

RÔLE DES FONCTIONS MITOCHONDRIALES SUR LE MAXIMUM THERMIQUE
CRITIQUE DE DROSOPHILES (*DROSOPHILA MELANOGASTER*) ACCLIMATÉES
À DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES.

THÈSE PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES ET DE LA
RECHERCHE EN VUE DE L'OBTENTION DE LA MAÎTRISE ÈS SCIENCES EN
BIOCHIMIE

ARIANNE BLANCHARD

DÉPARTEMENT DE CHIMIE ET BIOCHIMIE

FACULTÉ DES SCIENCES

UNIVERSITÉ DE MONCTON

NOVEMBRE 2023

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers plusieurs personnes qui ont joué un rôle essentiel dans mon parcours académique et professionnel au cours de ma maîtrise. Tout d'abord, je souhaite remercier mon superviseur, le professeur Nicolas Pichaud, pour son encouragement, son soutien, et ses précieux conseils. J'aimerais aussi le remercier pour l'intérêt et son dévouement à ma réussite et celle de ses autres étudiants. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers les membres de l'équipe du laboratoire Pichaud notamment, Adèle, Florence, Hichem, Mélanie, Samuel, Simon et Robert. Leurs collaborations et leurs camaraderies ont enrichi mon expérience de recherche. Un remerciement spécial va à mes collègues des laboratoires, parmi lesquels je tiens spécialement à mentionner Marie-France. Elle a été une compagne de route précieuse tout au long de mon parcours universitaire, partageant de nombreuses heures d'étude et de travail. Son amitié a rendu mon expérience universitaire plus agréable et je lui en suis profondément reconnaissante. Je souhaite exprimer ma gratitude envers le Département de chimie et biochimie de l'Université de Moncton, ainsi que les professeures et professeurs qui ont contribué à mon éducation et qui m'ont apporté du soutien tout au long de mes études. Enfin, je tiens à remercier du fond du cœur mon fiancé Shawn, mes amis, ma famille, ma sœur Amélie, ainsi que mes parents, Marie-Lyne et Michel. Leurs soutiens, leurs conseils précieux, et leurs encouragements constants ont été des piliers tout au long de mon parcours universitaire. Je serai toujours reconnaissante pour leur présence dans ma vie.

JURY DE THÈSE

Dr. Luc Boudreau

Département de chimie et biochimie

Université de Moncton (NB)

Président

Dr. Marc Surette

Département de chimie et biochimie

Université de Moncton (NB)

Examineur interne

Dr. Karine Salin

Laboratoire des sciences de l'environnement marin

UBO / CNRS / IRD / Ifremer (France)

Examinatrice externe

Dr. Nicolas Pichaud

Département de chimie et biochimie

Université de Moncton (NB)

Directeur

SOMMAIRE

Les changements climatiques, caractérisés par une hausse des températures moyennes et une augmentation des événements météorologiques extrêmes, ont un impact considérable sur la faune et la flore, en particulier en influençant la performance des animaux ectothermes et leur répartition. L'étude du maximum thermique critique (CT_{max}), qui est une bonne mesure indicatrice de la tolérance thermique au chaud, est cruciale pour comprendre ces répercussions physiologiques dans le contexte des changements climatiques et de la distribution des espèces. L'adaptation des insectes aux variations de température repose sur leur capacité aérobie. Cette étude examine l'influence de la plasticité phénotypique à l'aide de différentes températures d'acclimatation (15 et 24 °C) sur les paramètres métaboliques et physiologiques chez la drosophile et le lien potentiel entre les fonctions mitochondriales et leurs limites thermiques supérieures lorsque mesurés à 15, 24 et 40 °C. Nous avons émis l'hypothèse que l'acclimatation à 15 et 24 °C provoquerait des ajustements physiologiques et mitochondriaux pour permettre une compensation métabolique et que ces ajustements auraient un impact sur l'oxydation des substrats mitochondriaux et la capacité de production d'ATP près du maximum thermique critique (CT_{max}). Nos résultats ont révélé que les drosophiles acclimatées à 15 °C comparés à nos drosophiles acclimatés à 24 °C avaient un 'chill coma recovery time' (une mesure indicatrice de la tolérance au froid) plus élevé, mais un CT_{max} plus bas, ainsi que des modifications de la composition des acides gras membranaires caractérisée par une augmentation des acides gras saturés et monoinsaturés plus courts, mais une diminution des acides gras polyinsaturés. De plus, chez les drosophiles acclimatées à 15 °C, la consommation d'oxygène mitochondriale lors du CI-LEAK (lorsqu'il n'y a pas de phosphorylation oxydative) a grandement diminué lorsque mesuré à 40 °C, mais pas chez le groupe acclimaté à 24 °C. Chez les deux groupes, CI-OXPHOS (respiration cellulaire en présence d'ADP) a diminué drastiquement lorsque mesuré à 40 °C. Cependant, lorsque le G3P et le succinate ont été ajoutés comme substrats, cette diminution était compensée, mais seulement pour les mouches acclimatées à 24 °C, ce qui suggère un impact important de l'acclimatation sur les fonctions mitochondriales liées à la tolérance thermique. Le taux de synthèse d'ATP pour CI-OXPHOS a diminué légèrement entre 24 et 40 °C pour les deux groupes acclimatés. En revanche, l'ajout de la proline a entraîné une augmentation

significative du taux de synthèse de l'ATP, en particulier lorsqu'il est mesuré à 40 °C. Le G3P a augmenté la synthèse d'ATP uniquement chez les mouches acclimatées à 24 °C. L'acclimatation a donc un impact très important sur la consommation d'oxygène mitochondriale et la production d'ATP et influence les capacités mitochondriales lorsque les organismes subissent des températures proches de leur limite thermique supérieure. Cette étude met en évidence l'influence majeure de l'acclimatation sur les fonctions mitochondriales liées à la tolérance thermique et souligne l'interaction complexe entre l'acclimatation à la température, l'utilisation des substrats mitochondriaux et la tolérance thermique chez la drosophile.

ABSTRACT

Climate change, characterized by rising average temperatures and an increase in extreme weather events, has a considerable impact on flora and fauna, influencing the performance of ectothermic animals and their distribution. The study of the critical thermal maximum (CT_{max}), a proxy for upper thermal tolerance, is crucial to understand the physiological repercussions of temperature changes in the context of climate change and species distribution. The adaptation of insects to temperature variations relies on their aerobic capacity. This study examines the influence of phenotypic plasticity with different acclimation temperatures (15 and 24 °C) on metabolic and physiological parameters in *Drosophila* and the potential link between mitochondrial functions and their upper thermal limits measured at 15, 24 and 40 °C. We hypothesized that acclimation to 15 and 24 °C would induce physiological and mitochondrial adjustments to achieve metabolic compensation and that these adjustments would impact mitochondrial substrate oxidation and ATP production capacities near the critical thermal maximum (CT_{max}). Our results revealed that *Drosophila* acclimated to 15 °C had a higher chill coma recovery time (a proxy for cold tolerance) but a lower CT_{max} , and displayed changes in membrane fatty acid composition, with increased saturated and monounsaturated fatty acids with shorter chains but decreased polyunsaturated fatty acids. Furthermore, in *Drosophila* acclimated at 15 °C, CI-LEAK (indicator of the non-phosphorylating respiration) decreased significantly when measured at 40 °C, but not in the group acclimated at 24 °C. In both groups, CI-OXPHOS (with ADP) also decreased drastically when measured at 40 °C. However, when G3P and

succinate were added as substrates, this decrease was compensated, but only for flies acclimated at 24 °C, suggesting a significant impact of acclimation on mitochondrial functions related to thermal tolerance. The rate of ATP synthesis for CI-OXPHOS decreased slightly between 24 and 40 °C for both acclimated groups. In contrast, the addition of proline led to a significant increase in the rate of ATP synthesis, particularly when measured at 40 °C. G3P increased ATP synthesis only in flies acclimated to 24 °C. Thus, acclimation has a very significant impact on mitochondrial oxygen consumption and ATP production and influences mitochondrial capacities when organisms experience temperatures close to their upper thermal limit. This study highlights the major influence of acclimation on mitochondrial functions related to thermal tolerance and underscores the complex interplay between temperature acclimation, mitochondrial substrate utilization and thermal tolerance in *Drosophila*.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
JURY DE THÈSE.....	iii
SOMMAIRE.....	iv
ABSTRACT.....	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTES DES TABLEAUX	ix
LISTES DES FIGURES	x
ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	xi
AVANT-PROPOS	xiv
1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	2
1.1 Effet des changements climatiques sur les animaux.....	2
1.2 Endothermes et ectothermes	2
1.3 Le métabolisme.....	6
1.4 La mitochondrie	10
1.5 Drosophile et mitochondrie dans l'étude de la tolérance thermique.....	19
1.6 Techniques de mesure de la respiration mitochondriale.....	20
1.7 Technique de mesure de production d'ATP et de contenu d'ATP	21
1.8 Hypothèse et objectifs de recherche	22
2 RÉSULTATS : LES MOUCHES À LA HAUSSE : LE RÔLE DE LA PLASTICITÉ PHÉNOTYPIQUE SUR LA SYNTHÈSE DE L'ATP ET LA CAPACITÉ D'OXYDATION DES SUBSTRATS À DES TEMPÉRATURES NORMALES ET ÉLEVÉES CHEZ LES DROSOPHILES (<i>DROSOPHILA</i> <i>MELANOGASTER</i>).....	23
2.1 Sommaire	25
2.2 Abstract.....	26

2.3	Introduction.....	26
2.4	Material and methods.....	30
2.5	Results.....	35
2.6	Discussion.....	49
3	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	56
3.0	Discussion générale	57
3.1	Effet de la température sur le phénotype de l'organisme (HTA et CCR).....	57
3.2	Effet de la température sur le profil d'acide gras.....	58
3.3	Effet de la température sur la respiration mitochondriale.....	60
3.4	Effet de la température sur la production d'ATP	63
3.5	Limites de l'étude	65
3.6	Perspectives.....	67
3.7	Conclusions.....	68
	RÉFÉRENCES	71

LISTES DES TABLEAUX

Table 1 The proportion of fatty acid methyl esters (FAMES) measured in 20-day-old <i>Drosophila melanogaster</i> (WT) males thoraces acclimated 15 or 24 °C (N=8).	37
--	----

LISTES DES FIGURES

Figure 1.1 : Représentation schématique du métabolisme mitochondrial	6
Figure 1.2 : Courbe de performance thermique (TPC).	9
Figure 1.3 : Cycle de vie complet de la drosophile.....	19
Figure 1. Chill coma recovery time assay and CT_{max} of 20-day old <i>Drosophila melanogaster</i> (WT) males acclimated to 15 and 24 °C (N=60).	36
Figure 2. Mitochondrial oxygen consumption rates (OCR) measured at three assay temperatures (15, 24 and 40 °C) of <i>Drosophila melanogaster</i> (WT) males thoraces acclimated to 15 or 24 °C (N = 6).....	41
Figure 3. Substrate contribution ratio (SCR) for proline, succinate and G3P calculated from mitochondrial oxygen consumption rates measured in permeabilized thoraces of 20-day-old <i>Drosophila melanogaster</i> (WT) males acclimated to 15 and 24 °C (N=6).....	43
Figure 4. ATP synthesis rates measured at three assay temperatures (15, 24 and 40 °C) in isolated mitochondria of 20-day-old <i>Drosophila melanogaster</i> (WT) males thoraces acclimated to 15 and 24 °C (N=6).	46
Figure 5. ATP production contribution ratios. Contribution of different substrates to ATP production of 20-day-old <i>Drosophila melanogaster</i> (WT) males thoraces acclimated to 15 and 24 °C (N=6).....	48

