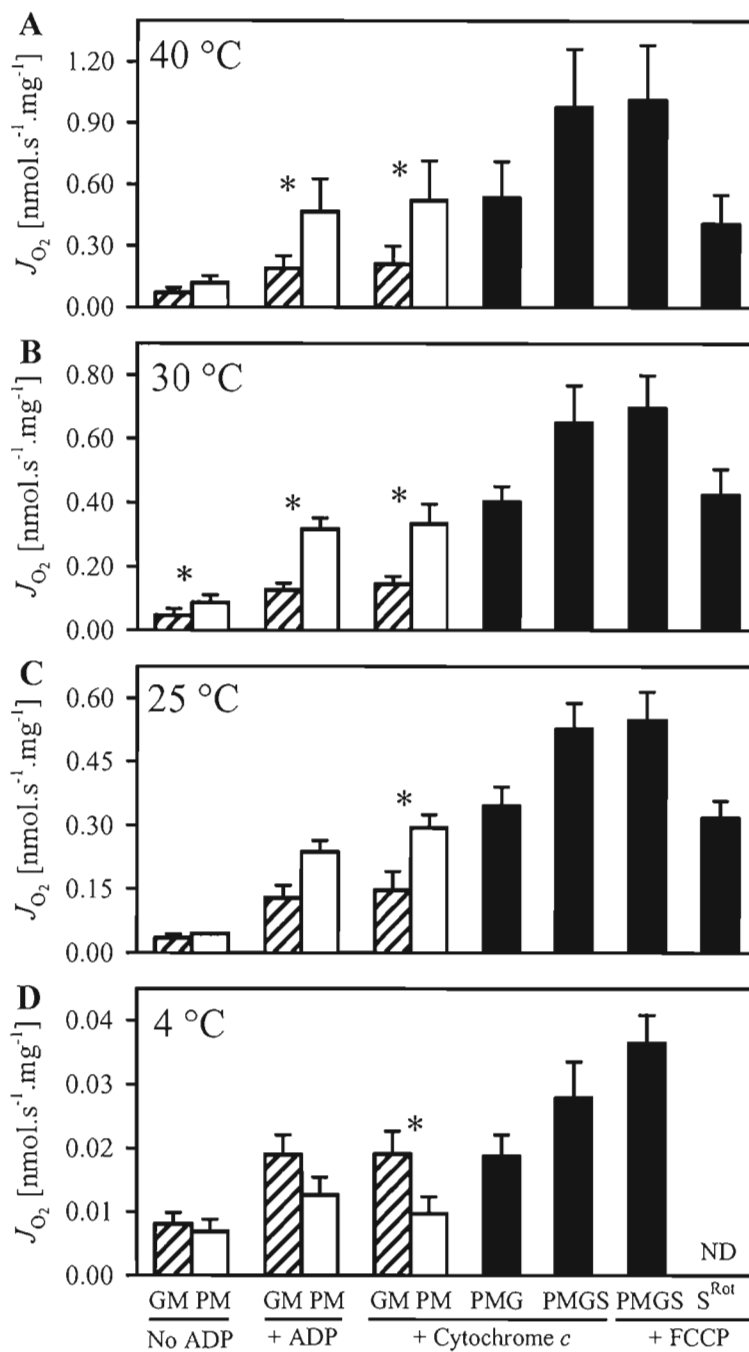


Figure 3.2: Respiration of permeabilized mouse heart fibers in multiple substrate/inhibitor protocols at different temperatures (for 37 °C and abbreviations see Figure 3.1).

Figure 3.2 (continuation) State 2 was measured with GM (dashed bars; $N = 5-14$) or PM (open bars; $N = 4-6$). External cytochrome *c* exerted a small or non-significant effect. Respiratory flux after stimulation by ADP and cytochrome *c* was significantly higher with PM than GM (*), except at 4 °C where the reverse was observed. After addition of pyruvate to GM and glutamate to PM, respiratory flux was not statistically different in the two protocols, which were combined (PMG; black bars; $N = 9-18$ experiments). Respiration with convergent electron flow through Complexes I+II was measured after addition of succinate (PMGS). The uncoupling effect by FCCP was very small between 40 and 25 °C and increased at 4 °C. Strong inhibition of Complex I by rotenone (succinate-supported respiration; S^{Rot}) indicated the additive effect of convergent electron flow through Complexes I+II. Results are expressed as mean \pm SD; not determined ND.

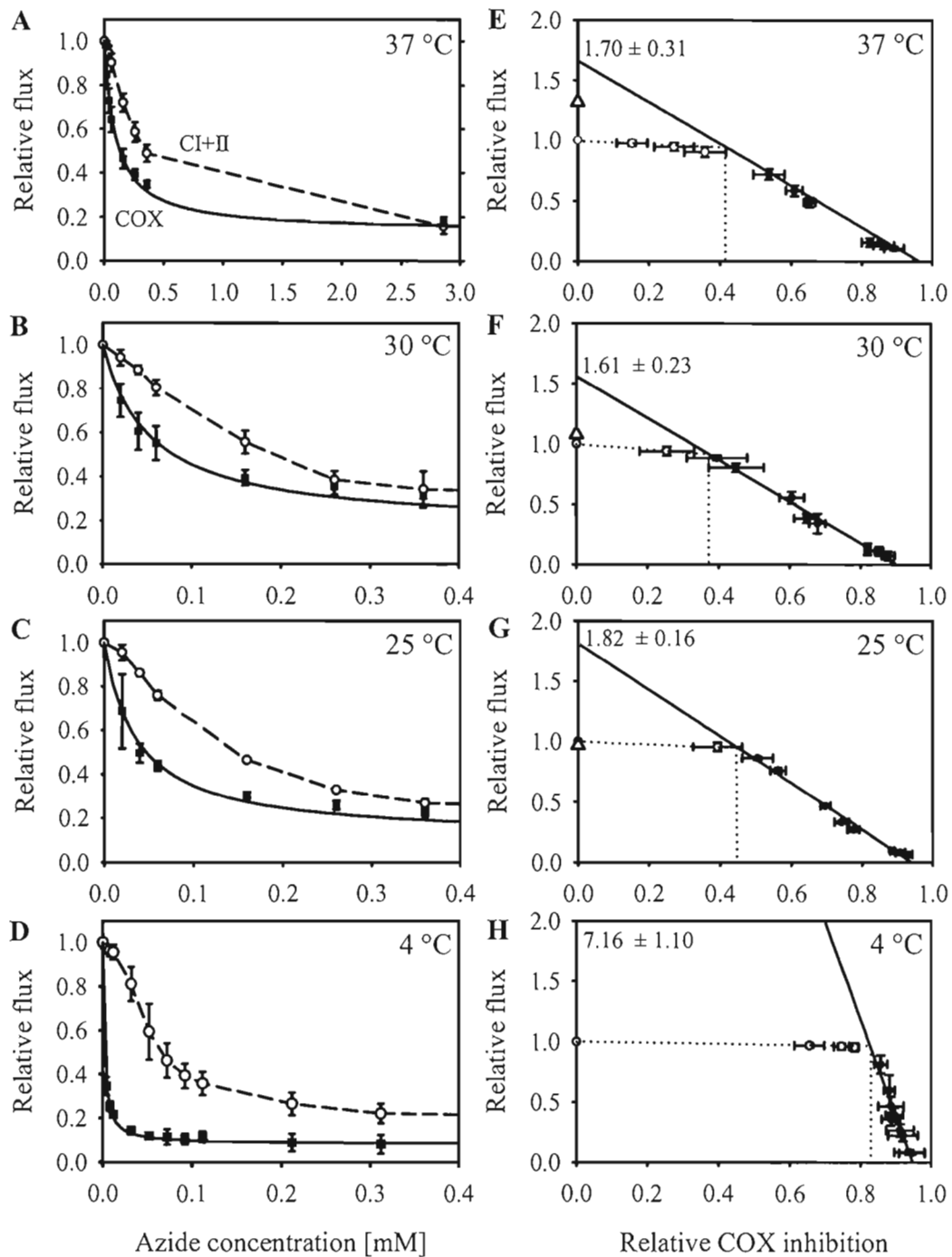


Figure 3.3: Azide titration and Complex IV threshold in permeabilized mouse heart fibers at different temperature.

Figure 3.3 (continuation) (A-D) The multiple substrate protocol was extended to the highest electron transport activity (Figure 3.1; pyruvate+malate+glutamate+succinate+cytochrome *c*+FCCP), followed by the azide titration of flux through the respiratory system (open symbols; dashed line: linear interpolations). Alternatively, the protocol was continued by inhibition of Complexes I, II and III (rotenone, malonate and antimycin a), stimulation of Complex IV activity by ascorbate (2 mM)+TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine; 0.5 mM), and azide titration of enzyme velocity using the same azide titration steps than for the respiratory system (filled symbols; solid line: hyperbolic fit). (E-H) Normalized electron transport fluxes as a function of CcOX inhibition by azide. Data points above the threshold are shown by open symbols. A linear regression was calculated through the data beyond the inflection point (closed symbols) and extrapolated to zero CcOX inhibition ($r^2 \geq 0.991$). The intercepts (1.70, 1.61, 1.82 and 7.16 at 37 °C, 30 °C, 25 °C and 4 °C, respectively) are the CcOX excess capacity. The triangle on the y axis shows the relative CcOX activity measured directly with TMPD and ascorbate (3.31 at 4 °C, not shown). The following steps of azide concentration were used (in mM): 0.02, 0.04, 0.06, 0.16, 0.26, 0.36, 2.86, 5.36, 10.36 between 25 and 40 °C, and 0.004, 0.008, 0.012, 0.032, 0.052, 0.072, 0.092, 0.112, 0.212, 0.312, 2.812, 5.312, 10.312 at 4 °C (azide concentrations not all shown). The threshold is the intercept between the linear regression and the extrapolated line drawn from the control to the first inhibited flux (dotted line). Results are expressed as means \pm SD (N = 4-5 experiments).

Table 3.1: Review of literature data on convergent electron input into the Q-cycle, in comparison with *in vivo* oxygen consumption in mammal muscle tissues.

Respiratory flux (JO_2) with Complexes I+II substrates (CI+II), and additive effect of succinate (succinate control ratio; SCR = JO_2 with substrates for CI+II / JO_2 with substrates for CI), in permeabilized muscle fibers (PF) and isolated mitochondria (Mito) at the experimental temperature (Exp. T). JO_2 fluxes and *in vivo* data are expressed as $\text{nmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ wet muscle weight at 37 °C. For comparison, *in vivo* data of respiration measured in mouse heart and human skeletal muscle are 0.7 (Boudina et al., 2005) and 0.29 (Rasmussen et al., 2001) $\text{nmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ wet muscle weight, respectively.

Tissue	Prep.	State CI+II	JO_2 37 °C ⁴	Exp. T [°C]	SCR ⁵ CI+II/CI	Reference
Mouse heart	PF	PMGS _c	1.05 ³	37	0.54	Present study
Mouse heart	PF	PMGS _c		30	0.63	Present study
Mouse heart	PF	PMGS _c		25	0.66	Present study
Rat heart	PF	PMGS _c	0.47 ³	37	0.54	Lemieux et al. unpubl.
Rat heart	Mito	GS ^{1,2}	0.36 ⁴	30	0.54	(Costa et al., 1988)
Rat quadriceps	Mito	GMS		30	0.81	(Garait et al., 2005)
Rat muscle	Mito	GS		30	0.78	(Llesuy et al., 1994)
Pigeon breast muscle	Mito	GS		25	0.51	(Rasmussen & Rasmussen, 1997)
Human V. lateralis	PF	GMS _c	0.09 ³	37	0.48	(Boushel et al., 2007)
Human V. lateralis	PF	GMS ¹	0.04 ⁴	25	0.73	(Kunz et al., 2000)
Human V. lateralis	Mito	GS ^{1,2}	0.11 ⁴	25	0.70	(Rasmussen et al., 2001)
Human V. lateralis	Mito	GMS	0.08	30	0.78	(Rasmussen et al., 2001)

Letters indicate the substrates and effectors present in the titration protocols: P, pyruvate; M, malate; G, glutamate; S, succinate; *c*, cytochrome *c*. ADP was present in all protocols. ¹Separate incubations were used for measurement of CI and CI+II. ²CI was measured with GM whereas M was not added in the measurement of CI+II. ³Oxygen limitation of flux was prevented by maintaining oxygen levels in the respirometer above air saturation. ⁴Data converted to 37 °C using experimental multiplication factors; 1.62 from 30 to 37 °C and 2.00 from 25 to 37 °C (Table 3.2, supporting information). ⁵SCR is calculated for Exp. T .

Table 3.2: Temperature multiplication factors and thermal sensitivities for mitochondrial respiratory fluxes in different metabolic states in permeabilized mouse heart fibers.

The multiplication factor is directly used to convert for the data from 25 to 37 °C or from 30 to 37 °C. The number indicated in parenthesis represents the Q_{10} value. Q_{10} are also presented for the range of temperature of 4 to 25 °C and 4 to 37 °C. Data are means of 4-16 experiments.

States	Multiplication factors (Q_{10})		Q_{10} From 4 to 25 °C (4 to 37 °C)
	From 25 to 37 °C	From 30 to 37 °C	
CcOX extrapolated	1.82 (1.65)	1.67 (2.09)	1.84 (1.77)
CcOX measured	1.96 (1.75)	1.53 (1.84)	2.29 (2.07)
PMGS _{c_u}	1.99 (1.78)	1.57 (1.90)	3.64 (2.80)
PMGS _c	2.00 (1.78)	1.62 (1.99)	4.05 (3.01)
PMGS _{c_u} (Rot)	2.16 (1.90)	1.62 (1.99)	-
PMG _c	1.65 (1.52)	1.42 (1.65)	4.01 (2.82)
PM _c	2.20 (1.93)	1.95 (2.59)	5.09 (3.58)
GM _c	1.35 (1.29)	1.39 (1.61)	2.64 (2.03)
PM	2.38 (2.06)	1.79 (2.30)	4.05 (3.17)
GM	1.48 (1.39)	1.54 (1.85)	2.49 (2.01)

Letters indicate the substrates, effectors and inhibitors present in the titration protocols: P, pyruvate; M, malate; G, glutamate; S, succinate; c, cytochrome *c*; and u, uncoupling with FCCP; Rot for rotenone. ADP was present in all protocols. Cytochrome *c* oxidase activity was measured with 2mM ascorbate and 500 μM TMPD (CcOX measured) or extrapolated from the measurement of apparent CcOX excess capacities and multiplying the pathway flux by this factor, yielding a measure of CcOX turnover as a function of temperature (CcOX extrapolated). Q_{10} values for mitochondrial functions were calculated according to the following formula: $Q_{10} = (\text{Rate } t_2 / \text{Rate } t_1) \exp(10 / (t_2 - t_1))$.