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

%	Pourcentage
ADNmt	ADN mitochondrial / mitochondrial DNA
ANT	Adénine nucléotide translocase / Adenine nucleotide translocase
ARN	Acide ribonucléique / Ribonucleic acid
ATP	Adénosine triphosphate / Adenosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
°C	Degré Celsius
CCR	Chill coma recovery
CL	Cardiolipine
CoQ	Coenzyme Q ou ubiquinone
CoQH ₂	Ubiquinol
CI	Complexe I : NADH déshydrogénase
CII	Complexe II : Succinate déshydrogénase
CIII	Complexe III : Ubiquinone cytochrome c oxydoréductase
CIV	Complexe IV : Cytochrome c oxydase
CV	Complexe V : ATP synthase
CS	Citrate Synthase
CT _{max}	Maximum thermique critique / Critical thermal maximum
Cyt c	Cytochrome C
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
ETF	Electron transferring flavoprotein
ETS	Système de transport d'électrons / Electron transport system

FADH ₂ / FAD	Flavine adénine dinucléotide / Falvin adenine dinucleotide
FAMEs	Fatty acid-methylated esters
FMN	Flavine mononucléotide / Mononucleotide flavin
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy) phenylhydrazone / Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone
Fe-S	Groupements fer-soufre / iron-sulfur groups
G3P	Glycérol-3-phosphate / Glycerol-3-phosphate
G3PDH	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase / Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
G6P	Glycérol-6-phosphate / Glycerol-6-phosphate
G6PDH	Glycérol-6-phosphate déshydrogénase / Glycerol-6-phosphate dehydrogenase
GC-FID	Chromatographie gazeuse - détecteur d'ionisation par flamme / Gas chromatography with flame ionization detector
GTP	Guanosine triphosphate
H ⁺	Proton
HK	Hexokinase
HSP	Protéines de choc thermique / Heat shock proteins
Lm	Linear model
Lme	Linear mixed model
mtG3PDH	Glycérol-3 -phosphate déshydrogénase mitochondriale/ Mitochondrial glycerol-3 -phosphate dehydrogenase
NADH/NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide/

	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
O ₂	Oxygène moléculaire / Molecular oxygen
OCR	Oxygen consumption rates
OXPPOS	Phosphorylation oxydative / Oxydative phosphorylation
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Phosphatidylcholine
PDH	Pyruvate déshydrogénase / Pyruvate dehydrogenase
PE	Phosphatidyléthanolamine
PI	Phosphatidylinositol
Pi	Phosphate inorganique / Inorganic phosphate
ProDH	Proline déshydrogénase / Proline dehydrogenase
•Q-	Semiquinone
QH ₂	Ubiquinol
ROS	Espèces réactives de l'oxygène / Reactive oxygen species
Rpm	Rotation par minute / Revolution per minute
TCA	Cycle de l'acide tricarboxylique / Tricarboxylic acid cycle
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine
Topt	Optimum thermique des processus biologiques / Thermal optimum of biological processes
TPC	Courbe de performance thermique / Thermal performance curve

AVANT-PROPOS

Cette thèse ne suit pas le format traditionnel de thèse décrite par l'Université de Moncton, mais un format de thèse par article. L'introduction et la discussion générale sont rédigées en français comme l'exige la Faculté des Études Supérieures et de la Recherche de l'Université de Moncton.

Le deuxième chapitre de cette thèse est représenté par le manuscrit « Flies on the Rise : The Role of Phenotypic Plasticity on ATP Synthesis and Substrate Oxidation Capacity at Normal and High Temperatures in *Drosophila melanogaster* » qui sera soumis pour publication dans le journal (Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences).

Les manipulations de laboratoire (sauf certaines expériences), les analyses statistiques, la recherche bibliographique et la rédaction des manuscrits ont toutes été effectuées par Arianne Blanchard sous la supervision du Dr. Nicolas Pichaud.

1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Effet des changements climatiques sur les animaux

Les changements climatiques sont un enjeu mondial important et la cause principale de la hausse des températures moyennes, de l'augmentation de la fréquence des événements météorologiques extrêmes, du déplacement des populations, des modifications des habitats de la faune, de la montée des mers, etc. (Zhao et al., 2022). Les dernières années sont parmi les records des années les plus chaudes depuis 1880 (Menzel & Feldmeyer, 2021). Ces changements impactent grandement la population animale et végétale de la planète avec diverses conséquences sur leur évolution et leur écologie (Menzel & Feldmeyer, 2021). Notamment, la température a un effet important sur la performance des animaux ectothermes et affecte leur distribution et leur abondance (Chung et al., 2018). Avec l'augmentation des températures moyennes et l'augmentation de fréquence d'événements de températures extrêmes, il est important d'étudier les effets physiologiques de la température et de caractériser le maximum thermique critique (CT_{max}) des organismes dans différents contextes environnementaux. Le CT_{max} est la température pour laquelle les fonctions d'un organisme deviennent non-coordonnées au cours d'une augmentation de température aigüe. La perte de fonction et la mortalité associées au stress thermique ne sont pas encore bien comprises chez les organismes. Considérant que la température définit les tolérances thermiques et est très importante pour la répartition géographique des organismes, l'étude du CT_{max} est donc pertinente pour la distribution des espèces et des populations dans le contexte des changements climatiques (Jørgensen et al., 2021).

1.2 Endothermes et ectothermes

De façon générale, les animaux peuvent être divisés en deux groupes en fonction de comment ils régulent leur température corporelle, soit les endothermes et les ectothermes. Les organismes endothermes, comme les mammifères et les oiseaux, maintiennent leur température corporelle à une température favorable grâce à la chaleur libérée par leur métabolisme interne. Cependant, les organismes ectothermes, comme la plupart des insectes et les poissons, ne produisent pas assez de chaleur interne pour maintenir leur température corporelle constante, et dépendent donc de leur environnement. Ils peuvent

réguler leurs températures corporelles en utilisant des stratégies telles que des adaptations comportementales comme ajuster leurs niveaux d'activité, chercher un abri ou changer leur emplacement (Flouris & Piantoni, 2015).

1.2.1 Le processus d'acclimatation et d'adaptation chez les animaux

Le processus d'acclimatation et le processus d'adaptation chez les animaux sont des mécanismes développés par les animaux pour atténuer l'impact des divers changements dans leurs environnements (Collier et al., 2019). Ces deux processus requièrent des ajustements, mais ont des mécanismes distincts. Le processus d'acclimatation est défini comme la réponse phénotypique coordonnée développée par les animaux face à un facteur de stress spécifique dans leur environnement (Ownby et al., 2002). L'acclimatation permet aux organismes d'ajuster leurs traits en réponse aux changements de leurs environnements, ceci se fait relativement à court terme, c'est-à-dire durant la vie d'un organisme. Les processus d'acclimatation sont habituellement réversibles. Par exemple, la plasticité des CT_{max} est une réponse flexible aux conditions changeantes, elle fournit un mécanisme qui permet l'amélioration de la tolérance thermique et permet à l'individu de faire face à des températures plus intenses. En d'autres mots, l'acclimatation permet une telle plasticité : une exposition à une haute température préalable qui aurait changé le CT_{max} , permet aux organismes de survivre et de performer à des températures plus intenses. D'autres exemples d'acclimatation au niveau physiologique et cellulaire existent et seront décrits dans les prochains paragraphes.

Le processus d'adaptation est lui un processus génétique par lequel une population change pour s'adapter à l'environnement (Ownby et al., 2002). Ce processus se produit à long terme, c'est-à-dire sur plusieurs générations. L'adaptation peut impliquer des changements génétiques, car l'environnement défavorable persiste sur plusieurs générations d'une espèce. Un changement génétique, comme une variation ou une mutation, peut bénéficier à la survie d'un animal (Collier et al., 2019). Le processus d'adaptation permet aux animaux de survivre face à diverses situations, par exemple des prédateurs ou les conditions climatiques de leurs écosystèmes.

1.2.2 Effet de la température au niveau cellulaire

Les processus d'acclimatation et d'adaptation sont donc deux stratégies qui englobent la façon dont les animaux font face aux changements de leurs environnements et notamment aux changements thermiques, car la température est probablement le facteur environnemental qui a le plus de conséquences chez les animaux. Des températures trop basses ou trop hautes peuvent compromettre l'activité métabolique et l'activité physiologique des organismes. Chez les insectes, qui représentent plus de 70% de toutes les espèces animales (Marques & Imler, 2016) et qui seront le modèle d'étude abordé dans cette thèse, plusieurs modifications au niveau cellulaire ont lieu à la suite de changements de températures. Sur de longues périodes, des changements évolutifs dans les réponses de température peuvent se produire en fonction de différences individuelles héréditaires par la transmission de gènes codant pour certains traits d'histoire de vie sur plusieurs générations. Bien que ces adaptations évolutives puissent être rapides dans certains organismes (Hoffmann & Sgrò, 2011), l'acclimatation est cependant plus commune afin de faire face à des changements de températures sur le court terme, c'est-à-dire durant la vie d'un individu. Ainsi, la capacité d'acclimatation est dite importante pour la tolérance thermique des insectes, car il est souvent suggéré que cette capacité d'acclimatation thermique pourrait être importante pour atténuer les conséquences du changement climatique chez ces organismes, surtout considérant la rapidité de ces changements (Sørensen et al., 2016). De nombreux ajustements cellulaires peuvent avoir lieu lors de l'acclimatation thermique. Par exemple, chez la *Drosophila melanogaster* qui porte aussi le nom commun de drosophile, il est connu que l'acclimatation peut induire des modifications de l'expression des gènes et de la physiologie. Des exemples de mécanisme possible pour l'adaptation à la température pour les drosophiles seraient les protéines de choc thermique (HSP), les antioxydants, la composition lipidique membranaire, la régulation des réserves énergétiques, la concentration en sucre ou polyol, le taux métabolique et la compensation métabolique (Hoffmann et al., 2003). Les températures élevées induisent un choc thermique ou une réponse au stress, ce qui conduit à l'expression des HSP et d'antioxydants (Hoffmann et al., 2003). La température impacte divers processus biologiques et à des effets sur la composition membranaire et les phospholipides membranaires. Lorsque la température change, la fluidité des phospholipides

membranaires change. Ceci peut aussi affecter l'interaction et l'activité des enzymes associés à la membrane. Par exemple, l'adaptation homéovisqueuse est un remodelage de la membrane pour maintenir une certaine fluidité membranaire avec les changements de températures (Hazel, 1995; Sinensky, 1974). Le remodelage des membranes peut changer la composition et la distribution des phospholipides et ainsi les processus de transport à travers des membranes et l'activité des protéines membranaires (Chung et al., 2018). De plus, les réserves d'énergie peuvent influencer la résistance au froid. Par exemple, Misener et al. (2001) ont découvert que la proline agissait comme une réserve d'énergie et était également associée à une résistance au froid et d'endurcissement au froid. Chez des lignées de drosophiles démontrant de la résistance aux blessures causées par le froid, la proline était plus abondante. En effet, chez des insectes comme certaines espèces de mouches, de crickets et de coléoptères, l'acclimatation au froid et la tolérance au froid sont corrélées positivement avec une augmentation significative des niveaux de proline (Bursell & Slack, 1976; Misener et al., 2001; Sacktor & Childress, 1967). De plus, le glycogène et les protéines agissent également comme réserves d'énergie. Ceux-ci peuvent améliorer la survie des espèces à des températures froides extrêmes (Misener et al., 2001). Le maintien de l'homéostasie cellulaire est difficile pour les insectes ectothermes, car ils peuvent être exposés à de basses températures dans la nature. Les insectes sont capables d'ajuster leurs mécanismes physiologiques pour favoriser leur tolérance au froid, on appelle ceci l'acclimatation thermique. L'acclimatation chez la drosophile provoque la compensation thermique de diverses enzymes métaboliques et une augmentation compensatoire des taux métaboliques ce qui correspond à la compensation métabolique (Colinet et al., 2017). De plus, il est suggéré que la tolérance au froid est liée à la capacité de maintenir la capacité bioénergétique sous le stress dû au froid (Colinet et al., 2017). D'ailleurs, une étude de Colinet et al. (2017) effectuée sur des drosophiles acclimatées à basse température (15 °C) et des drosophiles contrôles (24 °C) démontre que les drosophiles acclimatées à basse température maintiennent une production d'ATP plus élevée que les drosophiles contrôles (Colinet et al., 2017). Les ajustements au niveau cellulaire sont donc cruciaux pour la survie des cellules et de l'organisme pour qu'ils fonctionnent de façon attendue dans diverses conditions environnementales. Ces processus permettent aux cellules et aux organismes de pouvoir non seulement maintenir l'homéostasie, mais de se protéger des

diglycérides sont transformés dans le cytosol avant d'entrer dans les mitochondries. À l'intérieur de la matrice mitochondriale, ces substrats produisent des équivalents réducteurs (tels que NADH ou FADH₂) qui sont utilisés pour transporter les électrons des complexes mitochondriaux intégrés dans la membrane interne mitochondriale vers l'oxygène moléculaire. Ce transport permet la génération d'un gradient de protons qui alimente à son tour l'ATP synthase, générant de l'ATP (adapté de Cormier et al., 2019).

1.3.1.1 Le métabolisme anabolique et catabolique

Les réactions métaboliques peuvent être cataboliques ou anaboliques. Le catabolisme est la phase de dégradation du métabolisme. Les voies cataboliques libèrent de l'énergie, dont une partie est conservée dans la formation d'ATP et de transporteurs d'électrons réduits, le reste est dissipé sous forme de chaleur. Les réactions cataboliques impliquent la dégradation des protéines, des glucides et des lipides pour donner des plus petites molécules comme les acides aminés, le glucose et les acides gras (Nelson et al., 2008). L'anabolisme est la phase de biosynthèse du métabolisme. Elle nécessite un apport d'énergie sous forme du potentiel de transfert de l'ATP et du pouvoir réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et flavine adénine dinucléotide (FADH₂) (Nelson et al., 2008). Les réactions anaboliques requièrent un apport d'énergie et impliquent la synthèse de macromolécules comme les protéines, les glucides, les lipides et les acides nucléiques.

1.3.1.2 Le métabolisme anaérobie et aérobie

Il existe deux voies pour la production d'ATP, soit la voie anaérobie (sans oxygène) et la voie aérobie (avec oxygène). Ces deux voies ont en commun la glycolyse (bien que la voie aérobie puisse utiliser d'autres carburants tels que les acides gras) qui est une série de 10 réactions enzymatiques conservée évolutivement se déroulant dans le cytosol. Brièvement, lors de la glycolyse, une molécule de glucose va être dégradée en deux phases, soit la phase préparatoire (consommation d'ATP) et la phase payante (production d'ATP), pour finir avec deux molécules de pyruvate qui peuvent être converties en lactate selon la disponibilité en oxygène. Une partie de l'énergie libérée du glucose est aussi conservée dans la production de deux molécules de NADH. Le métabolisme anaérobie se fait sans consommation d'oxygène et utilise majoritairement les réserves pour la production d'ATP

et le rendement d'ATP est faible comparativement à la voie aérobie. Le métabolisme anaérobie est essentiellement dépendant de la glycolyse anaérobie aussi connue comme la fermentation lactique. La glycolyse anaérobie produit deux molécules de pyruvate, deux molécules d'ATP et deux molécules de NADH par molécule de glucose et en absence d'oxygène, le pyruvate est converti en lactate afin d'assurer la régénération du NAD⁺ à partir du NADH pour maintenir la glycolyse et finalement pour continuer la production d'ATP de manière anaérobie.

Le métabolisme aérobie consomme de l'oxygène, utilise les réserves et l'alimentation et a un plus grand rendement en valeur d'ATP. Bien que le métabolisme aérobie puisse commencer par la glycolyse, le rendement en ATP de cette voie est beaucoup plus important que le métabolisme anaérobie, car le pyruvate en présence d'oxygène va entrer dans la mitochondrie où il va subir d'autres transformations afin de générer plus d'ATP. Les acides gras et les acides aminés provenant de la dégradation des lipides et des protéines peuvent aussi entrer dans la mitochondrie et participer au métabolisme aérobie. Le métabolisme aérobie se déroule donc principalement dans les mitochondries et se compose de plusieurs étapes interconnectées et notamment le cycle de l'acide carboxylique (TCA), le transport des électrons dans le système de transport des électrons (ETS) et la synthèse de l'ATP par la phosphorylation oxydative (OXPHOS). L'oxygène est essentiel dans ce processus, car il agit comme accepteur final d'électrons dans l'ETS, permettant la création d'un gradient de protons qui servira à la production d'ATP (Nelson et al., 2008). Les paragraphes suivants fourniront une description approfondie de ces processus.

1.3.1.3 Effets de l'augmentation de la température sur le métabolisme aérobie

La température impacte grandement le métabolisme aérobie. Plus la température augmente, plus la vitesse des processus métaboliques aérobie augmente puis diminue rapidement à des températures plus élevées, cette réponse est bien décrite avec une courbe de performance thermique (TPC) qui s'applique aussi à d'autres processus biologiques (Fig. 1.2).

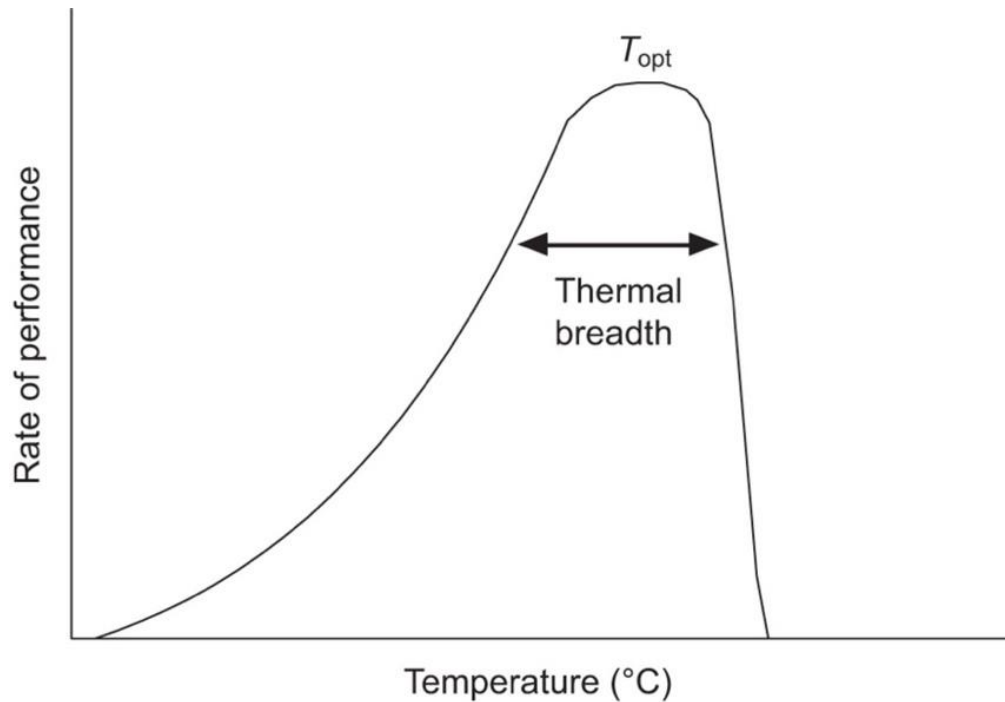


Figure 1.2 : Courbe de performance thermique (TPC). La TPC décrit l'effet de la température sur la vitesse des processus biologiques. Les caractéristiques typiques d'une TPC sont la pente (augmentation de la vitesse avec la température), l'optimum thermique des processus biologiques (T_{opt}) et la largeur thermique (plage de températures sur laquelle la vitesse des processus est maximisée) (adapté de Schulte, 2015).

Les hautes températures accélèrent les réactions biochimiques impliquées dans le métabolisme aérobie. En conséquence, les organismes ont tendance à avoir des besoins énergétiques plus élevés et à consommer plus d'oxygène et de nutriments pour répondre à ces besoins (Schulte, 2015). La température affecte l'activité des enzymes qui ont toutes des températures optimales pour un fonctionnement efficace. Pour la plupart des organismes, cette température se situe dans une certaine échelle de température et si la température monte ou diminue par rapport à cette température optimale, l'activité enzymatique est impactée. Des températures extrêmes peuvent impacter négativement le métabolisme aérobie en affectant l'efficacité des enzymes. Le métabolisme aérobie, surtout des ectothermes, dépend fortement de la température et peut être limité par un apport insuffisant d'oxygène. À des températures élevées ou lors d'activités intenses, l'apport en oxygène ne peut plus répondre à l'augmentation de la demande en oxygène causé par ces

stress, et le métabolisme anaérobie peut alors entrer en jeu (Rubalcaba et al., 2020). L'efficacité de la conversion de l'énergie au cours du métabolisme aérobie peut être influencée par la température. Dans certains cas, des températures plus élevées peuvent diminuer l'efficacité globale de la production d'énergie. En effet, l'augmentation du taux métabolique peut entraîner une plus grande proportion d'énergie dissipée sous forme de chaleur. En conséquence, les organismes peuvent avoir besoin de consommer plus de nutriments pour maintenir leur équilibre énergétique. Considérant que 90% de l'oxygène consommé par un organisme est utilisé pour la respiration mitochondriale afin de produire de l'ATP, la mitochondrie est considérée comme étant le centre névralgique du métabolisme aérobie et est donc aussi grandement impactée par la température.

1.4 La mitochondrie

La mitochondrie est un organite eucaryote d'origine endosymbiotique, qui conserve son propre génome et sa propre machinerie d'expression génique. La mitochondrie a plusieurs rôles dans le métabolisme cellulaire et elle est souvent décrite comme étant la « centrale énergétique » de la cellule, car elle participe au processus de conversion d'énergie sous forme d'ATP dérivée de nutriments (Fontanesi, 2015).

1.4.1 La structure de la mitochondrie

La mitochondrie est un organite retrouvé dans le cytosol composé d'une bicouche de phospholipides. Elle est composée de deux membranes, une membrane interne et une membrane externe qui délimitent le milieu extracellulaire, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. La membrane interne est structurée en crêtes, des invaginations qui sont observables au microscope. Ces crêtes augmentent la surface de la membrane interne qui contient les principales enzymes de l'OXPPOS. De plus, l'ADN mitochondrial (ADNmt) est retrouvé dans la matrice, qui elle est associée à la membrane interne. Les membranes internes et externes sont caractérisées par une composition différente en phospholipides. Les classes majeures de phospholipides retrouvés dans les membranes mitochondriales sont la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) ainsi que la cardiolipine (CL) (Schenkel & Bakovic, 2014). L'interaction entre les phospholipides et les protéines est importante, spécialement pour la membrane interne mitochondriale, car on y retrouve plusieurs protéines de la phosphorylation oxydative et

leurs bons fonctionnements dépendent de la composition en phospholipides de la membrane. La membrane interne est imperméable à la plupart des ions et des molécules, ce qui est essentiel pour maintenir le gradient de protons nécessaire à la synthèse de l'ATP. Sa composition en phospholipides est différente de celle de la membrane externe. La membrane interne est enrichie en CL, un phospholipide qu'on trouve principalement dans les membranes mitochondriales (Schenkel & Bakovic, 2014). La CL est importante pour le maintien du potentiel membranaire, de l'architecture, de la membrane mitochondriale interne et pour le soutien structurel et fonctionnel à plusieurs protéines impliquées dans la respiration mitochondriale. La membrane externe est relativement poreuse et permet le passage d'ions, de métabolites et de petites molécules. Elle contient une forte proportion de PC et la PE et le phosphatidylinositol (PI) sont également présents, mais dans une moindre mesure. Les mitochondries sont aussi des organites très dynamiques qui forment un réseau étendu à l'intérieur de la cellule et ce réseau subit les processus mitochondriaux de fusion, de fission et de mobilité selon les conditions cellulaires (Schenkel & Bakovic, 2014).