DISCUSSION

Mitochondrial respiration in the living cell is supported by electron supply from multiple NADH-related dehydrogenases and simultaneous electron entry through Complex I and succinate dehydrogenase (component of Complex II). This is not the case in permeabilized cells and tissues or isolated mitochondria unless complex combinations of mitochondrial substrates are provided for supporting the complete operation of the citric acid cycle. Convergent electron entries from multiple dehydrogenases into the Q-cycle exert an additive effect on mitochondrial respiratory capacity. Single substrates or simple substrate combinations, such as succinate (with rotenone), pyruvate+malate or glutamate+malate are applied for the bioenergetic analysis of specific linear segments of the electron transport system (Chance & Williams, 1955b; Lemasters, 1984; Lesnefsky & Hoppel, 2006). These analytical or diagnostic approaches require well-defined metabolic states without complex substrate combinations. Electron flow in ADP-activated states is limited under these conditions by dehydrogenases upstream, thus effectively under-utilizing the apparent excess capacity of respiratory complexes downstream. In the context of mitochondrial and integrative physiology, application of this bioenergetic approach leads to a significant underestimation of maximum OXPHOS capacity. Even with pyruvate+malate+glutamate, the succinate dehydrogenase is not activated and external succinate is required for supporting complete operation of the citric acid cycle. Coupled respiration is up to two-fold higher on the basis of convergent electron transport under physiological conditions *in vitro*, and *in vivo* (CI+II; Table 3.1).

The present results on mitochondrial respiration with Complexes I or Complex II substrate in permeabilized fibers of the mouse heart yield a slightly lower respiratory capacity compared to the *in vivo* maximal myocardial oxygen consumption (Boudina et al., 2005). With convergent electron input, however, mitochondrial respiratory capacity not only matches but is in excess of the maximal oxygen consumption of the working heart (Table 3.1). In dog heart, oxygen

consumption of the perfused heart and respiration of ADP-activated isolated mitochondria in the presence of Complex I substrates are similar (0.42 and 0.50 nmol $\text{O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ tissue wet weight, respectively; Mootha et al., 1997), and evaluation of the actual mitochondrial excess capacity requires studies with physiological substrate combinations. In mitochondria isolated from human skeletal muscle, ADP-activated respiration is lower with substrates feeding electrons into either Complex I or II, compared to the combination of succinate+glutamate (Rasmussen et al., 2001). Even convergent electron input in permeabilized fibers or isolated mitochondria (Table 3.1) is lower than maximum respiration of human skeletal muscle *in vivo* (Rasmussen et al., 2001). This is not likely due to limiting concentrations of TCA cycle intermediates (Gibala et al., 1998; Dawson et al., 2005). Further support for the physiological importance of complex substrate combinations is derived from studies with cultured cells. In an osteoblastoma-derived human cell line (143B), respiration of permeabilized cells in State 3 in the presence of glutamate+malate is lower than oxygen consumption of intact coupled cells with endogenous substrates (Villani & Attardi, 1997). This is significant, since intact cells may not even be fully activated to the level of State 3. Addition of succinate+glycerol-3-phosphate to malate+glutamate increased State 3 respiration 1.6-fold in permeabilized cells, reaching a level that was above the coupled rate measured *in vivo*. Taken together, these comparisons of O_2 consumption measured in permeabilized tissues and cells or isolated mitochondria with *in vivo* data demonstrate the physiological significance of the high rates of OXPHOS obtained with complex substrate combinations which support convergent electron transport at the Q-junction.

No consensus has been reached to apply a standard physiological temperature for clinical diagnosis of mitochondrial dysfunction and for facilitating quantitative comparison of mitochondrial respiration in permeabilized fibers or isolated mitochondria. Most studies are performed at 25 °C or 30 °C (see ref. N'Guessan et al., 2004), and few results are available at 37 °C (Rustin et al., 1994; Mootha et al., 1997;

Barrientos, 2002; Boushel et al., 2007). It cannot be assumed that mitochondrial respiration rates in various states change with temperature by a constant factor. Such a factor of approximately 2.3 is frequently applied for a temperature correction from 25 °C to 37 °C (corresponding to a Q_{10} of 2.0; Byrne & Trounce, 1985). Our results, however, reflect the non-uniform temperature coefficients for the many different enzyme-catalyzed reactions involved in the mitochondrial respiratory pathways. Respiration of mouse heart fibers with pyruvate+malate decreased by a factor of 2.4 in State 3, but only by 2.0-fold in State 2. The RCR, therefore, decreased from 6.5 to 5.3, declining further to 1.9 at 4 °C. The succinate control ratio in State 3 (SCR, succinate added to pyruvate+malate+glutamate) decreased with temperature from 1.9 to 1.5 (37 °C to 25 °C; Tab. 1). In human skeletal muscle mitochondria, the SCR is 1.4 at 25 °C (Tab. 2). Whereas succinate stimulates respiration, the rate of ATP synthesis does not change due to the lower P/O ratio for electron transport from succinate compared to electron flow from NADH, with two and three coupling sites, respectively (Rasmussen & Rasmussen, 2000). The higher SCR of 2.1 at 37 °C (Table 3.2), however, indicates a significant stimulation of ATP production by convergent electron input (Footnote y). In general, selection of non-physiological temperatures does not simply involve proportional changes of rates, but implies a shift in ratios and metabolic flux control by various enzyme systems.

The apparent excess capacity of CcOX relative to integrated electron transport capacity needs to be evaluated under conditions of maximum pathway flux. Complexes III and IV catalyze the combined electron flows converging from Complexes I and II (and ETF, GpDH) at coenzyme Q. Separation of partially parallel electron flow even downstream of the Q-cycle would be maintained through supercomplexes that restrict free exchange of electrons (Complexes I+III, Bianchi et al., 2004); and possibly I+III+IV (Schagger & Pfeiffer, 2001). From the perspective of economical pathway design, the respiratory complexes catalyzing the flux downstream of the Q-junction are expected to be in excess compared to pathway flux

supported separately by electron entry through either Complex I or II. This provides a rationale for explaining the high apparent CcOX excess capacities in rat heart (2.0- to 3.0-fold; Gnaiger et al., 1998a; Rossignol et al., 1999), and rat or human skeletal muscles (2.3-3.0-fold; Rossignol et al., 1999; Kunz et al., 2000) when providing substrates for Complex I only. The excess capacity declines to 1.4-fold when providing Complex I+II substrates in permeabilized fibers from human skeletal muscle (Kunz et al., 2000). Similarly, a low apparent CcOX excess is observed in the presence of endogenous substrates in human cells measured in the uncoupled state (1.2 to 1.4-fold; Villani & Attardi, 1997; Villani et al., 1998). The apparent CcOX excess capacity measured in mouse heart was 1.7-fold, even with high electron flow by multiple substrate supply.

When measurements on excess capacity of electron transport complexes are performed in the coupled state, limitation of OXPHOS capacity by the phosphorylation system requires consideration. In human skeletal muscle, the phosphorylation system limits respiration supported by the Complexes I+II substrate combination (UCR of 1.44, Rasmussen & Rasmussen, 2000; and 1.27, Boushel et al., 2007) and a limiting effect is maintained even at lower flux with Complex I substrates only (UCR of 1.25; Rasmussen & Rasmussen, 2000). In such phosphorylation-limited mitochondria, the capacity of electron transport exceeds that of OXPHOS, and limitation by the phosphorylation system contributes to the apparent excess capacity of CcOX in the coupled state. This problem does not occur in oxidation-limited mitochondria such as in mouse heart, where uncoupling did not stimulate State 3 respiration with convergence of electrons from Complexes I+II, and the apparent CcOX excess capacity should be identical for electron transport and coupled OXPHOS (cf. ref Piccoli et al., 2006).

Our results clearly demonstrate that the estimation of maximal respiratory capacity in physiological conditions should be measured at physiological temperature

with substrate combinations appropriate for a complete operation of the citric acid cycle and multiple entries of electrons at the Q-cycle. The reference state of maximum coupled respiration established in such conditions provide the proper basis for quantifying excess capacities and interpreting excess capacity of various enzymes such as CcOX and components such as the phosphorylation system. By reaching the maximal respiratory capacity, the reference state used tends to lower the estimation of CcOX excess. Any trend toward a lowering of CcOX excess can explain the pathological effect of genetic mutations and acquired CcOX deficiencies. Further studies need to be conducted to check whether the other entry of electron at the Q-cycle (ETF, GpDH) may contribute to increase of the flux.

ACKNOWLEDGMENTS

H.Lemieux received scholarship from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and from «Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies. We would like to thank Assegid Garedew for his participation in high-resolution respirometry analyses, Thomas Schachner and Philip for their help in heart dissection, Miki for CS analysis...

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce projet de doctorat était d'étudier les effets de la température sur le métabolisme mitochondrial. Malgré le fait que les mammifères régulent en général leur température corporelle, ils n'en constituent pas moins de bons modèles d'étude puisque leurs mitochondries sont très sensibles aux variations thermiques. Il est surprenant que dans le passé, aussi peu d'études se soient servi des mammifères pour tenter de mieux comprendre ce qui limite la respiration mitochondriale à basse température. La réponse à cette question pourrait permettre d'identifier les réactions qui ont eu à s'ajuster chez les organismes ectothermes faisant face à des environnements thermiques extrêmes. De plus, en utilisant des organismes endothermes, l'objectif fondamental peut être étendu à des applications biomédicales intéressantes telles que l'effet de la température de mesure pour la détection des anomalies mitochondriales et l'impact des situations cliniques impliquant l'hypothermie et l'hyperthermie sur les fonctions mitochondriales.

LA PDH ET LA TEMPÉRATURE CHEZ LE RAT

Une des découvertes importantes de ce projet est la mise en évidence de l'importance de la PDH pour la détermination de la thermosensibilité de la respiration mitochondriale dans le cœur des mammifères. Dans les mitochondries isolées du cœur de rat (Chapitres I et II) ainsi que dans les fibres cardiaques perméabilisées de souris (Chapitre III), la respiration supportée par le malate et le pyruvate présente une thermosensibilité très élevée. La mesure du Q_{10} détermine de combien de fois la fonction physiologique est réduite suite à un abaissement de la température de 10 °C. Le taux de respiration des mitochondries cardiaques de mammifères (avec le malate et le pyruvate) diminue de presque 5 fois lorsque la température passe de 15 à 5 °C (Tableau 4.1). À l'intérieur de la gamme de température corporelle rencontrée pour une espèce, la plupart des fonctions physiologiques sont réduites d'environ 2 fois ou

légèrement plus pour chaque tranche de température de 10 °C (Hochachka & Somero, 2002), comme c'est le cas chez le loup Atlantique (Tableau 4.1).

Pour tenter de comprendre ce qui limite la respiration mitochondriale à basse température dans le cœur des mammifères, nous avons donc mis en parallèle la sensibilité thermique de la respiration mitochondriale avec la thermosensibilité des différentes étapes impliquées dans celle-ci dans le cœur de rat et de loup Atlantique (Chapitre II). L'activité des Complexes I, II, III et IV de la CTE, de l'ATPase ou des enzymes du cycle de l'acide citrique (CS, isocitrate déshydrogénase) présentent des valeurs de thermosensibilité normales (Q_{10} entre 1.5 et 3.2) dans les mitochondries cardiaques de mammifères à basse température (Tableau 4.1). Il est donc peu probable que ces fonctions puissent avoir un effet limitant sur la respiration mitochondriale dans des conditions hypothermiques sévères. Notre étude fait clairement ressortir une corrélation parfaite entre la thermosensibilité de la respiration mitochondriale supportée par le malate et le pyruvate et la thermosensibilité de la PDH. En étudiant diverses réactions impliquées dans la respiration mitochondriale, notre étude exclut la possibilité que d'autres fonctions, parmi celles mesurées, aient un impact similaire sur la thermosensibilité de cette voie.

Tableau 4.1 : Résumé de la thermosensibilité (exprimée par le Q_{10} ¹) des différentes fonctions mitochondriales en condition hypothermiques chez les mammifères (souris et rat) et chez un poisson d'eau froide, le loup Atlantique (*Anarhichas lupus*).