1.4.2 Les fonctions de la mitochondrie

La mitochondrie a plusieurs fonctions et rôles. Elle est entre autres impliquée dans l'homéostasie du calcium, la mort cellulaire programmée et l'apoptose. Elles jouent aussi un rôle dans la biosynthèse des acides aminés, des bases nucléiques et des lipides. De plus, la mitochondrie est importante pour la production d'énergie, car de nombreuses enzymes constituant les voies cataboliques principales comme le cycle TCA, la β -oxydation, l'ETS et l'OXPPOS se retrouvent dans la mitochondrie. Ces voies sont responsables de la majorité de la production de l'ATP via la respiration cellulaire. Pour les organismes aérobies, la majorité de l'ATP se fait via la respiration aérobie. Une fois que les nutriments ont été convertis, ils peuvent entrer dans la mitochondrie sous différentes formes (essentiellement pyruvate, acides aminés et acides gras) afin d'intégrer le cycle TCA qui produit les équivalents réduits nécessaires à la respiration cellulaire par l'ETS et à la synthèse d'ATP par l'OXPPOS.

Le pyruvate produit par la glycolyse peut entrer dans la matrice mitochondriale et être oxydé en acétyl-CoA avec NADH comme produit, par une décarboxylation catalysée par le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) (Nelson et al., 2008). Les acides

gras vont être aussi transportés dans la matrice mitochondriale où ils subiront la β -oxydation qui produit plusieurs acétyl-CoA ainsi que des molécules de FADH_2 et de NADH . Certains acides aminés peuvent aussi être convertis en acétyl-CoA ou intégrer le cycle TCA en se transformant en d'autres intermédiaires de ce cycle. Les acétyl-CoA produits par ces voies vont ensuite subir les réactions du cycle TCA.

1.4.3 Le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA)

L'acétyl-CoA est un intermédiaire métabolique très important et l'intrant le plus utilisé dans le cycle TCA, produit par plusieurs voies métaboliques telles la glycolyse, l'oxydation des acides aminés et la β -oxydation. Le cycle TCA est la voie majeure contributrice de l'apport en NADH et en FADH_2 , et participe aussi à la formation directe d'un guanosine triphosphate (GTP). Ces équivalents réduits vont permettre le transfert des électrons à l'ETS pour la production d'ATP via l'OXPPOS. Le cycle TCA est un cycle de 10 étapes catalysées par 8 enzymes : la citrate synthase, l'aconitase, l'isocitrate déshydrogénase (produit du NADH), le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase (produit du NADH), la succinyl-CoA synthétase (produit du GTP), la succinate déshydrogénase (produit du FADH_2), la fumarase et la malate déshydrogénase (produit du NADH) (Nelson et al., 2008).

1.4.4 Le système de transport des électrons (ETS) et la phosphorylation oxydative (OXPPOS)

L'ETS se déroule dans les crêtes de la membrane interne mitochondriale. L'ETS est composé de quatre complexes (CI, CII, CIII et CIV) enchâssés dans la membrane interne de la mitochondrie et de deux transporteurs d'électrons mobiles, le coenzyme Q (CoQ) ou l'ubiquinone et le cytochrome C (cyt c). L'ordre du transfert des électrons au niveau des protéines de l'ETS est généralement CI, CII, CoQ, CIII, cyt c et CIV.

Complexe I (CI) : NADH déshydrogénase

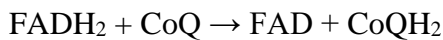
Le CI, qui porte aussi le nom de NADH déshydrogénase ou encore NADH -ubiquinone oxydoréductase, est situé dans la membrane interne et constitue le point principal de l'entrée des électrons à partir du NADH jusqu'au CoQ. Ce complexe est composé de flavine mononucléotide (FMN) et de six groupements fer-soufre (Fe-S). Le

NADH mitochondrial essentiellement produit par le cycle TCA (ou celui produit par la glycolyse et transporté dans la mitochondrie) est oxydé, ce qui permet le transfert de 2 électrons du NADH au FMN. Ensuite, ils sont transférés aux groupements Fe-S et finalement au CoQ. Pendant ce processus, quatre ions d'hydrogène vont passer de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire, ce qui contribue au gradient électrochimique (Ahmad et al., 2022). Ce transfert à un bilan de :



Complexe II (CII) : Succinate déshydrogénase

Le CII, qui porte aussi le nom de succinate déshydrogénase, passe les électrons du succinate qui est un intermédiaire du cycle TCA jusqu'au CoQ. Ce complexe fait donc à la fois partie du cycle TCA et de l'ETS, et n'a pas d'activité de pompage de protons. Lorsque le succinate s'oxyde en fumarate, deux électrons vont être acceptés par le FAD de l'enzyme devenant du FADH₂. Le FADH₂ transfère les électrons au groupement Fe-S et ensuite au CoQ (Ahmad et al., 2022), le bilan de cette réaction est :



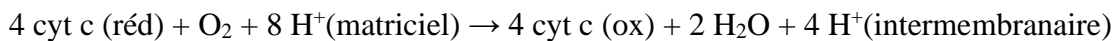
Complexe III (CIII) : Ubiquinone cytochrome c oxydoréductase

Le CIII, aussi connue comme l'ubiquinone cytochrome c oxydoréductase, est composé de cytochromes bL, bH et c1 ainsi que de deux centres Fe-S. Les protéines cytochromes sont impliquées dans le transfert des électrons et elles contiennent un groupe hème. Le CIII transfère les électrons du CoQH₂ au cyt c qui ne peut seulement accepter qu'un électron à la fois. Le transfert des deux électrons du CoQH₂ doit donc se faire en deux étapes. La première étape implique la liaison de l'ubiquinol (CoQH₂) et de CoQ au CIII. Le CoQH₂ transfère un électron vers Fe-S jusqu'au cyt c1 puis au cyt c, et un autre électron vers cyt bL, bH jusqu'au CoQ. Ceci résulte en la réduction partielle de CoQ en semiquinone (•Q⁻). La deuxième étape du cycle Q implique la répétition de la première étape, un nouveau CoQH₂ se lie et transfère deux électrons (comme l'étape 1). Cette fois, la •Q⁻ est réduite complètement en CoQH₂. Le CIII relâche quatre protons dans l'espace intermembranaire après chaque plein cycle de cycle Q (Ahmad et al., 2022), le bilan de cette réaction est :



Complexe IV (CIV) : Cytochrome c oxydase

Le CIV, ou cytochrome c oxydase, oxyde le cyt c et transfère les électrons à l'oxygène moléculaire (O₂), l'accepteur final du système de transport des électrons. Les protéines du cytochrome a et a₃, et les groupes hème et cuivre transfèrent les électrons à l'O₂, ce qui le convertit en molécules d'eau (H₂O). L'énergie libre du transfert d'électrons cause le déplacement de quatre protons dans l'espace intermembranaire, ce qui contribue au gradient de protons. Ce processus se répète quatre fois, ou la réduction l'O₂ donne deux molécules d'H₂O (Ahmad et al., 2022), représentant un bilan de :



Complexe V (CV) : ATP synthase

Le CV, l'ATP synthase ou F₁F₀ ATPase (Whitehouse et al., 2019) utilise le gradient de proton généré par les transferts d'électrons dans la membrane interne pour former l'ATP par le processus d'OXPHOS. L'ATP synthase est composé de deux sous-unités F₀ et F₁ qui agissent comme un système moteur de rotation. F₀ est situé dans la membrane interne mitochondriale et F₁ est situé dans la matrice mitochondriale. Les protons passent de l'espace intermembranaire à la matrice par F₀ ce qui cause la rotation qui à son tour change la configuration de F₁. Ces changements catalysent la formation d'ATP à partir de l'ADP et de phosphate inorganique (Pi). Pour 4H⁺, une molécule d'ATP est produite (Ahmad et al., 2022), car 3H⁺ sont nécessaires pour effectuer la catalyse par rotation et 1H⁺ est nécessaire pour transporter le Pi dans la matrice mitochondriale.

1.4.5 Les voies alternatives pour l'entrée des électrons dans l'ETS

Chez les animaux, le point d'entrée des électrons via le CI et CII est bien documenté. Il existe, cependant, des entrées dites « alternatives » pour les électrons dans l'ETS. Une de ces entrées alternatives est la flavoprotéine déshydrogénase à transfert d'électrons (ETF DH). Cette enzyme accepte les électrons du FADH₂ formé par l'acyl-CoA déshydrogénase lors de l'oxydation des acides gras et ensuite les transfère à l'ubiquinone (Olsen et al., 2003). Une autre voie pour l'entrer des électrons est la proline déshydrogénase (ProDH), qui transfère les électrons provenant du FADH₂ formé lors de

l'oxydation de la proline directement à CoQ (Abrahamson et al., 1983; Wanduragala et al., 2010). La glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale (mG3PDH) est une autre voie qui permet l'entrée des électrons dans l'ETS via la navette glycérol-3-phosphate (G3P) (McDonald et al., 2018). Elle est composée de la G3PDH cytosolique (cG3PDH) et de la G3PDH mitochondriale (mG3PDH). La cG3PDH catalyse la transformation du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en G3P couplé avec l'oxydation du NADH en NAD^+ . La mG3PDH peut par la suite oxyder le G3P en DHAP, cette réaction est couplée avec le transfert d'électron pour réduire le FAD en FADH_2 et transférer les électrons jusqu'à la jonction Q. Les voies alternatives pour l'entrée des électrons dans l'ETS donnent une flexibilité à la mitochondrie au niveau des choix des métabolites qui seront oxydés selon les conditions (McDonald et al., 2018).

1.4.6 La mitochondrie comme déterminante des limites de tolérance thermique

De hautes températures peuvent perturber les fonctions des mitochondries, surtout chez les ectothermes. La demande métabolique augmente avec la température, donc pour maintenir l'homéostasie cellulaire, la respiration mitochondriale doit suivre (Blier et al., 2014; Jørgensen et al., 2021; Schulte, 2015). Par conséquent, la sensibilité thermique des mitochondries a été suggérée comme étant importante pour la tolérance thermique. Plusieurs études (Chung & Schulte, 2020; Harada et al., 2019; Iftikar & Hickey, 2013; Jørgensen et al., 2021; Melzner et al., 2006) démontrent des liens forts entre les CT_{max} et l'échec du métabolisme aérobie. Le mécanisme spécifique qui cause cet échec n'est pas encore connu, mais certaines fonctions mitochondriales telles que la consommation d' O_2 , l'oxydation des substrats, la production d'ATP et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) semblent être impliquées lors d'augmentations de la température, bien que peu d'études aient évalué spécifiquement ces paramètres. Notamment, la mesure de la production d'ATP à haute température pourrait aider à mieux comprendre la nature du lien entre l'échec du métabolisme mitochondrial et la tolérance thermique, car il pourrait s'agir du paramètre le plus fort reliant les deux processus (Chung & Schulte, 2020). Des études récentes (Jørgensen et al., 2021; Menail et al., 2022) effectuées sur des insectes démontrent la flexibilité mitochondriale à des températures surpassant les températures limites de l'organisme. La plupart des études sur les effets de la température chez les ectothermes se

sont concentrées sur des invertébrés aquatiques ou des poissons, alors que seulement quelques études ont utilisé des insectes comme modèle de recherche même si les insectes représentent au-delà de 70% de toutes les espèces animales (Jørgensen et al., 2021; Stork, 2018).