	Souris ² 4-25 °C	Rat ³ 5-20 °C	Rat ⁴ 5-15 °C	<i>A. lupus</i> ⁴ 5-15 °C
Respiration mitochondriale				
Malate+Pyruvate	4.05	4.49±0.44	4.94±0.34	2.52±0.20
Malate+Glutamate	2.49	-	-	-
Malate+Pyruvate+Glutamate	4.01	-	-	-
Malate+Pyruvate+Glutamate+Succinate	4.05	-	-	-
Succinate/roténone	-	4.99±0.55	-	-
TMPD+Ascorbate	2.29	2.32±0.13	-	-
Avant le cycle de l'acide citrique				
Pyruvate déshydrogénase	-	-	4.66±0.27	1.69±0.27
Cycle de l'acide citrique				
Citrate synthase	-	1.63±0.07	1.57±0.06	1.32±0.05
Isocitrate déshydrogénase	-	2.57±0.25 ⁴	-	-
Complexes (membranes brisées)				
Complexe I	-	-	2.55±0.15	1.55±0.14
Complexe II	-	-	3.25±0.20	2.07±0.26
Complexe III	-	-	1.70±0.36	1.47±0.17
Complexe IV	-	-	1.79±0.18	2.33±0.62
ATPase	-	-	3.23±0.31	1.69±0.11

¹ $Q_{10} = (\text{Taux temps 2} / \text{Taux temps 1}) \exp(10 / (\text{temps 2} - \text{temps 1}))$

² Données du Chapitre III

³ Données du Chapitre I

⁴ Données du Chapitre II

⁵ Données non présentées dans les chapitres précédents

Plusieurs études ont démontré le rôle central de la PDH dans la régulation du taux d'oxydation des glucides par la mitochondrie. Cette enzyme existe en une forme active et une forme inactive, qui sont interconvertibles par phosphorylation et déphosphorylation. Le passage de la forme phosphorylée à la forme déphosphorylée, ou le contraire, peut être obtenu de différentes façons. Les multiples produits agissant sur cette enzyme permettent une régulation serrée du métabolisme du glucose dans le

cœur selon les conditions rencontrées par le tissu (Neely & Morgan, 1974; Randle, 1986; Stanley et al., 1997). Par exemple l'activité de la PDH est inhibée dans le cœur et le muscle squelettique durant le jeûne et la déficience à l'insuline de façon à conserver le glucose pour le cerveau et d'autres cellules qui dépendent de ce substrat pour leurs fonctions (Randle et al., 1994; Sugden et al., 2000). De plus, il y a de plus en plus d'évidence que l'activation de la PDH améliore la récupération cardiaque après un épisode ischémique (Kobayashi & Neely, 1983; McVeigh & Lopaschuk, 1990; Lewandowski & White, 1995; Veitch et al., 1995; Wahr et al., 1996; Terrand et al., 2001). Ceci n'est pas surprenant puisque l'oxydation du glucose nécessite moins d'oxygène par mole d'ATP générée et est donc préférable aux acides gras quand la disponibilité de l'oxygène est réduite (McCarty, 2004).

Il y a aussi une corrélation forte entre la diminution du taux métabolique durant l'hibernation chez les mammifères et la diminution de l'activité de la PDH (Brooks & Storey, 1992). Bien qu'il soit généralement reconnu que la diminution du taux métabolique n'est pas provoqué par la réduction de la température corporelle (Geiser, 1988), il est possible que la PDH ait un rôle à jouer pour maintenir le taux métabolique bas. La diminution du métabolisme des glucides par la régulation de la PDH permet aussi de retenir les réserves de glycogène en favorisant l'utilisation des acides gras ou de limiter l'accumulation des produits toxiques, ce qui est crucial pour la survie à long terme dans un état hypo métabolique (Brooks & Storey, 1992).

La PDH assure l'apport d'électrons au STE sous forme de NADH. Dans la voie globale du métabolisme, si les réactions en amont de la PDH sont en excès, la faible activité de la PDH peut être une façon d'assurer une concentration stable et faible de radicaux libres en gardant le ratio NADH/NAD faible et le pool d'ubiquinone relativement oxydé. L'avantage de la réduction de production des radicaux libres pour le rat à sa température physiologique est facile à comprendre mais on peut se demander quel serait l'intérêt à basse température. Cependant, si on considère le fait

que l'habilité à hiberner implique des gènes présents chez tous les mammifères (Carey et al., 2003), le rat devrait avoir gardé l'opportunité de lutter contre les radicaux libres à basse température même s'il n'utilise pas sa capacité d'hiberner.

Une autre indication d'un contrôle de la thermosensibilité de la respiration mitochondriale par des fonctions situées avant l'entrée des électrons dans le STE est la différence de thermosensibilité de la respiration mitochondriale dans les fibres cardiaques de souris avec le malate et le glutamate (2.49) ou avec le malate et le pyruvate (4.05). Ces deux combinaisons de substrats sont d'abord transformées en équivalents réduits dans le cycle de l'acide citrique et entrent ensuite dans le STE par le Complexe I, sont transférés à la jonction Q, puis au Complexes III et enfin IV. Les Complexes I, III et IV présentent des Q_{10} s qui s'apparentent à ceux de la respiration avec le malate et le glutamate (Tableau 4.1). La PDH, qui présente un Q_{10} similaire à la respiration avec le malate et le pyruvate, n'est pas impliquée dans la respiration avec le malate et le glutamate. Les résultats obtenus dans le muscle cardiaque de souris renforcent donc l'importance de la PDH dans la thermosensibilité de la respiration mitochondriale lorsque le pyruvate est présent comme substrat. De plus, cette différence de thermosensibilité de la respiration mitochondriale avec deux substrats qui fournissent en électron le Complexe I de la CTE prouve que les Complexes I, III et IV ne sont pas responsables de la réduction importante du taux de respiration à basse température.

LA PDH ET LA TEMPÉRATURE : COMPARAISON DE DEUX ESPÈCES

Chez le loup Atlantique, une espèce qui doit faire face à des variations importantes de température corporelles et qui peut vivre à des températures aussi basses que 0 °C (Moksness & Pavlov, 1996), la PDH a subi des modifications

quantitatives et qualitatives pour maintenir un métabolisme mitochondrial cardiaque suffisamment élevé à basse température. Comme démontré dans le Chapitre II, l'activité de la PDH est nettement plus élevée dans les mitochondries cardiaques de loup Atlantique comparé au rat alors que les autres fonctions mitochondriales mesurées (Complexes I à IV de la CTE, ATPase et CS) sont soit similaires chez les deux espèces ou supérieures chez le rat.

La plupart des études comparant des organismes adaptés à des températures corporelles froides et des mammifères ou des organismes ectothermes conservant une température corporelle chaude ont démontré que, à leurs températures corporelles respectives, les fonctions physiologiques des espèces adaptées au froid sont plus faibles que celle chez les organismes adaptés au chaud. Par exemple, l'activité de la CS d'un poisson Antarctique mesurée à 0 °C est environ la moitié de celle d'un poisson tropical à 25 °C (Kawall et al., 2002). Il est généralement accepté que la vie à basse température réduit les coûts métaboliques (ex. le gradient d'ions transmembranaire, le renouvellement des protéines grâce à une augmentation de la durée de vie des protéines) et que l'évolution pourrait avoir favorisé la sauvegarde d'énergie au lieu d'une activité enzymatique élevée au froid (Hochachka & Somero, 2002). Dans ce cas, l'activité des fonctions mitochondriales chez le loup à sa température d'habitat normale devrait être beaucoup plus faible que chez le rat à 35 °C. C'est en effet le cas pour les Complexes I à IV, l'ATPase et la CS pour lesquelles l'activité à 15 °C chez le loup est entre 2.9 et 4.7 fois plus faible que l'activité à 35 °C chez le rat. Une température de 15 °C a été choisie comme point de comparaison parce que cette température est la plus rapprochée de l'optimum de température pour la croissance des juvéniles (11 °C) et que cette température se situe à l'intérieur de la fenêtre thermique de l'espèce (McCarthy et al., 1998). Cette règle ne s'applique cependant pas à l'activité de la PDH qui est similaire chez les deux espèces soit 0.182 ± 0.022 U.mg protéines⁻¹ chez le rat à 35 °C et 0.172 ± 0.002 U.mg protéines⁻¹ chez le loup à 15 °C (Chapitre II).

Nos données suggèrent que l'évolution dans des environnements froids ne favorise pas nécessairement une réduction des capacités mitochondriales, au moins pour le système de transport des électrons dans le muscle cardiaque. Par contre, elle peut cibler une augmentation d'enzymes qui ont une grande influence sur la sensibilité thermique de la voie métabolique. Chez le loup Atlantique, par exemple, l'adaptation au froid semble avoir favorisé non seulement l'augmentation de l'activité de la PDH mais aussi la réduction de sa thermosensibilité. Le tableau 4.1 illustre bien cette affirmation en montrant que lorsque la température est réduite de 15 à 5 °C, l'activité de la PDH diminue de 4.66 fois dans le cœur de rat alors qu'elle diminue seulement de 1.69 fois dans le cœur de loup Atlantique. Une étude comparative incluant un plus grand nombre d'espèces est cependant nécessaire pour déterminer l'impact de ces changements sur la capacité des mitochondries à opérer efficacement à basse température.

AUTRES ÉTAPES CRITIQUES À BASSE TEMPÉRATURE

Il incombe aussi de mentionner que d'autres étapes impliquées dans le métabolisme mitochondrial peuvent être limitantes à basse température. Les résultats du Chapitre III dans le cœur de souris ainsi que des données déjà présentées sur le foie de rat (Quentin et al., 1994; Dufour et al., 1996) démontrent que le système de phosphorylation commence à exercer une limitation sur la respiration mitochondriale à basses températures. De plus, la respiration mitochondriale supportée par le succinate présente une thermosensibilité qui s'apparente à la thermosensibilité de la respiration avec le malate et le pyruvate (Q_{10} de 5; Tableau 4.1). Cette thermosensibilité ne peut apparemment pas s'expliquer par une baisse d'activité du Complexe II qui présente un Q_{10} de 3.25 ou par la thermosensibilité de la PDH qui n'est pas impliquée dans la respiration avec le succinate. Le transport du succinate pourrait dans ce cas être responsable de la limitation à basse température.

La réduction importante de la respiration mitochondriale supportée par le malate et le pyruvate ou par le succinate /roténone à basse température explique aussi que la combinaison de substrats (malate+ glutamate+pyruvate+succinate) présente aussi un Q_{10} élevé (4.05 ; Tableau 4.1). Des études supplémentaires sont nécessaires pour bien comprendre ce qui limite la respiration avec le succinate/roténone à basse température chez les mammifères. De plus, pour prouver que la corrélation entre la thermosensibilité de la PDH et celle de la respiration mitochondriale n'est pas un hasard, il y a possibilité d'utiliser un activateur de la PDH (le dichloroacétate) et de mesurer l'effet sur le taux de respiration à basse température.

MEMBRANES ET THERMOSENSIBILITÉ DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE

L'implication de la PDH dans la thermosensibilité de la respiration mitochondriale va à l'encontre d'une croyance largement répandue en biologie comparative. Chez les organismes ectothermes qui s'adaptent ou s'acclimatent à basse température, il y a augmentation de l'insaturation des acides gras au niveau des membranes cellulaires et mitochondriales. Selon la plupart des études, ces modifications permettent de préserver la fluidité membranaire et les propriétés fonctionnelles des enzymes enlisées dans la membrane à basse température (Dahlhoff & Somero, 1993). Par contre, si la thermosensibilité de la respiration mitochondriale est contrôlée par des fonctions enzymatiques qui ne sont pas associées à la membrane, tel que la PDH, elle ne peut être influencée directement par la fluidité de la membrane. Cela expliquerait pourquoi à la suite d'importants changements de composition en acides gras des membranes mitochondriales cardiaques de rat, nous n'ayons pas décelé de changements au niveau de la respiration mitochondriale ou de sa thermosensibilité (Chapitre I).

MEMBRANES ET STRESS OXYDANT

Les mêmes modifications des membranes semblent cependant suffisantes pour augmenter de façon importante la susceptibilité au stress oxydatif. Puisque la plupart des radicaux libres sont générés durant les processus oxydatifs qui se produisent dans les mitochondries, les membranes de cet organe subissent un risque accru de faire face à des dommages et ce particulièrement dans les tissus hautement oxydatifs comme les ventricules cardiaques (Lee et al., 1999). L'exposition à long terme à l'attaque des radicaux libres entraîne des mutations (Munscher et al., 1993) et des délétions (Simonetti et al., 1992) aléatoires de l'ADN nucléaire et mitochondrial qui sont responsables du vieillissement (Huertas et al., 1999). L'insaturation des membranes biologiques est reconnue pour augmenter la susceptibilité des lipides membranaires à la peroxydation par les radicaux libres (Pamplona et al., 2000).

Nos résultats démontrent en effet une augmentation de la quantité de malondialdéhyde (MDA), un produit de la peroxydation des lipides, dans les mitochondries cardiaques des rats qui ont été nourris à l'huile de poisson (Figure 4.1). La peroxydation lipidique peut être réduite significativement grâce à l'addition d'un antioxydant liposoluble dans l'alimentation, le probucol. Le niveau de peroxydation obtenu grâce au probucol additionné à l'huile de poisson est similaire à celui obtenu avec une huile monoinsaturée (l'huile d'olive) mais est toujours supérieur à celui obtenu avec une huile riche en acide gras saturés (huile de noix de coco; Figure 4.1). Les rats nourris à l'huile de noix de coco présentent aussi un niveau d'oxydation des protéines inférieur à celui des 3 autres groupes (Figure 4.2).

Les résultats obtenus ici (Figures 4.1 et 4.2) ne peuvent cependant pas être expliqués uniquement par des différences de saturation des acides gras dans les membranes, puisque les mitochondries cardiaques des rats nourris à l'huile de noix de coco et à l'huile d'olive présentent pratiquement le même profil d'acides gras dans leurs membranes (Chapitre I) mais la protection contre l'oxydation des

macromolécules associée à l'huile de noix de coco est nettement supérieure à celle de l'huile d'olive. L'huile d'olive est pourtant reconnue comme offrant une protection très élevée des membranes mitochondriales contre les dommages causés par le stress oxydatif (Giron et al., 1990; Huertas et al., 1991; Huertas et al., 1992; Quiles et al., 1994; Mataix et al., 1998; Quiles et al., 1999; Ochoa-Herrera et al., 2001) particulièrement dans les tissus post-mitotiques tel que le cœur (Ochoa et al., 2003). L'efficacité de l'huile de noix de coco pour protéger contre le stress oxydant laisse supposer qu'elle contient des ingrédients qui agissent autrement qu'en modifiant la composition en acides gras des membranes, comme par exemple des antioxydants.