1.4.6.1 La mitochondrie et leur flexibilité

Le processus de flexibilité mitochondriale fait référence à leur capacité à s'ajuster et à répondre à différentes conditions physiologiques et changements environnementaux. Les mitochondries possèdent une nature hautement dynamique, subissant constamment des processus de fission et de fusion pour maintenir leur forme, leur distribution et leur efficacité fonctionnelle (Chung & Schulte, 2020). Ce comportement dynamique permet aux mitochondries de répondre aux demandes cellulaires, telles que les besoins énergétiques et de maintenir une fonction cellulaire optimale. Un aspect clé de la flexibilité mitochondriale est la capacité à réguler la production d'énergie en fonction des besoins de la cellule. Les mitochondries peuvent ajuster leur activité en réponse aux signaux de la cellule, tels que les changements dans la disponibilité des nutriments, les niveaux d'oxygène ou la demande énergétique. Par exemple, pendant les périodes de demande énergétique accrue, les mitochondries peuvent améliorer leur production d'ATP en augmentant le taux d'O_XPHOS, le processus par lequel l'ATP est générée dans les mitochondries. Les mitochondries sont également impliquées dans divers autres processus cellulaires au-delà de la production d'énergie. Ils jouent un rôle vital dans l'apoptose (mort cellulaire programmée) en libérant des protéines spécifiques qui initient ce processus. De plus, les mitochondries sont impliquées dans la signalisation du calcium, la régulation des ROS et la synthèse de certaines molécules nécessaires au fonctionnement cellulaire.

1.4.6.2 La tolérance thermique et complexe I de la mitochondrie

Le CI, du système de transport des électrons, est connu comme étant une cible potentielle de dommages mitochondriaux qui seraient causés par une exposition à de hautes températures (El-Wadawi & Bowler, 1996; Jørgensen et al., 2021). Pour mieux explorer le rôle du CI comme site de dommage, Jørgensen et al. (2021) ont utilisé un modèle comparatif de différentes espèces de drosophiles ayant différentes tolérances thermiques (6 espèces différentes) pour évaluer l'effet des hautes températures sur la respiration

mitochondriale lorsque différents substrats étaient oxydés. Ils ont démontré que bien que la consommation d'O₂ en présence de substrats du CI et d'ADP (CI-OXPHOS) diminuait à des températures élevées, cet échec était compensé par l'oxydation de substrats alternatifs comme la proline, le succinate et surtout le G3P. Ceci suggère une flexibilité mitochondriale importante à des températures dépassant le CT_{max} des organismes et que le changement d'oxydation des substrats entre le CI et les complexes alternatifs est crucial pour l'établissement de la tolérance thermique des organismes. De plus, une étude de Menail et al. (2022) qui a été effectuée sur l'abeille domestique, *Apis mellifera*, la drosophile, *Drosophila melanogaster* et le doryphore de pomme de terre, *Leptinotarsa decemlineat* a démontré que les taux de respiration de CI-OXPHOS étaient sensibles à la température chez les trois espèces et démontraient une grande consommation d'oxygène à températures moyennes et une baisse de consommation d'oxygène à hautes températures. L'oxydation de la proline a déclenché une augmentation majeure de la respiration chez les doryphores de la pomme de terre, alors que l'oxydation du succinate et du G3P a permis une augmentation importante de la respiration à haute température chez les abeilles et les drosophiles. Ceci a donc confirmé l'utilisation différentielle de substrats mitochondriaux à hautes températures chez différentes espèces d'insecte. À 45 °C cependant, le taux de respiration induit par l'oxydation du G3P a drastiquement chuté pour les drosophiles. Ces résultats démontrent une flexibilité mitochondriale importante, mais spécifique à l'espèce pour l'oxydation du substrat afin de maintenir des niveaux de consommation d'oxygène élevés à de hautes températures et suggèrent des mécanismes d'adaptation à la température pour les mitochondries des insectes volants. Comprendre la relation entre la tolérance thermique et le CI est essentiel pour comprendre comment les organismes réagissent aux changements de température et aux impacts potentiels du changement climatique. Des recherches plus approfondies dans ce domaine pourraient fournir des informations sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à la tolérance thermique et contribuer à notre compréhension des adaptations physiologiques nécessaires à la survie dans différents environnements thermiques. Cependant, bien que ces études aient mis en évidence l'importance de l'oxydation des substrats dans la consommation d'oxygène mitochondriale à hautes températures, d'autres fonctions mitochondriales comme la production d'ATP sont encore à étudier.

1.4.6.3 Le rôle de la production d'ATP sur la tolérance thermique

Les mitochondries possèdent un rôle central dans le métabolisme énergétique, ce qui suggère qu'elles seraient peut-être étroitement liées à la tolérance thermique des ectothermes (Harada et al., 2019). Comme dit précédemment, le métabolisme aérobie des organismes ectothermes est grandement affecté par la température et la demande métabolique augmente avec la température. Au niveau cellulaire, cela implique que les mitochondries doivent ajuster leur consommation d'oxygène pour fournir la quantité d'ATP nécessaire pour répondre à cette demande métabolique (Blier et al., 2014; Chung & Schulte, 2020; Menail et al., 2022; Schulte, 2015). La sensibilité thermique des mitochondries a été suggérée comme une explication possible de la défaillance de l'organisme à haute température (Menail et al., 2022), notamment car la demande augmentée en ATP pourrait ne pas être couverte par la production d'ATP, ce qui par la suite affecterait l'organisme au complet. En effet, il a été suggéré que la perte de capacité de synthèse d'ATP mitochondriale dans le cœur des poissons se produit près des températures inférieures aux limites de tolérance lors d'expositions à de hautes températures (Christen et al., 2018; Harada et al., 2019; Iftikar & Hickey, 2013). Deux études Iftikar et al. (2014) et Iftikar & Hickey (2013) sur les poissons ont suggéré qu'à des températures approchant le CT_{max} , la production en ATP décline, ce qui affectait la survie de l'animal. Notamment, des changements au niveau de la phosphorylation oxydative et de la fuite de protons (LEAK) à de hautes températures pourraient sous-tendre aux limites thermiques de la capacité aérobie de l'organisme entier et à la variation de la capacité aérobie selon les températures (Pörtner, 2002). De plus, les fonctions mitochondriales sont connues pour répondre à la température grâce à leur plasticité phénotypique par des changements dans la quantité mitochondriale, la capacité oxydative, l'affinité pour l'oxygène, la composition membranaire et les activités et quantités enzymatiques, ce qui suggère clairement que la modulation des fonctions mitochondriales est un élément important des réponses cellulaires au changement de température. Peu d'études ont cependant utilisé la plasticité phénotypique comme outils pour déterminer les limites des fonctions mitochondriales en fonction de la tolérance thermique.

1.5 Drosophile et mitochondrie dans l'étude de la tolérance thermique

La drosophile, *Drosophila melanogaster*, a premièrement été introduite par Thomas Hunt Morgan comme modèle d'étude de recherche scientifique depuis plus de 100 ans passés (Morgan, 1910; Ong et al., 2015). Depuis, la drosophile reste un des modèles de recherche scientifique les plus utilisés, ceci pour plusieurs raisons. Premièrement, son cycle de reproduction est court et simple, il est d'une durée approximative de 8-14 jours (fig. 1.3). L'élevage des drosophiles est aussi facile et peu coûteux et les drosophiles sont facilement anesthésiées et manipulables. La drosophile est aussi largement utilisée dans le domaine biomédical, car son génome est homologue à 60% à celui de l'homme et 75% des gènes qui causent des maladies chez les humains sont retrouvés chez la drosophile.

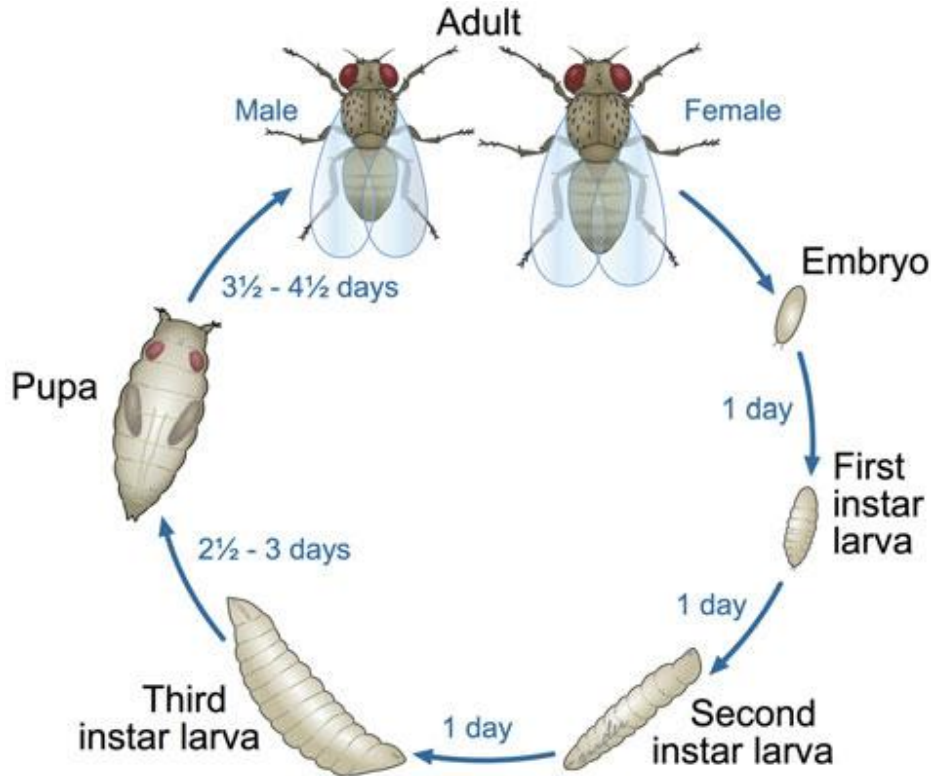


Figure 1.3 : Cycle de vie complet de la drosophile. Son cycle de vie est rapide et n'en prend que 8-14 jours. Le développement de la drosophile est divisé en quatre stades : embryon, larve (premier stade larvaire, deuxième stade larvaire et troisième stade larvaire), puppe et adulte (Adapté de Ong et al., 2015).

L'espérance de vie des drosophiles est aussi d'environ 60 jours (Ong et al., 2015), ce qui permet des études à court terme. La drosophile est aussi un bon modèle pour l'étude du métabolisme, car elles partagent la plupart des fonctions métaboliques de base des vertébrés et possèdent de nombreux systèmes d'organes analogues qui contrôlent l'absorption, le stockage et le métabolisme. De plus, les voies centrales du métabolisme intermédiaire et régulateur de l'homéostasie sont présentes chez la mouche, ce qui démontre que la plupart des fonctions métaboliques essentielles ont été conservées par l'évolution, incluant les fonctions mitochondriales. Cependant, l'étude de la drosophile et des insectes a été négligée en matière de fonction mitochondriale et les adaptations mitochondriales à haute température. Ceci est probablement dû au fait que les techniques permettant l'étude des fonctions mitochondriales nécessitent généralement beaucoup de tissus animaux, ce qui peut être une limite lorsque l'on travaille avec des petits organismes tels que les drosophiles.