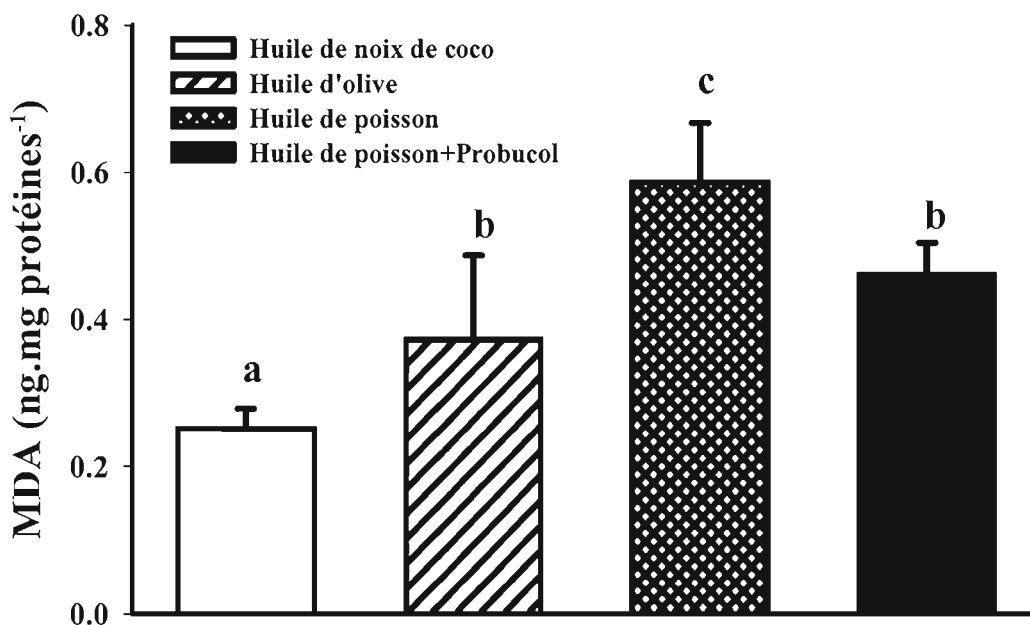


Figure 4.1 : Évaluation de la quantité de lipides peroxydés dans les mitochondries cardiaques de rats nourris avec différents types d'aliments formulés.

Les rats ont été nourris pendant 16 semaines avec des aliments variant par leur type d'huile et leur contenu en antioxydant (voir Chapitre I). La quantité de malondialdéhyde (MDA), un produit de la peroxydation des lipides, a été détectée dans les mitochondries cardiaques isolées grâce à la méthode des «thiobarbituric acid reactive substances» (TBARS) (Armstrong & Browne, 1994; Lefevre, 1998; Yagi, 1998) en utilisant le protocole et les produits de ZeptoMetrix Corporation (New York, USA, TBARS assay kit, ZMC numéro de Catalogue 0801192). Chaque colonne représente la moyenne et l'écart type de 6 échantillons de mitochondries cardiaques provenant de 6 rats. Les colonnes avec des lettres différentes présentent des différences significatives. Selon les données de Blier et al. (2006b); Lemieux H, Bulteau AL, Tardif J-C, Friguet B, Blier PU, En préparation).

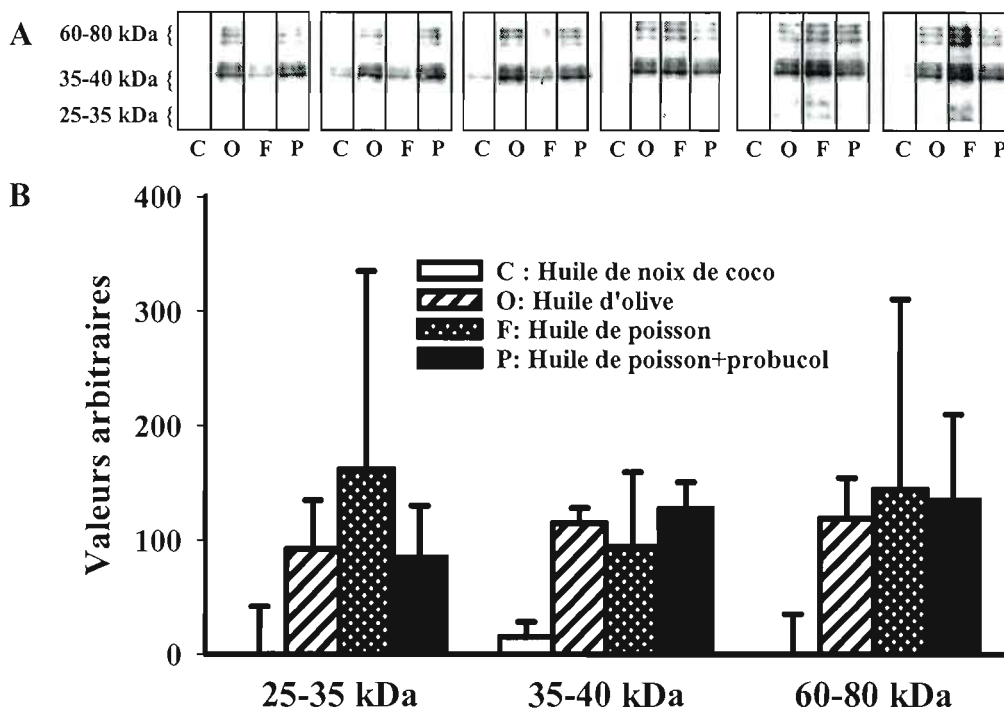


Figure 4.2 : Évaluation de la quantité de protéines carbonylées dans les mitochondries cardiaques des rats nourris avec différents types d'aliments formulés

Les rats ont été nourris pendant 16 semaines avec des aliments variant par leur type d'huile et leur contenu en antioxydant (voir Chapitre I). Les protéines carbonylées ont été analysées grâce à la méthode "Oxyblot Detection Kit" (Intergen). La quantité de protéines dans les échantillons de mitochondries a été déterminée grâce à la méthode de l'acide bicinonique (Sigma). Un échantillon contenant 10 µg de protéines mitochondriales a été traité avec une solution de 2,4-dinitrophenylhydrazine (10 mM dans du HCl 2 M), incubé à la température de la pièce et neutralisé. Les protéines dérivatisées ont été séparées par SDS/PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été saturées avec une solution tampon (contenant 1% de protéines bovines) pendant une nuit à 4 °C, et ensuite lavées 4 fois 10 minutes avec un tampon NaCl/Pi contenant 0.2% de tween. Les membranes ont ensuite été incubées pendant 1 heure à la température de la pièce avec un anticorps de lapin (anti-2,4-dinitrophenol, dilué 1:150), lavées 3 fois, puis incubées 1 heure avec un anticorps de chèvre anti-lapin IgG (HRP-conjugué; dilué 1:300) avant le lavage final. Les protéines ont été révélées avec un réactif ECL (Amersham-Pharmacia Biotech). (A) Photo du gel et (B) valeurs arbitraires calculées. Chaque colonne représente la moyenne et l'écart type de 6 échantillons de mitochondries cardiaques provenant de 6 rats. Selon les données de Blier et al. (2006b); Lemieux H, Bulbeau AL, Tardif J-C, Friguet B, Blier PU, En préparation).

MEMBRANES ET ADAPTATION AU FROID

Les différences au niveau du stress oxydant associées aux changements de composition membranaires peuvent représenter un défi supplémentaire pour les organismes qui vivent dans des environnements froids. Leurs niveaux plus élevés d'insaturation des membranes cellulaires et mitochondriales les rends plus vulnérables au stress oxydant (Hebert, 1981; Clarke, 1987; Uemura & Steponkus, 1997). Alors comment ces espèces ectothermes de zones froides arrivent-elles à vivre plus longtemps que les espèces apparentés d'eaux plus chaudes? Il semble que les espèces évoluant dans des milieux polaires aient développés des moyens supplémentaires de lutter contre l'augmentation de susceptibilité aux radicaux libres, comme par exemple la séquestration d'antioxydants liposolubles (particulièrement la vitamine E; Giese et al., 2000) et l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes glutathione peroxidases, catalase et superoxide dismutase (Regoli et al., 1997).

Chez le loup Atlantique, une espèce très bien adaptée aux changements de température, la gestion du stress oxydant dans le muscle cardiaque est aussi compliquée par un niveau de couplage des mitochondries inhabituellement élevé. Chez cette espèce, le stade 3 de respiration mitochondriale démontre un taux très élevé malgré un stade 4 tellement bas qu'il est impossible de le mesurer à 5 et 15 °C. Le découplage de la respiration mitochondriale stimule la respiration sans conserver l'énergie avec comme avantage l'inhibition de la formation des radicaux libres par les mitochondries (Okuda et al., 1992; Korshunov et al., 1998; Casteilla et al., 2001), (Brand, 2000; Brookes, 2005) Les espèces vivant à basse température doivent donc trouver une balance entre l'économie d'énergie résultant du couplage et la diminution de la production des radicaux libres associée avec le découplage. Le haut niveau de couplage des mitochondries observé chez le loup pourrait donc être un phénomène exclusif au cœur, un tissu qui se montre plus résistant aux changements de composition membranaire à la suite de l'exposition d'un organisme ectotherme à des

températures froides (Trigari et al., 1992).

CHANGEMENTS DES PROPORTIONS DES DIFFÉRENTES ÉTAPES

Un autre aspect intéressant démontré par ce projet est la conservation de la plupart des ratios des fonctions mitochondriales par rapport à l'activité de la PDH ou du Complexe IV chez le loup par rapport au rat, particulièrement à la température physiologique. Ces données vont dans le sens de l'hypothèse de Gnaiger et al. (1998a) qui dit que les capacités des systèmes enzymatiques impliqués dans la respiration mitochondriale sont reliés en terme de ratios optimums, plutôt qu'en terme de niveaux similaires, de façon à rencontrer la demande de cinétique et thermodynamique spécifiques déterminé par l'environnement cellulaire. Toujours en faveur de cette hypothèse de conservation des ratios, une étude dans le muscle rouge de truite arc-en-ciel (Blier & Lemieux, 2001) a démontré que l'excès de CcOX est conservé dans toute la gamme de températures rencontrées par cette espèce.

Ces données suggèrent la présence d'un équilibre dans le STE et laisse supposer que les excès des capacités catalytiques de certaines étapes sont nécessaires pour assurer les fonctions normales du système de transport des électrons. Chez la souris aussi, l'excès de CcOX est conservé entre 25 et 37 °C, du moins dans les conditions complexes incluant des substrats préférés à haute et à basse températures. Par contre, lorsque les fibres cardiaques de souris sont placées en conditions d'hypothermie sévère (4 °C), l'excès passe de 1.7 fois à plus de 7 fois. Les conséquences de cet excès important sur les fonctions mitochondriales restent cependant à déterminer.

D'AUTRES QUESTIONS À SOULEVER

Ce projet fait ressortir plusieurs éléments importants concernant les effets de la température sur le métabolisme mitochondrial cardiaque. Il amène aussi beaucoup de nouvelles questions. La première implique l'addition d'acides gras dans les protocoles de détection des anomalies mitochondriales. C'est d'autant plus important dans le cœur, tissu dans lequel 70% de la production d'ATP vient du métabolisme des acides gras alors que seulement 30% est fourni par le glucose (Marín-García, 2005). Mais, il ne faut pas pour autant négliger l'utilisation de substrats dérivés du glucose puisqu'une augmentation significative de l'oxydation des glucides se produit dans le cœur dans des situations cliniques conduisant à l'ischémie cardiaque ou à l'hypertrophie (Marín-García, 2005), ou en réponse à une augmentation marquée de la contraction du muscle cardiaque (Goodwin & Taegtmeyer, 2000). Le défi consiste donc à parvenir à développer des protocoles encore plus complexes que celui utilisé dans le Chapitre III et à y inclure des acides gras, ajoutant une nouvelle possibilité de voie convergente d'arrivée d'électrons à la jonction Q via la β -oxydation des acides gras.

Les informations sur l'impact des acides gras comme substrat en combinaison avec des glucides est très limitée parce que les acides gras sont reconnus pour inhiber le Complexe I et donc, le développement de protocoles doit être fait méthodiquement en utilisant des titrations appropriées. Les acides gras sont aussi très importants pour la compréhension des effets de la température puisqu'il est connu qu'en période d'hibernation, les mammifères utilisent plutôt les lipides comme substrat pour maintenir les réserves de glycogène (Brooks & Storey, 1992).

Un autre aspect important dans l'évaluation des fonctions mitochondriales est la conservation du potentiel membranaire qui est essentielle pour permettre aux cellules cardiaques de performer et de survivre (Mathur et al., 2000). La mesure du potentiel membranaire en parallèle avec la mesure de la respiration mitochondriales dans

différentes conditions de substrats et de température permettra de mieux évaluer l'état physiologique des mitochondries. Des études démontrent en effet une dépolarisation des membranes en situation hyperthermique (White et al., 2007). Grâce au développement d'appareils de mesure avec des canaux multiples, il est maintenant possible de mieux évaluer les effets des hautes et des basses températures sur le métabolisme mitochondrial. Par exemple, entre 37 et 40 °C, la respiration atteint un plateau, indiquant que les mitochondries commencent à être affectées par la température élevée mais sans subir de conséquences sur leur capacité oxydative (Chapitre III). Cette stabilité est en accord avec les résultats de Sammut et al. (2001) qui ont exposé des rats à des températures corporelles supérieures à 40 °C pendant 25 minutes et n'ont observé aucun impact sur le stade 3 de respiration dans les mitochondries cardiaques. Mais qu'advient-il du potentiel membranaire dans ces conditions extrêmes alors que les ratios des différentes fonctions mitochondriales sont perturbés (Chapitre II)?

POUR CONCLURE

Notre étude ouvre aussi la porte à l'évaluation des capacités cinétiques et catalytiques de la PDH dans des études comparatives de performance mitochondriale. Considérant l'importance de la PDH dans la modulation de la respiration mitochondriale par la température, il est probable que les adaptations majeures à différents régimes thermiques aient été localisées avant l'entrée des électrons dans les Complexes I ou II. Cette découverte expliquerait le faible impact apparent de l'évolution de l'ADN mitochondrial sur la thermosensibilité des enzymes mitochondriales (Blier et al., 2006a) et la libération suggérée des peptides codés par l'ADN mitochondrial de la pression sélective imposée par l'habitat thermique (Blier et al., 2001). En d'autres mots, si pour s'adapter à différents régimes thermiques les

mitochondries doivent ajuster les propriétés fonctionnelles d'enzymes codées par le génome nucléaire tel que la PDH, les peptides codés par le génome mitochondrial échapperaient alors à l'obligation d'ajustement. Une étude comparative incluant plusieurs espèces adaptées à différentes conditions thermiques est maintenant nécessaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Abele, D., K. Heise, H.O. Portner & S. Puntarulo. 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol.* 205: 1831-1841.
- Abele, D. & S. Puntarulo. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 138: 405-415.
- Abuirmeileh, N.M. & C.E. Elson. 1980a. The influence of linoleic acid intake on electron transport system components. *Lipids* 15: 925-931.
- Abuirmeileh, N.M. & C.E. Elson. 1980b. The influence of linoleic acid intake on membrane-bound respiratory activities. *Lipids* 15: 918-924.
- Aloia, R.C. 1988. Lipid, fluidity, and functional studies of the membranes of hibernating animals. pp. 1-40. *In*: R.C. Aloia, C.C. Curtain & L.M. Gordon (ed.) *Physiological regulation of membrane fluidity*, Alan R. Liss, Inc., New York.
- Ames, B.N., M.K. Shigenaga & T.M. Hagen. 1995. Mitochondrial decay in aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1271: 165-170.
- Antunes, F., A. Boveris & E. Cadenas. 2004. On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101: 16774-16779.
- Armstrong, D. & R. Browne. 1994. The analysis of free radicals, lipid peroxidases, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Free Rad. Biol. Med.* 366: 43-58.
- Bakala, H., E. Delaval, M. Hamelin, J. Bismuth, C. Borot-Laloi, B. Corman & B. Friguet. 2003. Changes in rat liver mitochondria with aging - Lon protease-like activity and N-epsilon-carboxymethyllysine accumulation in the matrix. *Eur. J. Biochem.* 270: 2295-2302.
- Ballinger, S.W., J.M. Shoffner & D.C. Wallace. 1994. Mitochondrial myopathies - Genetic aspects. *Curr. Top. Bioenerget.* 17: 59-98.
- Barja, G. 1993. Oxygen radicals, a failure or a success of evolution. *Free Radic. Res. Commun.* 18: 63-70.

- Barja, G., S. Cadenas, C. Rojas, R. Perezcampo & M. Lopeztorres. 1994. Low mitochondrial free radical production per Unit O² consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Radic. Res.* 21: 317-327.
- Barrientos, A. 2002. In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods* 26: 307-316.
- Bay, D.C. & D.A. Court. 2002. Origami in the outer membrane: the transmembrane arrangement of mitochondrial porins. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* 80: 551-562.
- Beckman, K.B. & B.N. Ames. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78: 547-581.
- Bernardi, P., V. Petronilli, F. Di Lisa & M. Forte. 2001. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem. Sci.* 26: 112-117.
- Bernardier, C.D. 2001. Diabetes and nutrition: the mitochondrial part. *J. Nutr.* 131: 344S-353S.
- Berner, N.J. 1999. Oxygen consumption by mitochondria from an endotherm and an ectotherm. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 124: 25-31.
- Beyer, R.E. 1990. The participation of coenzyme-Q in free radical production and antioxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 8: 545-565.
- Bhagavan, N.V. 2002. *Medical biochemistry*. Harcourt/Academic Press, Burlington. 1016 pp.
- Bhatnagar, D. & P.N. Durrington. 2003. Omega-3 fatty acids: Their role in the prevention and treatment of atherosclerosis related risk factors and complications. *Int. J. Clin. Pract.* 57: 305-314.
- Bianchi, C., M.L. Genova, G.P. Castelli & G. Lenaz. 2004. The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly. Kinetic evidence using flux control analysis. *J. Biol. Chem.* 279: 36562-36569.
- Bigelow, W.G. 1984. *Cold hearts: The story of hypothermia and the pacemaker in heart surgery*. McClelland and Stewart, Toronto. 208 pp.
- Bigelow, W.G., J.C. Callaghan & J.A. Hopps. 1950. General hypothermia for experimental intracardiac surgery. *Ann. Surgery* 3: 531-539.

- Birch-Machin, M.A. & D.M. Turnbull. 2001. Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues. pp. 97-117 *Methods in Cell Biology*, Vol 65, Academic Press Inc., San Diego.
- Blier, P.U., S. Breton, V. Desrosiers & H. Lemieux. 2006a. Functional conservatism in mitochondrial evolution: Insight from hybridization of Arctic and Brook charrs. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 306B: 1-8.
- Blier, P.U., F. Dufresne & R.S. Burton. 2001. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends Genet.* 17: 400-406.
- Blier, P.U. & H.E. Guderley. 1993. Effects of pH and temperature on the kinetics of pyruvate oxidation by muscle mitochondria from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiol. Zool.* 66: 474-489.
- Blier, P.U. & H. Lemieux. 2001. The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. *J. Comp. Physiol. B-Biochem. Syst. Env. Physiol.* 171B: 247-253.
- Blier, P.U., H. Lemieux, A.-L. Bulteau, B. Friguet & J.-C. Tardif. 2006b. Does the fatty acid composition affect metabolic functions and oxidative stress status in rat heart mitochondria? *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 404.
- Bota, D.A., H. Van Remmen & K.J.A. Davies. 2002. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Lett.* 532: 103-106.
- Boudina, S., S. Sena, B.T. O'Neill, P. Tathireddy, M.E. Young & E.D. Abel. 2005. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* 112: 2686-2695.
- Boushel, R., E. Gnaiger, P. Schjerling, M. Skovbro, R. Kraunsoe & D. Flemming. 2007. Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* 50: 790-796.
- Bowler, M.W., M.G. Montgomery, A.G.W. Leslie & J.E. Walker. 2006. How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 8646-8649.
- Brand, M.D. 2000. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* 35: 811-820.

- Brand, M.D., L.F. Chien, E.K. Ainscow, D.F. Rolfe & R.K. Porter. 1994a. The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim. Biophys. Acta* 1187: 132-139.
- Brand, M.D., P. Couture, P.L. Else, K.W. Withers & A.J. Hulbert. 1991. Evolution of energy-metabolism - proton permeability of the inner membrane of liver-mitochondria is greater in a mammal than in a reptile. *Biochem. J.* 275: 81-86.
- Brand, M.D., P. Couture & A.J. Hulbert. 1994b. Liposomes from mammalian liver mitochondria are more polyunsaturated and leakier to protons than those from reptiles. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 108: 181-188.
- Brand, M.D., J.L. Pakay, A. Ocloo, J. Kokoszka, D.C. Wallace, P.S. Brookes & E.J. Cornwall. 2005. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem. J.* 392: 353-362.
- Brandt, U. & B. Trumpower. 1994. The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 29: 165-197.
- Brookes, P.S. 2005. Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple. *Free Rad. Biol. Med.* 38: 12-23.
- Brookes, P.S., J.A. Buckingham, A.M. Tenreiro, A.J. Hulbert & M.D. Brand. 1998. The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 119B: 325-334.
- Brookes, P.S., D.F.S. Rolfe & M.D. Brand. 1997. The proton permeability of liposomes made from mitochondrial inner membrane phospholipids: Comparison with isolated mitochondria. *J. Membr. Biol.* 155: 167-174.
- Brooks, S.P.J. & K.B. Storey. 1992. Mechanisms of glycolytic control during hibernation in the ground squirrel *Spermophilus lateralis*. *J. Comp. Physiol. B* 162: 23-28.
- Byrne, E. & I. Trounce. 1985. Oxygen electrode studies with human skeletal muscle mitochondria in vitro. A re-appraisal. *J. Neurol. Sci.* 69: 319-333.
- Cairns, C.B., J. Walther, A.H. Harken & A. Banerjee. 1998. Mitochondrial oxidative phosphorylation thermodynamic efficiencies reflect physiological organ roles. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 43: R1376-R1383.

- Caldwell, R.S. & F.J. Vernberg. 1970. The influence of acclimation temperature on the lipid composition of fish gill mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol.* 34: 179-191.
- Camara, A.K.S., M.L. Riess, L.G. Kevin, E. Novalija & D.F. Stowe. 2004. Hypothermia augments reactive oxygen species detected in the guinea pig isolated perfused heart. *Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol.* 286: H1289-H1299.
- Cannon, B., I.G. Shabalina, T.V. Kramarova, N. Petrovic & J. Nedergaard. 2006. Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species--or not? *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 449-458.
- Capel, F., V. Rimbart, D. Lioger, A. Diot, P. Rousset, P.P. Mirand, Y. Boirie, B. Morio & L. Mosoni. 2005. Due to reverse electron transfer, mitochondrial H₂O₂ release increases with age in human vastus lateralis muscle although oxidative capacity is preserved. *Mech. Ageing Dev.* 126: 505-511.
- Carey, H.V., M.T. Andrews & S.L. Martin. 2003. Mammalian hibernation: Cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol. Rev.* 83: 1153-1181.
- Casteilla, L., M. Rigoulet & L. Penicaud. 2001. Mitochondrial ROS metabolism: Modulation by uncoupling proteins. *IUBMB Life* 52: 181-188.
- Chamberlin, M.E. 2004. Top-down control analysis of the effect of temperature on ectotherm oxidative phosphorylation. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: R794-R800.
- Chance, B. & G.R. Williams. 1955a. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* 217: 383-93.
- Chance, B. & G.R. Williams. 1955b. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. IV. The respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 217: 429-38.
- Chance, B. & G.R. Williams. 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.* 17: 65-134.
- Chen, Y., J.T. Saari & Y.J. Kang. 1994. Weak antioxidant defenses make the heart a target for damage in copper-deficient rats. *Free Radic. Biol. Med.* 17: 529-536.
- Chien, K.R. 2000. Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases. *Nature* 407: 227-232.

- Chinnery, P.F. & D.M. Turnbull. 1997. Clinical features, investigation, and management of patients with defects of mitochondrial DNA. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 63: 559-563.
- Chretien, D., A. Slama, J.J. Briere, A. Munnich, A. Rotig & P. Rustin. 2004. Revisiting pitfalls, problems and tentative solutions for assaying mitochondrial respiratory chain complex III in human samples. *Curr. Med. Chem.* 11: 233-239.
- Churchill, E.N., C.L. Murriel, C.H. Chen, D. Mochly-Rosen & L.I. Szweda. 2005. Reperfusion-induced translocation of deltaPKC to cardiac mitochondria prevents pyruvate dehydrogenase reactivation. *Circ. Res.* 97: 78-85.
- Clarke, A. 1987. The adaptation of aquatic animals to low temperatures. pp. 315-348. *In: B.W.W. Grout & G.J. Morris (ed.) The effects of low temperatures on biological systems*, Edward Arnold, London.
- Clejan, S., E. Jonas, P.J. Collipp, L. Fugler & V.T. Maddaiah. 1981. Influence of growth hormone and thyroxine on thermotropic effects of respiration and 1-anilino-8-naphthalene sulfonate fluorescence and on lipid composition of cardiac membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 678: 250-256.
- Cooper, R.H., P.J. Randle & R.M. Denton. 1974. Regulation of heart muscle pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochem. J.* 143: 625-641.
- Cossins, A.R. 1994. Temperature adaptation of biological membranes. Portland Press, London.
- Cossins, A.R. & K. Bowler. 1987. Temperature biology of animals. Chapman and Hall, London & New York. 339 pp.
- Costa, L.E., A. Boveris, O.R. Koch & A.C. Taquini. 1988. Liver and heart mitochondria in rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 255: C123-C129.
- Coux, O., K. Tanaka & A.L. Goldberg. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 801-847.
- Crockett, E. & J. Hazel. 1995. Cholesterol levels explain inverse compensation of membrane order in brush border but not homeoviscous adaptation in basolateral membranes from the intestinal epithelia of rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 198: 1105-1113.

- Crockett, E.L. & B.D. Sidell. 1990. Some pathways of energy metabolism are cold adapted in Antarctic fishes. *Physiol. Zool.* 63: 472-488.
- D'Autréaux, B. & M.B. Toledano. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 813-824.
- Dae, M.W., D.W. Gao, D.I. Sessler, K. Chair & C.A. Stillson. 2002. Effect of endovascular cooling on myocardial temperature, infarct size, and cardiac output in human-sized pigs. *Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol.* 282: H1584-H1591.
- Dahlhoff, E. & G.N. Somero. 1993. Effects of temperature on mitochondria from abalone (Genus *Haliotis*): adaptative plasticity and its limits. *J. Exp. Biol.* 185: 151-168.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani & R. Colombo. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 329: 23-38.
- Das, J. 2006. The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation. *Bioassays* 28: 890-901.
- Dawson, K.D., D.J. Baker, P.L. Greenhaff & M.J. Gibala. 2005. An acute decrease in TCA cycle intermediates does not affect aerobic energy delivery in contracting rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 565: 637-643.
- Demaison, L., J.P. Sergiel, D. Moreau & A. Grynberg. 1994. Influence of the phospholipid n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on the mitochondrial oxidative metabolism before and after myocardial ischemia. *Biochim. Biophys. Acta* 1227: 53-59.
- Di Giulio, R.T., P.C. Washburn, R.J. Wenning, G.W. Winston & C.S. Jewell. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 1103-1123.
- Di Lisa, F., R. Menabo, M. Canton & V. Petronilli. 1998. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochim. Biophys. Acta* 1366: 69-78.
- Digerness, S.B. & W.J. Reddy. 1976. The malate-aspartate shuttle in heart mitochondria. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 8: 779-785.