1.6 Techniques de mesure de la respiration mitochondriale

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la respiration mitochondriale, mais les avantages conceptuels et pratiques de la respirométrie à haute résolution en ont fait une technique de premier plan pour mieux comprendre la fonction mitochondriale (Divakaruni & Jastroch, 2022). De plus, les diverses méthodes de mesure de la respiration mitochondriale utilisent soit l'isolation mitochondriale ou soit la perméabilisation de tissu, qui possèdent leurs avantages et inconvénients.

L'isolation mitochondriale est une technique laborieuse et méticuleuse qui permet de préparer un volume d'échantillon suffisant pour mesurer les fonctions mitochondriales dans diverses conditions à partir d'une seule isolation. Cette technique présente toutefois des inconvénients, car l'obtention d'un échantillon dans des conditions optimales nécessite une grande quantité de tissu par rapport à d'autres méthodes. Les mitochondries exposées à des stress particuliers peuvent être affectées et potentiellement perdues au cours des centrifugations de différenciation nécessaires à l'isolement en raison des changements de densité, ce qui réduit finalement l'hétérogénéité de l'échantillon final (Piper et al., 1985).

D'autre part, la perméabilisation des tissus est une approche alternative pour mesurer la respiration mitochondriale chez la drosophile, qui permet de surmonter certains des

inconvenients (Kuznetsov et al., 2008; Simard et al., 2018). Elle nécessite une quantité minimale de tissu, préserve l'hétérogénéité au sein de la population mitochondriale et garantit que les mitochondries peuvent maintenir leur réseau intracellulaire tout en évaluant les fonctions de l'O₂PHOS. Par contre, certaines techniques de mesure de respiration mitochondriale et de mesure de production d'ATP ne fonctionnent pas avec des tissus perméabilisés. Bien que les méthodes d'isolation mitochondriale et de perméabilisation des tissus aient leurs avantages et leurs inconvenients, chacune est importante à notre étude et c'est pourquoi nous utiliserons les deux techniques.

1.7 Technique de mesure de production d'ATP et de contenu d'ATP

Il existe des méthodes pour mesurer le contenu total d'ATP, mais ces méthodes ne sont pas toujours fiables. C'est-à-dire que la méthode à base de ATPmétrie et de luciférase (Stanley, 1989) mesure la quantité d'ATP présente et non la production d'ATP. L'ATPmétrie ne fournit pas d'informations sur la production en temps réel d'ATP à partir des substrats métaboliques.

De même, il existe plusieurs méthodes pour mesurer la synthèse d'ATP comme l'estimation de la consommation mitochondriale d'ADP (Estabrook, 1967), essai direct des changements de concentration d'ATP (Ouhabi et al., 1998), essai indirect des changements de concentration d'ATP (Salin et al., 2010), la mesure des variations de la concentration de magnésium libre [Mg²⁺] (Chinopoulos et al., 2009), estimation du K_d de l'ATP et de l'ADP pour le magnésium libre (Mg²⁺) (Salin et al., 2016), etc. Ces méthodes possèdent toutes des avantages, mais aussi des désavantages. Elles peuvent produire des mesures biaisées de l'ATP lors de l'utilisation d'homogénats de tissus en raison de la présence d'ATPases non mitochondriales, certaines méthodes nécessitent deux fois la quantité de tissu, le temps et l'efficacité des inhibiteurs peut dépendre du tissu, du modèle d'étude ou de la préparation mitochondriale et certaines méthodes ont besoin des essais et plusieurs titrations pour le calcul des constantes.

Le projet de recherche présent comporte diverses températures d'acclimatation et d'essai, donc plusieurs des méthodes élaborées ci-dessus ne conviendraient pas aux besoins de cette recherche. L'importance est de considérer chaque avantage et désavantage en fonction de sa question de recherche et de choisir les méthodes de respiration

mitochondriale et de mesure de production d'ATP qui conviennent le mieux aux objectifs du projet de recherche.

1.8 Hypothèse et objectifs de recherche

Bien que de nombreuses études (Chung & Schulte, 2020; Harada et al., 2019; Iftikar & Hickey, 2013; Melzner et al., 2006) démontrent des liens forts entre le CT_{max} et l'échec du métabolisme mitochondrial, le mécanisme responsable de cet échec n'est pas encore clair. L'oxydation de différents substrats selon la température a récemment été démontrée comme jouant un rôle clé au niveau des ajustements de la consommation d' O_2 mitochondriale à haute température. Cependant, on ne sait pas encore si ces changements dans la consommation d' O_2 s'accompagnent de changements au niveau de la production d'ATP. La mesure de la production d'ATP à haute température en utilisant des techniques adéquates pourrait donc aider à mieux comprendre la nature du lien entre l'échec du métabolisme mitochondrial et la tolérance thermique.

1.8.1 Hypothèse

L'hypothèse de ce projet est que le maximum thermique critique (CT_{max}) des drosophiles serait lié à un manque de production d'ATP causé par l'échec de capacité d'oxydation des substrats lors des ajustements de température.

1.8.2 Objectifs de recherche

Les objectifs pour ce projet sont d'évaluer comment la température d'acclimatation des drosophiles influence la réponse de l'animal et de ses mitochondries à des variations de température. Pour faire cela, nous avons mesuré la tolérance au froid, la tolérance au chaud, le profil lipidique chez des drosophiles de type sauvage (*Drosophila melanogaster*) acclimatées à 15 et 24 °C, puis nous avons évalué la respiration mitochondriale à trois températures, 15, 24 (nos températures d'acclimatation) et 40 °C (proche du CT_{max}). De plus, nous voulons optimiser une méthode de mesure des taux de synthèse d'ATP aux mêmes températures en considérant l'oxydation de différentes combinaisons de substrats.

**2 RÉSULTATS : LES MOUCHES À LA HAUSSE : LE RÔLE DE LA
PLASTICITÉ PHÉNOTYPIQUE SUR LA SYNTHÈSE DE L'ATP ET LA
CAPACITÉ D'OXYDATION DES SUBSTRATS À DES TEMPÉRATURES
NORMALES ET ÉLEVÉES CHEZ LES DROSOPHILES (*DROSOPHILA
MELANOGASTER*)**

Flies on the Rise: The Role of Phenotypic Plasticity on ATP Synthesis and Substrate Oxidation Capacity at Normal and High Temperatures in *Drosophila melanogaster*

À soumettre dans Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences

Arianne Blanchard^{1,2}, Nathalie Gould^{1,2}, Adèle Léger^{1,2}, Mélanie Aminot^{1,2}, Nicolas Pichaud^{1,2*}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Université de Moncton, Moncton, NB, Canada, E1A3E9

²New Brunswick Centre for Precision Medicine (NBCPM), Moncton, NB, Canada, E1C8X3.

2.1 Sommaire

La capacité aérobie des insectes est essentielle pour permettre l'adaptation aux changements de température. Cette étude examine l'influence de la plasticité phénotypique sur les paramètres métaboliques et physiologiques chez la drosophile et le lien potentiel entre les fonctions mitochondriales et leurs limites thermiques supérieures. Nous avons émis l'hypothèse que l'acclimatation à 15 et 24 °C provoquerait des ajustements physiologiques et mitochondriaux pour permettre une compensation métabolique lorsque mesurées à 15, 24 et 40 °C. Ces ajustements auraient un impact sur l'oxydation des substrats mitochondriaux et les capacités de production d'ATP près du maximum thermique critique (CT_{max}). Nos résultats ont révélé que les drosophiles acclimatées à 15 °C avaient un 'chill coma recovery time' (une mesure indicatrice de la tolérance au froid) plus élevé, mais un CT_{max} plus bas, comme attendu comparativement aux drosophiles acclimatés à 24 °C. Les drosophiles acclimatées à 15 °C ont également montré des altérations dans la composition des acides gras membranaires, avec des niveaux accrus d'acides gras saturés et monoinsaturés plus courts, mais une diminution des acides gras polyinsaturés. Chez les drosophiles acclimatées à 15 °C, la consommation d'oxygène mitochondriale lors du CI-LEAK (lorsqu'il n'y a pas de phosphorylation oxydative) a grandement diminué lorsque mesurée à 40 °C, mais pas chez le groupe acclimaté à 24 °C. Chez les deux groupes, CI-OXPHOS (en présence d'ADP) a aussi diminué drastiquement lorsque mesuré à 40 °C. Cependant, lorsque le G3P et le succinate ont été ajoutés comme substrats, cette diminution était compensée, mais seulement pour les mouches acclimatées à 24 °C, ce qui suggère un impact important de l'acclimatation sur les fonctions mitochondriales liées à la tolérance thermique. Le taux de synthèse d'ATP pour CI-OXPHOS a diminué légèrement entre 24 et 40 °C pour les deux groupes acclimatés. En revanche, l'ajout de la proline a entraîné une augmentation significative du taux de synthèse de l'ATP, en particulier lorsqu'il est mesuré à 40 °C. Le G3P a augmenté la synthèse d'ATP uniquement chez les mouches acclimatées à 24 °C. Ainsi, notre étude montre que les changements de substrats oxydatifs à haute température semblent être fortement influencés par la température d'acclimatation et fortement liés au CT_{max} et révèle l'interaction complexe entre l'acclimatation à la température, l'utilisation des substrats mitochondriaux et la tolérance thermique chez la drosophile.

2.2 Abstract

Aerobic capacity in insects is essential for adaptation to temperature changes. This study examines the influence of phenotypic plasticity on metabolic and physiological parameters in *Drosophila* and the potential link between mitochondrial functions and their upper thermal limits. We hypothesized that acclimation at 15 and 24 °C would induce physiological and mitochondrial adjustments to achieve metabolic compensation when measured at 14, 24 and 40 °C. These adjustments would impact mitochondrial substrate oxidation and ATP production capacities near the critical thermal maximum (CT_{max}). Our findings revealed that *Drosophila* acclimated to 15 °C had a higher chill coma recovery time (a proxy for cold tolerance), but a lower CT_{max} , as expected compared to *Drosophila* acclimated to 24 °C. *Drosophila* acclimated to 15 °C also exhibited an increase in the proportion of shorter saturated and monounsaturated fatty acids while showing a decline in the proportion of polyunsaturated fatty acids compared to *Drosophila* acclimated to 24 °C. In *Drosophila* acclimated to 15 °C, CI-LEAK (non-phosphorylating respiration) greatly decreased when measured at 40 °C, but not in the 24 °C acclimated group. In both groups, CI-OXPHOS (respiration with ADP) was also decreased when measured at 40 °C. However, when G3P and succinate were added as substrates, this decrease was compensated for but only for flies acclimated at 24 °C, suggesting an important impact of acclimation on mitochondrial functions related to thermal tolerance. The rate of ATP synthesis for CI-OXPHOS decreased slightly between 24 and 40 °C for both acclimation groups. However, the addition of proline led to a significant increase in the rate of ATP synthesis, particularly when measured at 40 °C. G3P increased ATP synthesis only in flies acclimated to 24 °C. Thus, our study reveals that the use of oxidative substrates at high temperatures appears to be strongly influenced by acclimation temperature and strongly related to CT_{max} and shows the complex interplay between temperature acclimation, mitochondrial substrate utilization and thermal tolerance in *Drosophila*.