- DiMauro, S. & E.A. Schon. 2001. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am. J. Medic. Gen.* 106: 18-26.
- Din, J.N., D.E. Newby & A.D. Flapan. 2004. Science, medicine, and the future - Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease - fishing for a natural treatment. *Br. Med. J.* 328: 30-35.
- Drew, B. & C. Leeuwenburgh. 2002. Aging and the role of reactive nitrogen species. pp. 66-81 *Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures And Slowing The Innate Aging Process*, New York Acad Sciences, New York.
- Drobnis, E.Z., L.M. Crowe, T. Berger, T.J. Anchordoguy, J.W. Overstreet & J.H. Crowe. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase-transitions in cell-membranes - A demonstration using sperm as a model. *J. Exp. Zool.* 265: 432-437.
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.
- Dufour, S., N. Rousse, P. Canioni & P. Diollez. 1996. Top-down control analysis of temperature effect on oxidative phosphorylation. *Biochem. J.* 314: 743-751.
- Dukan, S., A. Farewell, M. Ballesteros, F. Taddei, M. Radman & T. Nystrom. 2000. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 5746-5749.
- Estabrook, R. 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol.* 10: 41-47.
- Fernandez-Checa, J.C., C. Garcia-Ruiz, A. Colell, A. Morales, M. Mari, M. Miranda & E. Ardite. 1998. Oxidative stress: Role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors* 8: 7-11.
- Finkel, T. & N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
- Freeman, M.P. 2000. Omega-3 fatty acids in psychiatry: a review. *Ann. Clin. Psychiatry* 12: 159-165.
- Freitag, H., W. Neupert & R. Benz. 1982. Purification and characterisation of a pore protein of the outer mitochondrial membrane from *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* 123: 629-636.

- Friguet, B. 2003. Aging at the cellular and molecular levels and future perspectives. *L'actualité Chimique*: 103-107.
- Friguet, B., A.L. Bulteau, N. Chondrogianni, M. Conconi & I. Petropoulos. 2000. Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. pp. 143-154 *Molecular And Cellular Gerontology*, New York Acad Sciences, New York.
- Fuller, B.J. 1987. Low temperature preservation in medicine and veterinary. pp. 432-450. *In*: B.W.W. Grout & G.J. Morris (ed.) *The effects of low temperatures on biological systems*, Edward Arnold, London.
- Gamperl, A.K. & A.P. Farrell. 2004. Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. *J. Exp. Biol.* 207: 2539-2550.
- Garait, B., K. Couturier, S. Servais, D. Letexier, D. Perrin, C. Batandier, J.L. Rouanet, B. Sibille, B. Rey, X. Leverve & R. Favier. 2005. Fat intake reverses the beneficial effects of low caloric intake on skeletal muscle mitochondrial H₂O₂ production. *Free Radic. Biol. Med.* 39: 1249-1261.
- Geiser, F. 1988. Reduction of metabolism during hibernation and daily torpor in mammals and birds: temperature effect or physiological inhibition? *J. Comp. Physiol.* 158: 25-37.
- Gertz, E.W., J.A. Wisneski, W.C. Stanley & R.A. Neese. 1988. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J. Clin. Invest.* 82: 2017-2025.
- Ghafourifar, P., S.D. Klein, O. Schucht, U. Schenk, M. Pruschy, S. Rocha & C. Richter. 1999. Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. Importance of mitochondrial redox state. *J. Biol. Chem.* 274: 6080-6084.
- Gibala, M.J., D.A. MacLean, T.E. Graham & B. Saltin. 1998. Tricarboxylic acid cycle intermediate pool size and estimated cycle flux in human muscle during exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 275: E235-E242.
- Gibbon, J.H. 1954. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn. Med.* 37: 171-180.
- Gieseg, S.P., S. Cuddihy, J.V. Hill & W. Davison. 2000. A comparison of plasma vitamin C and E levels in two Antarctic and two temperate water fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 125: 371-378.

- Giron, M.D., F.J. Mataix & M.D. Suarez. 1990. Changes in lipid composition and desaturase activities of duodenal mucosa induced by dietary fat. *Biochim. Biophys. Acta* 1045: 69-73.
- Gnaiger, E. 2001. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir. Physiol.* 128: 277-297.
- Gnaiger, E. 2007. Mitochondrial pathways and respiratory control. Oroboros Instruments, Innsbruck. 96 pp.
- Gnaiger, E. & A.V. Kuznetsov. 2002. Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 252-258.
- Gnaiger, E., A.V. Kuznetsov, S. Schneeberger, R. Seiler, G. Brandacher, W. Steurer & R. Margreiter. 2000a. Mitochondria in the cold. pp. 431-442. *In: G. Heldmaier & M. Klingenspor (ed.) Life in the cold*, Springer Berlin Heidelberg, New York.
- Gnaiger, E., B. Lassnig, A. Kuznetsov, G. Reiger & R. Margreiter. 1998a. Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J. Exp. Biol.* 201: 1129-1139.
- Gnaiger, E., B. Lassnig, A.V. Kuznetsov & R. Margreiter. 1998b. Mitochondrial respiration in the low oxygen environment of the cell - Effect of ADP on oxygen kinetics. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* 1365: 249-254.
- Gnaiger, E., G. Méndez & S.C. Hand. 2000b. High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11080-11085.
- Gnaiger, E., R. Steinlechner-Maran, G. Méndez, T. Eberl & R. Margreiter. 1995. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J. Bioenerg. Biomemb.* 27: 583-596.
- Goodwin, G.W. & H. Taegtmeyer. 2000. Improved energy homeostasis of the heart in the metabolic state of exercise. *Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol.* 279: H1490-H1501.
- Gottlieb, R.A., K.O. Bureson, R.A. Kloner, B.M. Babior & R.L. Engler. 1994. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 94: 1621-1628.

- Gracey, A.Y., J. Logue, P.E. Tiku & A.R. Cossins. 1996. Adaptation of biological membranes to temperature: biophysical perspectives and molecular mechanisms. pp. 1-22. *In*: I.A. Johnston & A.F. Bennett (ed.) *Animals and temperature. Phenotypic and evolutionary adaptation*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Guderley, H. 2004. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biol. Rev.* 79: 409-427.
- Guderley, H. & J. St-Pierre. 2002. Going with the flow or life in the fast lane: contrasting mitochondrial responses to thermal change. *J. Exp. Biol.* 205: 2237-2249.
- Haeffner, E.W. & O.S. Privett. 1975. Influence of dietary fatty acids on membrane properties and enzyme activities of liver mitochondria of normal and hypophysectomized rats. *Lipids* 10: 75-81.
- Hafner, R.P., G.C. Brown & M.D. Brand. 1990. Analysis of the control of respiration rate, phosphorylation rate, proton leak rate and protonmotive force in isolated mitochondria using the top-down approach of metabolic control theory. *Eur. J. Biochem.* 188: 313-319.
- Hale, S.L. & R.A. Kloner. 1999. Myocardial hypothermia: A potential therapeutic technique for acute regional myocardial ischemia. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10: 405-413.
- Halliwell, B. & S. Chirico. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 715S-724S.
- Halliwell, B. & J.M.C. Gutteridge. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford. 936 pp.
- Han, D., F. Antunes, R. Canali, D. Rettori & E. Cadenas. 2003. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.* 278: 5557-5563.
- Hansen, T.N. 1993. Correlation between chilling-induced injury in human-cells and phospholipid membrane phase-transition. *Transplant. Proc.* 25: 3179-3181.
- Hardewig, I., L.S. Peck & H.O. Pörtner. 1999. Thermal sensitivity of mitochondrial function in the Antarctic Nototheniid *Lepidonotthen nudifrons*. *J. Comp. Physiol. B* 169: 597-604.

- Harman, D. 1956. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298-300.
- Haslam, J.M. & H.A. Krebs. 1963. Substrate competition in the respiration of animal tissues. The metabolic interactions of pyruvate and alpha-oxoglutarate in rat liver homogenates. *Biochem. J.* 86: 432-446.
- Hazel, J.R. 1972. The effect of temperature acclimation upon succinic dehydrogenase activity from the epaxial muscle of the common goldfish (*Carassius aurata* L.)-II. Lipid reactivation of the soluble enzyme. *Comp. Biochem. Physiol B-Biochem. Molec. Biol.* 43B: 863-882.
- Hazel, J.R. 1984. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Am. J. Physiol.* 46: R460-R470.
- Hazel, J.R. 1988. Homeoviscous adaptation in animal cell membranes. pp. 149-188. *In: R.C. Aloia, C.C. Curtain & L.M. Gordon (ed.) Physiological regulation of membrane fluidity*, Alan R. Liss, Inc., New York.
- Hazel, J.R. 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57: 19-42.
- Hazel, J.R. & E.E. Williams. 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.
- Hebert, R.A. 1981. Low temperature adaptation in bacteria. pp. 41-54. *In: G.J. Morris & A. Clarke (ed.) Effects of low temperatures on biological membranes*, Academic Press, London.
- Hildyard, J.C.W. & A.P. Halestrap. 2003. Identification of the mitochondrial pyruvate carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 374: 607-611.
- Hillered, L. & P.H. Chan. 1988. Effects of arachidonic acid on respiratory activities in isolated brain mitochondria. *J. Neurosci. Res.* 19: 94-100.
- Hoch, F.L. 1992. Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim. Biophys. Acta* 1113: 71-133.
- Hochachka, P.W. & G.N. Somero. 2002. *Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution.* Oxford University Press, New York. 466 pp.

- Hock, C.E., M.A. Holahan & D.K. Reibel. 1987. Effect of dietary fish oil on myocardial phospholipids and myocardial ischemic damage. *Am. J. Physiol.* 252: H554-H560.
- Hoerter, J., M. Gonzalez-Barroso, E. Couplan, P. Mateo, C. Gelly, A.M. Cassard-Doulcier, P. Diolez & F. Bouillaud. 2004. Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage. *Circulation* 110: 528-533.
- Holub, B.J. 2002. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *Can. Med. Assoc. J.* 166: 608-615.
- Huertas, J.R., M. Battino, V. Barzanti, M. Maranesi, G. Parenti-Castelli, G.P. Littarru, E. Turchetto, F.J. Mataix & G. Lenaz. 1992. Mitochondrial and microsomal cholesterol mobilization after oxidative stress induced by adriamycin in rats fed with dietary olive and corn oil. *Life Sci.* 50: 2111-2118.
- Huertas, J.R., M. Battino, G. Lenaz & F.J. Mataix. 1991. Changes in mitochondrial and microsomal rat liver coenzyme Q₉ and Q₁₀ content induced by dietary fat and endogenous lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 287: 89-92.
- Huertas, J.R., E. Martinez-Velasco, S. Ibanez, M. Lopez-Frias, J.J. Ochoa, J. Quiles, G.P. Castelli, J. Mataix & G. Lenaz. 1999. Virgin olive oil and coenzyme Q10 protect heart mitochondria from peroxidative damage during aging. *Biofactors* 9: 337-343.
- Innis, S.M. & M.T. Clandinin. 1981. Dynamic modulation of mitochondrial membrane physical properties and ATPase activity by diet lipid. *Biochem. J.* 198: 167-175.
- Itoi, S., S. Kinoshita, K. Kikuchi & S. Watabe. 2003. Changes of carp FoF1-ATPase in association with temperature acclimation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284: R153-R163.
- Jackman, M.R. & W.T. Willis. 1996. Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 39: C673-C678.
- Jeejeebhoy, K.N. & M.J. Sole. 2001. Nutrition and the heart. *Clin. Nutr.* 20 (Suppl. 1): 181-186.

- Johnson, D.W. 2000. A rapid screening procedure for the diagnosis of peroxisomal disorders: Quantification of very long-chain fatty acids, as dimethylaminoethyl esters, in plasma and blood spots, by electrospray tandem mass spectrometry. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23: 475-486.
- Johnston, I.A., J. Calvo, H. Guderley, D. Fernandez & L. Palmer. 1998. Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes. *J. Exp. Biol.* 201: 1-12.
- Johnston, I.A. & J. Dunn. 1987. Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 41: 67-93.
- Kawall, H.G., J.J. Torres, B.D. Sidell & G.N. Somero. 2002. Metabolic cold adaptation in Antarctic fishes: evidence from enzymatic activities of brain. *Mar. Biol.* 140: 279-286.
- Kehrer, J.P. 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149: 43-50.
- Kim, M.J.C. & C.D. Berdanier. 1998. Nutrient-gene interactions determine mitochondrial function: effect of dietary fat. *Faseb J.* 12: 243-248.
- Kloner, R.A. & S.H. Rezkalla. 2004. Cardiac protection during myocardial infarction: Where do we stand in 2004? *J. Am. Coll. Cardiol.* 44: 276-286.
- Kobayashi, K. & J.R. Neely. 1983. Effects of ischemia and reperfusion on pyruvate dehydrogenase activity in isolated rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 15: 359-367.
- Korshunov, S.S., O.V. Korkina, E.K. Ruuge, V.P. Skulachev & A.A. Starkov. 1998. Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O₂ and H₂O₂ by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett.* 435: 215-218.
- Kraffe, E., Y. Marty & H. Guderley. 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.
- Kris-Etherton, P.M., W.S. Harris & L.J. Appel. 2003. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: E20-E31.