2.3 Introduction

The most recent years have been among the warmest recorded since 1880, characterized by an increase in average temperatures and in the occurrence of extreme thermal events, which impose both long- and short-term thermal stress, significantly

impacting animal populations with various consequences for their evolution and ecology (Jørgensen et al., 2022; Menzel & Feldmeyer, 2021). Temperature has notably a significant impact on the performance, distribution, and abundance of ectothermic animals in their thermal environment. These organisms regulate their body temperatures through different approaches using behavioural strategies, such as modifying their activity levels, seeking shelter, or changing their location (Flouris & Piantoni, 2015b), but also by relying on physiological and biochemical adjustments (Hochachka & Somero, 2002). As such, phenotypic plasticity (acclimation), a mechanism by which organisms coordinate a phenotypic response to environmental stressors, plays a crucial role in the thermal tolerance of ectothermic species and can be vital for mitigating the impacts of climate change (Vinagre et al., 2016). Due to the ongoing climate warming combined with the extreme thermal sensitivity of heat failure rates, many ectothermic species will experience severe and disproportionate consequences due to heat mortality (Jørgensen et al., 2022). Thus, characterizing proxies of heat thermal tolerance such as the CT_{max} in ectothermic species is crucial to understand the fate of populations in a warming future (Jørgensen et al., 2021). CT_{max} is the temperature at which an organism's functions become uncoordinated during an acute temperature rise. The loss of function and mortality associated with heat stress and the underlying cellular mechanisms of heat failure are still however not well understood in organisms. At high temperatures, thermal effects on ectotherms primarily target aerobic metabolism and are considered a significant aspect of biochemical and metabolic adaptations (Blier et al., 2014; Chung & Schulte, 2020; Jørgensen et al., 2021; Menail et al., 2022; Schulte, 2015).

Increased temperatures are associated with increased metabolic demands, and to maintain cellular homeostasis mitochondrial aerobic respiration must follow. As such, mitochondria must regulate oxygen consumption rates (OCRs) to fulfill the necessary ATP demand during increased metabolic activity and restore homeostasis during temperature changes. Thus, mitochondrial thermal sensitivity has been proposed to explain organismal breakdown at high temperatures and has been deemed essential for the thermal adaptation of various organisms (Blier & Lemieux, 2001; Pichaud et al., 2010). Several studies demonstrate strong links between the critical thermal limit (CT_{max}) and the failure of mitochondrial metabolism (Chung & Schulte, 2020; Harada et al., 2019; Iftikar & Hickey,

2013; Jørgensen et al., 2021; Melzner et al., 2006; Menail et al., 2022). However, the specific mechanism underlying this failure remains unclear. One of the most obvious cellular functions that could be key to explain heat failure is the limitation of ATP production during the OXPHOS process. Thus, measuring mitochondrial ATP production at high temperatures could better elucidate the connection between mitochondrial failure and thermal tolerance, as it might be the strongest parameter linking both processes (Chung & Schulte, 2020). Surprisingly, however, very few studies have investigated this link (but see Iftikar & Hickey, 2013; Roussel et al., 2023; Willis et al., 2021).

Short-term acute warming typically results in increased mitochondrial OCR which should theoretically allow higher ATP production to sustain the increasing energy demand (Pichaud et al., 2019). However, cellular membranes (including mitochondrial) are rapidly affected by warming which increases membrane fluidity and can have a negative impact on mitochondrial membrane integrity and processes, notably by increasing proton leak and dissipating the proton motive force (Chung et al., 2018; Pichaud et al., 2019; Sokolova, 2023). Following more chronic changes in habitat temperature regimes, mitochondrial adjustments are required to ensure ATP demand which generally consists of decreasing mitochondrial metabolism at warmer temperatures (metabolic compensation) due to decreased mitochondrial OCRs and decreased mitochondrial density (Guderley, 2004; Schulte, 2015). Moreover, remodelling of cellular membranes also participates in this metabolic compensation as many ectotherms adjust the glycerophospholipid composition of their membranes as well as the proportion of unsaturated acyl chains in membrane lipids to restore optimal membrane fluidity when temperatures change, a type of trait plasticity termed homeoviscous adaptation (Cooper et al., 2012; Hazel, 1995; Hochachka & Somero, 2002; Overgaard et al., 2008; Sinensky, 1974). It is thus essential to consider both acute and chronic thermal effects on organisms to understand whether and how ectotherms will be successful in mitigating the effects of increased temperatures.

Insects represent excellent organisms to study the effects of temperature changes on metabolic processes. First, they have colonized almost all thermal habitats in the world and are thus champions at buffering the effects of temperature changes. Moreover, their flight muscle is one of the most rapidly contracting muscles in nature, and they possess one of

the highest metabolic rates in nature (Beenakkers et al., 1984; Candy et al., 1997; Jørgensen et al., 2021; Simard et al., 2018). Considering mitochondrial metabolism, pyruvate derived mainly from carbohydrates serves as the primary mitochondrial substrate for most insect species, including *D. melanogaster*, by fueling the TCA cycle which produces NADH that sequentially transfers electrons to complex I (CI), ubiquinone (Q), complex III (CIII) and complex IV (CIV), until oxygen, the final acceptor of the ETS. As a result of this transport, CI, CIII and CIV pump protons from the mitochondrial matrix to the intermembrane space, generating a proton motive force that is then used to generate ATP at the level of complex V (ATP synthase). Succinate, a TCA cycle intermediate, can also be oxidized by complex II (CII), transferring electrons via FADH₂ to Q, CIII, CIV and O₂. CII does not participate in proton pumping, albeit protons are still pumped due to electron transport into CIII and CIV resulting in a theoretically diminished yield of ATP compared to the oxidation of pyruvate (McDonald et al., 2018; Menail et al., 2022). Alternative fuels can also be used in insects to sustain mitochondrial respiration (Pichaud et al., 2010; Simard et al., 2018). Several studies have demonstrated that glycerol-3-phosphate (G3P) and proline, can act as oxidative substrates for electron transport, resulting in stimulation of mitochondrial OCR observed in different insects, including *Drosophila* (McDonald et al., 2018; Menail et al., 2022). These substrates act as electron donors to Q (via FADH₂) and thus bypass proton pumping by CI, similarly to succinate. G3P is produced through the breakdown of diglycerides or triglycerides or by the conversion of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) from glycolysis. It is then transported to the intermembrane space where the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase (mG3PDH) reduces the coenzyme FAD and transfers electrons to the Q pool (McDonald et al., 2018). Proline can also be used as the main fuel source for some insects (Bursell, 1963; Menail et al., 2022; Soares et al., 2015) and this amino acid is also known to be an abundant substrate found in the hemolymph of most insect species (Arrese & Soulages, 2010). When combined with carbohydrates, proline can serve as an anaplerotic substrate, increasing TCA intermediates (via glutamate and α -ketoglutarate). This, in turn, theoretically increases oxygen consumption and thus the production of ATP by maximizing NADH production by the TCA cycle (McDonald et al., 2018; Stec et al., 2021). Alternatively, direct oxidation by mitochondrial proline dehydrogenase (ProDH) can also occur, providing electrons directly to the Q of the ETS

(Arentson et al., 2012). In a recent study using 3 different flying insect species, we showed the flexibility of mitochondria for substrate oxidization to support high OCR at high temperatures (Menail et al., 2022). However, it is still unknown if this switch in substrate oxidation is associated with differential mitochondrial ATP production.

This study investigates how phenotypic plasticity affects various metabolic and physiological parameters in *Drosophila* acclimated to two different temperatures (15 and 24 °C). In these two acclimated groups, we specifically measured chill coma recovery (CCR) time, dynamic critical thermal maximum (CT_{max}) as well as the fatty acid profile (GC-FID). Moreover, to understand whether and how the upper thermal limit of *Drosophila* could be linked to mitochondrial functions, we examined the involvement of substrate oxidation and ATP production at three assay temperatures (15, 24, and 40 °C) in the two acclimated groups. We hypothesized that *Drosophila* acclimated to 15 °C will adjust mitochondrial metabolism through metabolic compensation (increased mitochondrial OCR) and show higher membrane content in unsaturated fatty acids. Moreover, we hypothesized that *Drosophila* acclimated to 15 °C will exhibit lower heat tolerance which will be associated with a switch of favored oxidative substrates linked to a diminished ATP production rate when measured close to their CT_{max} impairing mitochondrial performance.

2.4 Material and methods

2.4.1 *Drosophila* model

Drosophila melanogaster (w^{1118}) was obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center, Bloomington, IN, USA. The flies were reared at constant temperature (24.0 ± 0.1 °C), humidity (50% relative humidity), and diurnal cycle (12:12 h light: dark) on a standard cornmeal medium consisting of agar 5 g.L⁻¹, sugar 6 g.L⁻¹, yeast 27 g.L⁻¹, cornmeal 53 g.L⁻¹ in 1 L of water and supplemented with 0.4% (v/v) propionic acid to prevent mite contamination and methyl-p-hydroxybenzoate dissolved in 95% ethanol (10% w/v) to prevent mould growth. Upon eclosion, males were collected and placed in new vials at constant density. When they reached 5 days old, male flies were placed at their designated acclimation temperature of either 15.0 ± 0.1 °C or were left at 24.0 ± 0.1 °C for 15 days. All experiments were then performed on 20-day-old male flies acclimated to either 15.0 ± 0.1 °C or 24.0 ± 0.1 °C.

2.4.2 Chill coma recovery time assay

Flies from either acclimated group were placed individually into 60 different vials (N=60). The vials were submerged in a water and ice bath maintained at 0 °C for 2 hours. The vials were then returned to room temperature for recovery. Flies were considered recovered when they regained neuro-muscular function and were able to stand up which was taken as the CCR time (Holmbeck & Rand, 2015).

2.4.3 CT_{max} measurement

The CT_{max} was measured by subjecting the flies to gradually increasing temperatures. The flies were first placed in groups of 5 into BD Vacutainer glass tubes connected to circulating air and immersed in a temperature-controlled water bath set at their acclimation temperature (15 or 24 °C) for 30 minutes. The temperature of the bath was then increased by 0.5 °C every 2 minutes. The temperature inside the tubes was monitored with a Fisherbrand™ Traceable™ platinum high-accuracy thermometer (Thermo Fisher Scientific, ON, Canada) with a resolution of 0.01 °C. As the temperature increased, insects became more active until they reached a temperature at which they lost muscular control, flipped over, and ceased walking. This temperature was recorded as an approximation of the CT_{max} (García-Robledo et al., 2016).

2.4.4 Determination of Drosophila fatty acid profile

2.4.4.1 Total lipid extraction

Pools of ten frozen Drosophila thoraces were homogenized on ice in 800 µL of cold PBS using a pellet pestle. The homogenate was then transferred to a glass vial containing 2 mL methanol (MeOH), 900 µL chloroform (CHCl₃), and 100 µL DHDPC (0.03 g.mL⁻¹) in CH₃Cl as an internal standard for our samples. This was followed by adding 25 µL acetic acid 10% (v/v) and vortexing the vials. The vials were then incubated at room temperature for 15 minutes. After 2 mL CHCl₃ and 1 mL H₂O were added, the vials were mixed by inversion and centrifuged at 1000 rpm, 5 min and 24 °C. Using a Pasteur pipette, the lower phase was transferred to a second vial and 2 mL CHCl₃ was added to the first vial, which was mixed by inversion and centrifuged again at 1000 rpm, 5 min and 24 °C. The lower phases were then pooled before being evaporated under nitrogen.

2.4.4.2 Alkaline hydrolysis and transmethylation

The content of the dried vials was resuspended with 400 μ L methanolic KOH. The vials were then sealed and heated in a dry bath (100 °C, 15 min). After cooling, 1 mL of 14% (v/v) BF₃ in methanol was added to the tubes, followed by another incubation in a dry bath (100 °C, 10 min). After cooling, 2 mL hexane and 2 mL saturated sodium chloride solution (NaCl) was added. The upper phase was then transferred to a GC vial for analysis to quantify the fatty acid-methylated esters (FAMES).

2.4.4.3 Gas chromatographic conditions

The FAMES were quantified by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) using a 30 m trace-FAME column on a Thermo Trace gas chromatograph (Thermo Electron Corporation, Mississauga, ON, Canada). Authentic 17:0 FAME standard was used for the identification of fatty acid peak retention times and quantification as described previously (Robichaud et al., 2016).