- Kruger, N.A., W.H. Frishman & J. Hussain. 2003. Fish oils, the B vitamins, and folic acid as cardiovascular protective agents. pp. 381-405. *In*: W.H. Frishman, E.H. Sonnenblick & D.A. Sica (ed.) Cardiovascular pharmacotherapeutics, McGraw-Hill, New York.
- Kunz, W.S., A. Kudin, S. Vielhaber, C.E. Elger, G. Attardi & G. Villani. 2000. Flux control of cytochrome c oxidase in human skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 275: 27741-27745.
- Kuznetsov, A.V., G. Brandacher, W. Steurer, R. Margreiter & E. Gnaiger. 2000. Isolated rat heart mitochondria and whole rat heart as models for mitochondrial cold ischemia-reperfusion injury. *Transplant. Proc.* 32: 45.
- Kuznetsov, A.V., S. Schneeberger, R. Seiler, G. Brandacher, W. Mark, W. Steurer, V. Saks, Y. Usson, R. Margreiter & E. Gnaiger. 2004. Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol.* 286: H1633-H1641.
- Lande, M.B., J.M. Donovan & M.L. Zeidel. 1995. The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *J. Gen. Physiol.* 106: 67-84.
- Ledesma, A. & E. Rial. 2004. Carrier and channel properties of the mitochondrial transporters: Physiology and pathology? *Toxicol. Mech. Methods* 14: 41-46.
- Lee, J., B.P. Yu & J.T. Herlihy. 1999. Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 260-265.
- Lefevre, G. 1998. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 56: 305-319.
- Lemasters, J.J. 1984. The ATP-to-oxygen stoichiometries of oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 259: 13123-13130.
- Lemieux, H., P.U. Blier & J.-C. Tardif. accepted. Does membrane fatty acid composition modulate mitochondrial function and its thermal sensitivity? *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*
- Lesnefsky, E.J., T.I. Guduz, C.T. Migita, M. Ikeda-Saito, M.O. Hassan, P.J. Turkaly & C.L. Hoppel. 2001a. Ischemic injury to mitochondrial electron transport in the aging heart: Damage to the iron-sulfur protein subunit of electron transport complex III. *Arch. Biochem. Biophys.* 385: 117-128.

- Lesnefsky, E.J. & C.L. Hoppel. 2006. Oxidative phosphorylation and aging. *Ageing Res. Rev.* 5: 402-433.
- Lesnefsky, E.J., S. Moghaddas, B. Tandler, J. Kerner & C.L. Hoppel. 2001b. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: Ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33: 1065-1089.
- Letellier, T., R. Heinrich, M. Malgat & J.P. Mazat. 1994. The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases - A systemic approach. *Biochem. J.* 302: 171-174.
- Lewandowski, E.D. & L.T. White. 1995. Pyruvate-dehydrogenase influences postischemic heart function. *Circulation* 91: 2071-2079.
- Lewis, F.J. & M. Taufic. 1953. Closure of atrial defects with the aid of hypothermia: experimental accomplishments and the report of one successful case. *Surgery* 33: 52-59.
- Llesuy, S., P. Evelson, B. González-Flecha, J. Peralta, M.C. Carreras, J.J. Poderoso & A. Boveris. 1994. Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome. *Free Rad. Biol. Med.* 16: 445-451.
- Luft, R., D. Ikkos, G. Palmieri, L. Ernster & B. Afzelius. 1962. Severe hypermetabolism of non thyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical and morphological study. *J. Clin. Invest.* 41: 1776-1804.
- Margesin, R. & F. Schinner. 1999. Cold-adapted organisms – Ecology, physiology, enzymology and Molecular biology. Springer-Verlag, Berlin. 416 pp.
- Marín-García, J. 2005. Mitochondria and the heart. Springer Science + Business Media, Inc., New York. 400 pp.
- Marín-García, J. & M.J. Goldenthal. 2002. The mitochondrial organelle and the heart. *Revista Espanola de Cardiologia* 55: 1293-1310.
- Martin, D.R., D.F. Scott, G.L. Downes & F.O. Belzer. 1972. Primary cause of unsuccessful liver and heart preservation: Cold sensitivity of the ATPase system. *Ann. Surg.* 175: 111-117.
- Mataix, J., J.J. Ochoa & J.L. Quiles. 2004. Olive oil, dietary fat and ageing, a mitochondrial approach. *Grasas Y Aceites* 55: 84-91.

- Mataix, J., J.L. Quiles, J.R. Huertas, M. Battino & M. Mañas. 1998. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.* 24: 511-521.
- Mathur, A., Y. Hong, B.K. Kemp, A.A. Barrientos & J.D. Erusalimsky. 2000. Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 46: 126-138.
- McCarthy, I., E. Moksness & D.A. Pavlov. 1998. The effects of temperature on growth rate and growth efficiency of juvenile common wolffish. *Aquac. Int.* 6: 207-218.
- McCarthy, J., C.J. McLeod, J. Minners, M.F. Essop, P.P. Ping & M.N. Sack. 2005. PKCepsilon activation augments cardiac mitochondrial respiratory post-anoxic reserve - a putative mechanism in PKCepsilon cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38: 697-700.
- McCarty, M.F. 2004. A shift in myocardial substrate, improved endothelial function, and diminished sympathetic activity may contribute to the anti-anginal impact of very-low-fat diets. *Med. Hypotheses* 62: 62-71.
- McLennan, H.R. & M. Degli Esposti. 2000. The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32: 153-162.
- McLennan, P.L. & M.Y. Abeywardena. 2005. Membrane basis for fish oil effects on the heart: Linking natural hibernators to prevention of human sudden cardiac death. *J. Membr. Biol.* 206: 85-102.
- McLennan, P.L., T.M. Bridle, M.Y. Abeywardena & J.S. Charnock. 1993. Comparative efficacy of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in modulating ventricular fibrillation threshold in marmoset monkeys. *Am. J. Clin. Nutr.* 58: 666-669.
- McMillin, J.B., R.J. Bick & C.R. Benedict. 1992. Influence of dietary fish oil on mitochondrial function and response to ischemia. *Am. J. Physiol.* 263: H1479-H1485.
- McMurchie, E.J. 1988. Dietary lipids and the regulation of membrane fluidity and function. pp. 189-238. *In:* R.C. Aloia, C.C. Curtain & L.M. Gordon (ed.) *Physiological regulation of membrane fluidity*, Alan R. Liss, Inc., New York.

- McMurchie, E.J., M.Y. Abeywardena, J.S. Charnock & R.A. Gibson. 1983. Differential modulation of rat heart mitochondrial membrane-associated enzymes by dietary lipid. *Biochim. Biophys. Acta* 760: 13-24.
- McVeigh, J.J. & G.D. Lopaschuk. 1990. Dichloroacetate stimulation of glucose-oxidation improves recovery of ischemic rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 259: H1079-H1085.
- Moksness, E. & D.A. Pavlov. 1996. Management by life cycle of wolffish, *Anarhichas lupus* L., a new species for cold-water aquaculture: a technical paper. *Aquacult. Res.* 27: 865-883.
- Mondello, L., P.Q. Tranchida, P. Dugo & G. Dugo. 2006. Rapid, micro-scale preparation and very fast gas chromatographic separation of cod liver oil fatty acid methyl esters. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41: 1566-1570.
- Mootha, V.K., A.E. Arai & R.S. Balaban. 1997. Maximum oxidative phosphorylation capacity of the mammalian heart. *Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol.* 41: H769-H775.
- Munscher, C., T. Rieger, J. Muller-Hocker & B. Kadenbach. 1993. The point mutation of mitochondrial DNA characteristic for MERRF disease is found also in healthy people of different ages. *FEBS Lett.* 317: 27-30.
- N'Guessan, B., J. Zoll, F. Ribera, E. Ponsot, E. Lampert, R. Ventura-Clapier, V. Veksler & B. Mettauer. 2004. Evaluation of quantitative and qualitative aspects of mitochondrial function in human skeletal and cardiac muscles. *Mol. Cell. Biochem.* 256: 267-280.
- Neely, J.R. & H.E. Morgan. 1974. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Ann. Rev. Physiol.* 36: 413-459.
- Nicholls, D.G. & S.L. Budd. 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* 80: 315-360.
- Nicholls, D.G. & S.J. Ferguson. 2002. *Bioenergetics 3*. Academic Press, London. 287 pp.
- Ning, X.H. & S.H. Chen. 2006. Mild hypothermic cross adaptation resists hypoxic injury in hearts: A brief review. *Chin. J. Physiol.* 49: 213-222.
- Nohl, H., L. Gille, A. Kozlov & K. Staniek. 2003. Are mitochondria a spontaneous and permanent source of reactive oxygen species? *Redox Rep.* 8: 135-141.

- Nohl, H., V. Koltover & K. Stolze. 1993. Ischemia/reperfusion impairs mitochondrial energy conservation and triggers O_2^- release as a byproduct of respiration. *Free Radic. Res. Commun.* 18: 127-137.
- Ochoa-Herrera, J.J., J.R. Huertas, J.L. Quiles & J. Mataix. 2001. Dietary oils high in oleic acid, but with different non-glyceride contents, have different effects on lipid profiles and peroxidation in rabbit hepatic mitochondria. *J. Nutr. Biochem.* 12: 357-364.
- Ochoa, J.J., J.L. Quiles, S. Ibanez, E. Martinez, M.L. Lopez-Frias, J.R. Huertas & J. Mataix. 2003. Aging-related oxidative stress depends on dietary lipid source in rat postmitotic tissues. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35: 267-275.
- Okuda, M., H.C. Lee, C. Kumar & B. Chance. 1992. Comparison of the effect of a mitochondrial uncoupler, 2,4-dinitrophenol and adrenaline on oxygen radical production in the isolated perfused-rat-liver. *Acta Physiol. Scand.* 145: 159-168.
- Opalka, J.R., F.N. Gellerich, L. Kling, B. Muller-Beckmann & S. Zierz. 2002. Effect of the new matrix metalloproteinase inhibitor RO-28-2653 on mitochondrial function. *Biochem. Pharmacol.* 63: 735-732.
- Opie, L.H. 1998. *The heart physiology, from cell to circulation.* Lippincott-Raven, Philadelphia. 637 pp.
- Opie, L.H. & M.N. Sack. 2002. Metabolic plasticity and the promotion of cardiac protection in ischemia and ischemic preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34: 1077-1089.
- Ovide-Bordeaux, S. & A. Grynberg. 2004. Docosahexaenoic acid affects insulin deficiency- and insulin resistance-induced alterations in cardiac mitochondria. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286: R519-R527.
- Padma, V.V. & C.S. Devi. 2002. Effect of fish oil on mitochondrial respiration in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 40: 268-272.
- Pamplona, R., G. Barja & M. Portero-Otin. 2002. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span - A homeoviscous-longevity adaptation? pp. 475-490 *Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process*, New York Acad. Sciences, New York.

- Pamplona, R., M. Portero-Otin, C. Ruiz, R. Gredilla, A. Herrero & G. Barja. 2000. Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech. Ageing Dev.* 112: 169-183.
- Pamplona, R., J. Prat, S. Cadenas, C. Rojas, R. PerezCampo, M.L. Torres & G. Barja. 1996. Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: The pigeon and human case. *Mech. Ageing. Dev.* 86: 53-66.
- Paradies, G., G. Petrosillo, M. Pistolese, N. Di Venosa, D. Serena & F.M. Ruggiero. 1999. Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 42-50.
- Paschen, S.A. & W. Neupert. 2001. Protein import into mitochondria. *IUBMB Life* 52: 101-112.
- Pehowich, D.J. 1995. Hypothyroid state and membrane fatty acid composition influence cardiac mitochondrial pyruvate oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1235: 231-238.
- Pepe, S. 2005. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on age-related changes in cardiac mitochondrial membranes. *Exp. Gerontol.* 40: 369-376.
- Pepe, S. & P.L. McLennan. 1992. Modulation of myocardial oxygen requirements by dietary lipids in the isolated erythrocyte perfused working rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24: S115.
- Pepe, S. & P.L. McLennan. 1996. Dietary fish oil confers direct antiarrhythmic properties on the myocardium of rats. *J. Nutr.* 126: 34-42.
- Pepe, S., N. Tsuchiya, E.G. Lakatta & R.G. Hansford. 1999. PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca^{2+} activation of PDH. *Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol.* 276: H149-H158.
- Pettit, F.H. & L.J. Reed. 1982. Pyruvate dehydrogenase complex from bovine kidney and heart. *Methods Enzymol.* 89: 376-386.
- Piccoli, C., R. Scrima, D. Boffoli & N. Capitanio. 2006. Control by cytochrome c oxidase of the cellular oxidative phosphorylation system depends on the mitochondrial energy state. *Biochem. J.* 396: 573-583.

- Piche, L.A., H.H. Draper & P.D. Cole. 1988. Malondialdehyde excretion by subjects consuming cod liver oil vs a concentrate of n-3 fatty acids. *Lipids* 23: 370-371.
- Piquet, M.A., M. Roulet, V. Nogueira, C. Filippi, B. Sibille, I. Hourmand-Ollivier, M. Pilet, V. Rouleau & X.M. Lerverve. 2004. Polyunsaturated fatty acid deficiency reverses effects of alcohol on mitochondrial energy metabolism. *J. Hepatol.* 41: 721-729.
- Prosser, C.L. 1986. Environmental and metabolic animal physiology. Comparative animal physiology. Wiley-Liss, New York. 578 pp.
- Pryor, W.A. 1986. Oxy-radicals and related species: Their formation, lifetimes, and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 657-667.
- Qian, L.J., X.L. Song, H.R. Ren, J.B. Gong & S.Q. Cheng. 2004. Mitochondrial mechanism of heat stress-induced injury in rat cardiomyocyte. *Cell Stress Chap.* 9: 281-293.
- Quentin, E., N. Averet, M. Rigoulet & B. Guerin. 1994. Temperature dependence of the coupling efficiency of rat liver oxidative phosphorylation - role of adenine nucleotide translocator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 816-821.
- Quiles, J.L., J.R. Huertas, M. Manas, M. Battino, M. Cassinello, G.P. Littarru, G. Lenaz & F.J. Mataix. 1994. Peroxidative extent and coenzyme Q levels in the rat: influence of physical training and dietary fats. *Mol. Aspects Med.* 15: S89-S95.
- Quiles, J.L., J.R. Huertas, M. Manas, J.J. Ochoa, M. Battino & J. Mataix. 1999. Oxidative stress induced by exercise and dietary fat modulates the coenzyme Q and vitamin A balance between plasma and mitochondria. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 69: 243-249.
- Quiles, J.L., J.R. Huertas, M. Manes, J.J. Ochoa, M. Battino & J. Mataix. 2001. Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33: 127-134.
- Quinn, P.J. 1981. The fluidity of cell membranes and its regulation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 38: 1-104.
- Quinn, P.J. 1985. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology* 22: 128-46.

- Ragan, C.I., M.T. Wilson, V.M. Darley-Usmar & P.N. Lowe. 1987. Sub-fractionation of mitochondria and isolation of the proteins of oxidative phosphorylation. pp. 79-112. *In*: V.M. Darley-Usmar, D. Rickwood & M.T. Wilson (ed.) *Mitochondria a practical approach*, IRL Press, Oxford.
- Randle, P.J. 1986. Fuel selection in animals. *Biochem. Soc. Trans.* 14: 799-806.
- Randle, P.J., D.A. Priestman, S. Mistry & A. Halsall. 1994. Mechanisms modifying glucose-oxidation in diabetes-mellitus. *Diabetologia* 37: S155-S161.
- Rasmussen, H.N. & U.F. Rasmussen. 1997. Small scale preparation of skeletal muscle mitochondria, criteria of integrity, and assays with reference to tissue function. *Mol. Cell. Biochem.* 174: 55-60.
- Rasmussen, U.F. & H.N. Rasmussen. 2000. Human quadriceps muscle mitochondria: A functional characterization. *Mol. Cell. Biochem.* 208: 37-44.
- Rasmussen, U.F., H.N. Rasmussen, P. Krstrup, B. Quistorff, B. Saltin & J. Bangsbo. 2001. Aerobic metabolism of human quadriceps muscle: in vivo data parallel measurements on isolated mitochondria. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 280: E301-E307.
- Rauen, U., I. Reuters, A. Fuchs & H. deGroot. 1997. Oxygen free radical-mediated injury to cultured rat hepatocytes during cold incubation in preservation solutions. *Hepatology* 26: 351-357.
- Regoli, F., G.B. Principato, E. Bertoli, M. Nigro & E. Orlando. 1997. Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment. *Polar Biol.* 17: 251-258.
- Ricquier, D. & F. Bouillaud. 2000. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* 345: 161-179.
- Rikans, L.E. & K.R. Hornbrook. 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* 1362: 116-127.
- Roche, T.E. & R.L. Cate. 1977. Purification of porcine liver pyruvate dehydrogenase complex and characterization of its catalytic and regulatory properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 183: 664-677.
- Rossignol, R., B. Faustin, C. Rocher, M. Malgat, J.P. Mazat & T. Letellier. 2003. Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.* 370: 751-762.

- Rossignol, R., T. Letellier, M. Malgat, C. Rocher & J.P. Mazat. 2000. Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem. J.* 347: 45-53.
- Rossignol, R., M. Malgat, J.P. Mazat & T. Letellier. 1999. Threshold effect and tissue specificity - Implication for mitochondrial cytopathies. *J. Biol. Chem.* 274: 33426-33432.
- Rottenberg, H., D.E. Robertson & E. Rubin. 1980. The temperature dependence of respiration and ATPase in rat liver mitochondria is altered by ethanol. *Adv. Exp. Med. Biol.* 132: 345-353.
- Royce, S.M. & R.P. Holmes. 1984. The saturation and isomerization of dietary fatty acids and the respiratory properties of rat heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 792: 371-375.
- Rustin, P., D. Chretien, T. Bourgeron, B. Gerard, A. Rotig, J.M. Saudubray & A. Munnich. 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory-chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* 228: 35-51.
- Ruxton, C.H.S., S.C. Reed, M.J.A. Simpson & K.J. Millington. 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.* 17: 449-459.
- Saks, V.A., V.I. Veksler, A.V. Kuznetsov, L. Kay, P. Sikk, T. Tiivel, L. Tranqui, J. Olivares, K. Winkler, F. Wiedemann & W.S. Kunz. 1998. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function *in vivo*. *Mol. Cell. Biochem.* 184: 81-100.
- Samartsev, V.N., S.A. Chezganova, L.S. Polishchuk, A.P. Paydyganov, O.V. Vidyakina & I.P. Zeldi. 2003. Temperature dependence of rat liver mitochondrial respiration with uncoupling of oxidative phosphorylation by fatty acids. Influence of inorganic phosphate. *Biochem.-Moscow* 68: 618-626.
- Sammut, I.A., J. Jayakumar, N. Latif, S. Rothery, N.J. Severs, R.T. Smolenski, T.E. Bates & M.H. Yacoub. 2001. Heat stress contributes to the enhancement of cardiac mitochondrial complex activity. *Am. J. Pathol.* 158: 1821-1831.
- Sandermann, H.J. 1978. Regulation of membrane enzymes by lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 515: 209-37.
- Schagger, H. & K. Pfeiffer. 2001. The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 276: 37861-37867.

- Scheffler, I.E. 1999. Mitochondria. John Wiley & Sons, New York.
- Schon, E. 2000. Mitochondrial DNA mutations in human diseases. Trends Biochem. Sci. 25: 555-559.
- Schrauwen, P. & M.K.C. Hesselink. 2004. Oxidative capacity, lipotoxicity and mitochondrial damage in type 2 diabetes. Diabetes 53: 1412-1417.
- Sealy, W.C. 1989. Hypothermia - Its possible role in cardiac surgery. Ann. Thorac. Surg. 47: 788-791.
- Senault, C., J. Yazbeck, M. Goubern, R. Portet, M. Vincent & J. Gallay. 1990. Relation between membrane phospholipid composition, fluidity and function in mitochondria of rat brown adipose tissue - Effect of thermal adaptation and essential fatty acid deficiency. Biochim. Biophys. Acta 1023: 283-289.
- Shigenaga, M.K., T.M. Hagen & B.N. Ames. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 10771-10778.
- Silvius, J.R. & R.N. McElhaney. 1980. Membrane lipid physical state and modulation of the Na⁺,Mg²⁺-ATPase activity in *Acholeplasma laidlawii* B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1255-1259.
- Simonetti, S., X. Chen, S. DiMauro & E.A. Schon. 1992. Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR. Biochim. Biophys. Acta 1180: 113-122.
- Simopoulos, A.P. 2002a. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomed. Pharmacother. 56: 365-379.
- Simopoulos, A.P. 2002b. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. J. Am. Coll. Nutr. 21: 495-505.
- Sinensky, M. 1974. Homeoviscous adaptation - A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71: 522-525.
- Smith, C.L. 1977. Temperature and the regulation of activity of some mitochondrial enzyme systems in ecto- and endo-thermic animals. J. Therm. Biol. 2: 215-221.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson & D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85.

- Somero, G.N. 1997. Temperature relationships: from molecules to biogeography. pp. 1391-1444. *In*: W.H. Dantzler (ed.) Handbook of physiology, Cambridge University Press, Cambridge.
- Southard, J.H. & F.O. Belzer. 1980. Control of canine kidney cortex slice volume and ion distribution at hypothermia by impermeable anions. *Cryobiology* 17: 540-548.
- Srere, P.A. 1969. Citrate synthase. *Methods Enzymol.* 13: 3-11.
- Staniek, K. & H. Nohl. 1999. H₂O₂ detection from intact mitochondria as a measure for one electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* 1413: 70-80.
- Stanley, W.C., G.D. Lopaschuk, J.L. Hall & J.G. McCormack. 1997. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions - Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc. Res.* 33: 243-257.
- Sugden, M.C., M.L. Langdown, R.A. Harris & M.J. Holness. 2000. Expression and regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoforms in the developing rat heart and in adulthood: role of thyroid hormone status and lipid supply. *Biochem. J.* 352: 731-738.
- Swan, H., I. Zeavin & S.G. Blount. 1953. Surgery by direct vision in the open heart during hypothermia. *JAMA* 153: 1081-1085.
- Swegert, C.V., K.R. Dave & S.S. Katyare. 1999. Effect of aluminium-induced Alzheimer like condition on oxidative energy metabolism in rat liver, brain and heart mitochondria. *Mech. Ageing. Dev.* 112: 27-42.
- Taegtmeyer, H. 1994. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr. Prob. Cardiol.* 19: 59-113.
- Terrand, J., I. Papageorgiou, N. Rosenblatt-Velin & R. Lerch. 2001. Calcium-mediated activation of pyruvate dehydrogenase in severely injured postischemic myocardium. *Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol.* 281: H722-H730.
- Thibeault, M., P.U. Blier & H. Guderley. 1997. Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 16: 139-155.
- Thilo, L., H. Trauble & P. Overath. 1977. Mechanistic interpretation of the influence of lipid phase transitions on transport functions. *Biochemistry* 16: 1283-1290.

- Trigari, G., M. Pirini, V. Ventrella, A. Pagliarani, F. Trombetti & A.R. Borgatti. 1992. Lipid composition and mitochondrial respiration in warm- and cold-adapted sea bass. *Lipids* 27: 371-377.
- Turrens, J.F. 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* 17: 3-8.
- Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology-London* 552: 335-344.
- Uemura, M. & P.L. Steponkus. 1997. Effect of cold acclimation on the lipid composition of the inner and outer membrane of the chloroplast envelope isolated from rye leaves. *Plant Physiol.* 114: 1493-1500.
- van der Vusse, G.J., J.F. Glatz, H.C. Stam & R.S. Reneman. 1992. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol. Rev.* 72: 881-940.
- Vazquez-Memije, M.E., M.J. Cardenas-Mendez, A. Tolosa & M. El Hafidi. 2005. Respiratory chain complexes and membrane fatty acids composition in rat testis mitochondria throughout development and ageing. *Exp. Gerontol.* 40: 482-490.
- Veitch, K., L. Maisin & L. Hue. 1995. Trimetazidine effects on the damage to mitochondrial functions caused by ischemia and reperfusion. *Am. J. Cardiol.* 76: B25-B30.
- Ventura-Clapier, R., A. Kaasik & V. Veksler. 2004. Structural and functional adaptations of striated muscles to CK deficiency. *Mol. Cell. Biochem.* 256: 29-41.
- Vijg, J. 2000. Somatic mutations and aging: a re-evaluation. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 447: 117-135.
- Villani, G. & G. Attardi. 1997. In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 1166-1171.
- Villani, G., M. Greco, S. Papa & G. Attardi. 1998. Low reserve of cytochrome c oxidase capacity in vivo in the respiratory chain of a variety of human cell types. *J. Biol. Chem.* 273: 31829-31836.
- von Kleist-Retzow, J.C., U. Schauseil-Zipf, D.V. Michalk & W.S. Kunz. 2003. Mitochondrial diseases - an expanding spectrum of disorders and affected genes. *Exp. Physiol.* 88: 155-166.

- Wahr, J.A., D. Olszanski, K.F. Childs & S.F. Bolling. 1996. Dichloroacetate enhances myocardial functional and metabolic recovery following global ischemia. *J. Surg. Res.* 63: 220-224.
- Wallace, D.C. 1986. Mitotic segregation of mitochondrial DNAs in human cell hybrids and expression of chloramphenicol resistance. *Somat. Cell. Mol. Genet.* 12: 41-49.
- Wallace, D.C. 1993. Mitochondrial diseases: genotype versus phenotype. *Trends Genet.* 99: 129-133.
- Wallace, D.C. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488.
- Wallace, D.C. 2000. Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. *Am. Heart J.* 139: S70-85.
- Weinstein, R.B. & G.N. Somero. 1998. Effects of temperature on mitochondrial function in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *J. Comp. Physiol. B-Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 168: 190-196.
- Wenchich, L., Z. Drahota, T. Honzik, H. Hansikova, M. Tesarova, J. Zeman & J. Houstek. 2003. Polarographic evaluation of mitochondrial enzymes activity in isolated mitochondria and in permeabilized human muscle cells with inherited mitochondrial defects. *Physiol. Res.* 52: 781-788.
- West, J.L. & W.R. Driedzic. 1999. Mitochondrial protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart is enhanced in sexually mature males but impaired by low temperature. *J. Exp. Biol.* 202: 2359-2369.
- White, F.N. & G. Somero. 1982. Acid-base regulation and phospholipid adaptations to temperature: time courses and physiological significance of modifying the milieu for protein function. *Physiol. Rev.* 62: 40-90.
- White, M.G., L.E. Luca, D. Nonner, O. Saleh, B. Hu, E.F. Barrett & J.N. Barrett. 2007. Cellular mechanisms of neuronal damage from hyperthermia. *Prog. Brain Res.* 162: 347-371.
- Wiedemann, F.R., S. Vielhaber, R. Schroder, C.E. Elger & W.S. Kunz. 2000. Evaluation of methods for the determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in human skeletal muscle samples. *Anal. Biochem.* 279: 55-60.

- Williams, M.A., S. Katyare & L. Packer. 1975. Oscillatory states of mitochondria. Influence of unsaturated fatty acid composition. *Arch. Biochem. Biophys.* 170: 353-359.
- Winkler-Stuck, K., E. Kirches, C. Mawrin, K. Dietzmann, H. Lins, C.W. Wallesch, W.S. Kunz & F.R. Wiedemann. 2005. Re-evaluation of the dysfunction of mitochondrial respiratory chain in skeletal muscle of patients with Parkinsons disease. *J. Neural Transm.* 112: 499-518.
- 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.
- Yagi, K. 1998. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Free Rad. Antiox. Protoc.* 108: 101-106.
- Yamaoka, S., R. Urade & M. Kito. 1988. Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. *J. Nutr.* 118: 290-296.
- Yang, B., T.G. Saldeen, W.W. Nichols & J.L. Mehta. 1993a. Dietary fish oil supplementation attenuates myocardial dysfunction and injury caused by global ischemia and reperfusion in isolated rat hearts. *J. Nutr.* 123: 2067-2074.
- Yang, B.C., T.G. Saldeen, J.L. Bryant, W.W. Nichols & J.L. Mehta. 1993b. Long-term dietary fish oil supplementation protects against ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction in isolated rat hearts. *Am. Heart J.* 126: 1287-1292.
- Zeron, Y., D. Sklan & A. Arav. 2002. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 271-278.
- Zieger, M.A., M.P. Gupta & R.A. Siddiqui. 2006. Endothelial cell fatty acid unsaturation mediates cold-induced oxidative stress. *J. Cell Biochem.* 99: 784-796.