2.4.5 Mitochondrial oxygen consumption in the permeabilized thoraces

Permeabilization of the thoraces and measurement of mitochondrial OCR at 15, 24 and 40 °C (N=6) were performed as previously described (Pichaud et al., 2011; Simard et al., 2018). Permeabilized thoraces were weighed and transferred into each chamber of an Oxygraph-O2K (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) set at the desired temperature and filled with air-saturated respiration medium (120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 3 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, and 0.2% BSA (w/v), pH 7.2.) with pyruvate (10mM) and malate (2mM). The oxygen concentration was raised to ~150% oxygen air-saturation (to avoid diffusion limitation in the tissues), the chambers were closed, and the signal was allowed to stabilize to measure the LEAK respiration at the level of CI (CI-LEAK). Injection of ADP (5 mM) enabled the measurement of mitochondrial OCR when the transport of electrons from CI is coupled to the phosphorylation of ADP to ATP (CI-OXPHOS). These OCRs were used to calculate the coupling efficiency at the level of CI (1-(CI-LEAK/CI-OXPHOS)). The functional integrity of the outer mitochondrial membrane was then verified by the addition of cyt c (15 μ M, C1c-OXPHOS). Subsequent injections of several substrates were then performed: proline (5mM), which provides

electrons to the ETS via the ProDH (CI+ProDH-OXPHOS); succinate (20mM) which brings electrons to the ETS through complex II (CI+ProDH+CII-OXPHOS); and G3P (15mM) that allows the transport of electrons to the ETS via the mG3PDH (CI+ProDH+CII+mG3PDH-OXPHOS). The OCRs measured with these different substrates were used to evaluate the contribution of each substrate to mitochondrial oxygen consumption. We calculated the contribution of: proline = $(CI+ProDH-OXPHOS - CIc-OXPHOS)/CIc-OXPHOS$; succinate = $(CI+ProDH + CII-OXPHOS - CI+ProDH-OXPHOS)/CI+ProDH-OXPHOS$; and G3P = $(CI+ProDH+CII+mG3PDH-OXPHOS - CI+ProDH+CII-OXPHOS)/CI+ProDH+CII-OXPHOS$. Subsequent inhibitions of complexes I, II and III by rotenone (0.5 μ M), malonate (5mM) and antimycin A (2.5 μ M), respectively, were performed to evaluate the residual OCR which was used to correct the previous OCRs measured. Finally, ascorbate (2 mM) and N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD, 0.5 mM) were added to evaluate the maximum capacity of CIV, which was corrected for auto-oxidation of TMPD after inhibition of CIV by sodium azide (20mM). All measurements are presented as mass-specific respiration rates expressed as pmol O₂ s⁻¹ mg⁻¹ of permeabilized fibers.

2.4.6 Isolation of mitochondria and measurement of ATP synthesis rate

Mitochondria were isolated according to modified protocols already established (R. J. Cormier et al., 2021; Pichaud et al., 2010). Isolation buffer was prepared (250 mM sucrose, 5 mM 2-Amino-2 (hydroxymethyl)-1,3-propanediol, 2 mM Glycol ether diamine tetra acetic acid with 1% (w/v) of bovine serum albumin) and without bovine serum albumin (BSA). All steps were done on ice. The thoraces of 30 *Drosophila* were homogenized in 200 μ L mitochondrial isolation buffer with BSA using a pellet pestle. Homogenates were filtered through a 1 mL syringe containing a 1 cm² piece of gauze, and 625 μ L of isolation buffer with BSA was added to rinse any remaining homogenate in the syringe. The filtered homogenates were centrifuged at 310 \times g for 3 min at 4 °C. The supernatant was collected, filtered again, and centrifuged at 9000 \times g for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was discarded and the pellet containing mitochondria was rinsed twice with 150 μ L isolation buffer without BSA before being resuspended in 150 μ L isolation buffer without BSA. The resulting homogenate was centrifuged again at 9000 \times g for 10 min at 4 °C. The obtained

pellet was rinsed twice with 150 μL isolation buffer without BSA before being resuspended in 60 μL isolation buffer without BSA.

The isolated mitochondria were used to measure the ATP synthesis rate according to modified protocols already established (Gouspillou et al., 2011; Lark et al., 2016; Roussel et al., 2023). ATP synthesis was measured by using a coupled enzymatic system coupling glucose-dependent, hexokinase (HK)-catalyzed ATP hydrolysis to glycerol-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)-catalyzed reduction of NADP^+ to NADPH. With this system, the ADP phosphorylated by the mitochondria into ATP is regenerated by the phosphorylation of glucose into glycerol-6-phosphate (G6P) catalyzed by HK. This reaction allows constant ATP turnover to ensure steady states of OXPHOS. The G6P resulting is oxidized by G6PDH to form 6-phosphogluconate while using NADP^+ as an electron acceptor. The production of NADPH is stoichiometrically linked to mitochondrial ATP synthesis rate. Hence, the mitochondrial ATP synthesis rate can be monitored by measuring the autofluorescence of NADPH with a spectrophotometer. The autofluorescence of NADPH (340 nm) was measured continuously with a Biotek Synergy H1 microplate reader (Biotek, Montréal, QC, Canada) set at 15, 24 and 40 $^{\circ}\text{C}$ for 8 minutes. For this assay, respiration medium was supplemented with glucose (20 mM) and hexokinase solution (1.6 kU mL^{-1}). This respiration medium was supplemented with different substrates to evaluate different conditions similar to those used for mitochondrial OCRs: (i) pyruvate (10 mM) + malate (2 mM) + ADP (5 mM) + cytochrome c (15 μM); (ii) + proline (5 mM); (iii) + succinate (20 mM); (iv) + G3P (15 mM). The isolated mitochondria and respiration medium supplemented with the different substrates were incubated together and the NADP^+ solution (6 mM) and G6PDH solution (1.6 kU mL^{-1}). As a control, the same reaction was followed with the addition of 10 μM oligomycin to inhibit CV and thus mitochondrial ATP production. The rates obtained with oligomycin were subtracted from the corresponding rates obtained without oligomycin. The ATP synthesis rates are reported as nmol ATP produced per minute per mg protein with proteins measured in the mitochondrial isolations using the bicinchoninic acid assay (Smith et al., 1985).

2.4.7 Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R software (version R version 4.2.1, Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). For chill coma recovery time, CT_{max} and fatty acid profile, a Student's t-test was performed to evaluate differences between acclimated groups (15 and 24 °C). For mitochondrial OCRs and mitochondrial ratios, the data were fitted to a linear model (lm) with the acclimation temperature (15 and 24 °C) and the assay temperature (15, 24 and 40 °C) as fixed factors and a two-way ANOVA was performed. For ATP synthesis rates, a mixed linear model (lme) with the acclimation temperature (15 and 24 °C) and the assay temperature (15, 24 and 40 °C) as fixed factors and the mitochondrial isolation as a random factor was used, followed by a two-way ANOVA. If an interaction effect for the two-way ANOVAs (Acclimation temperature*Assay temperature) was detected, multiple comparisons were then tested with pairwise comparisons of the least-squares means using adjusted P-values (Tukey method). In case no interaction but simple effects were detected, the data were analyzed using a one-way ANOVA considering only the significant fixed factor(s). Significance was set at $P < 0.05$. For all the statistical tests, normality and homogeneity of variances were verified and data were transformed when required.

2.5 Results

2.5.1 Chill coma recovery time and CT_{max}

To examine the cold tolerance, a CCR time assay was performed to measure how long the flies from each of the acclimated groups took to regain coordinated neuromuscular functions after cold exposure (N=60). A significant difference in CCR time between the acclimation temperatures was observed ($P < 0.001$; Fig. 1A) with the flies acclimated to 15 °C taking less time ($656.56 \pm 11.29s$) to regain controlled neuromuscular functions compared to the flies acclimated to 24 °C ($735.40 \pm 16.40s$). To examine heat tolerance, we measured the dynamic CT_{max} in flies acclimated to 15 or 24 °C (N=60). The CT_{max} was significantly different between the acclimation temperatures ($P < 0.001$; Fig. 1B) with flies acclimated to 15 °C having a lower CT_{max} (38.84 ± 0.05 °C) compared to the flies acclimated to 24 °C (39.49 ± 0.06 °C).

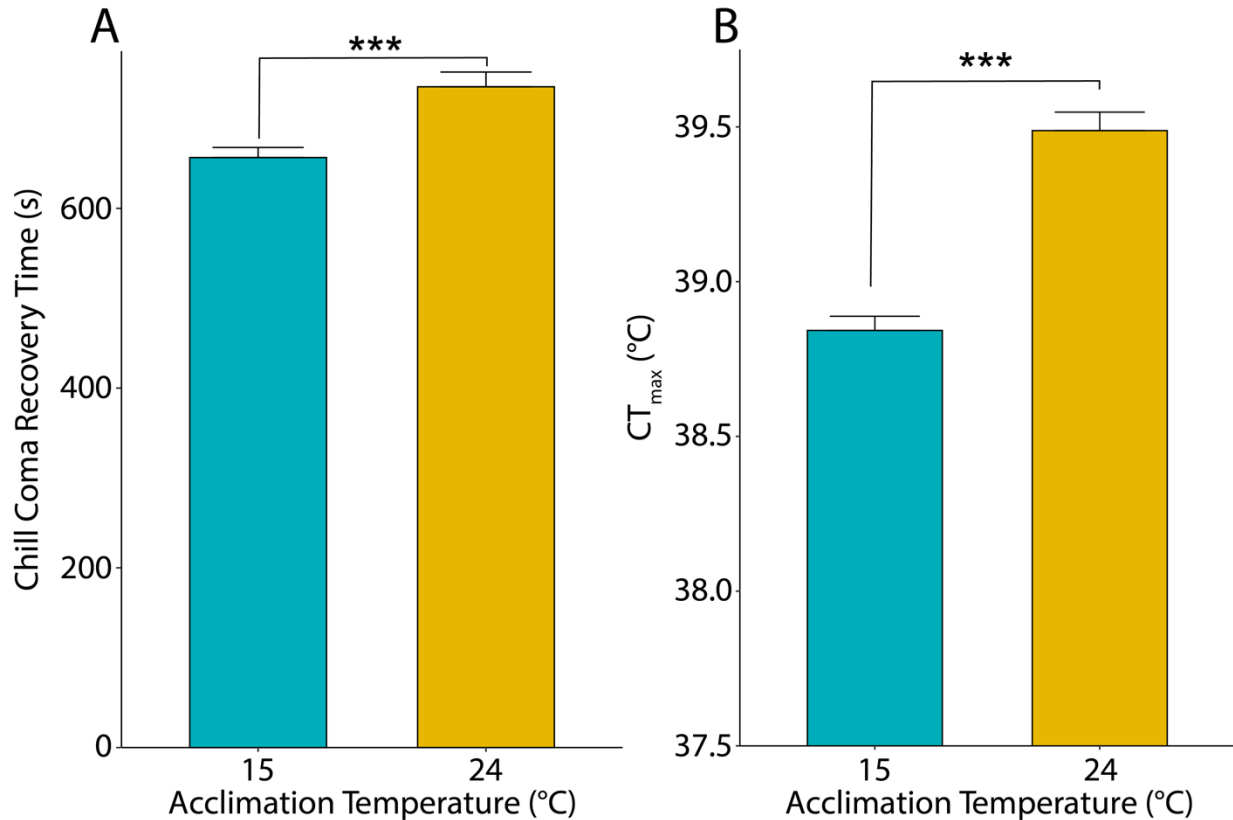


Figure 1. Chill coma recovery time assay and CT_{max} of 20-day old *Drosophila melanogaster* (WT) males acclimated to 15 and 24 °C (N=60). (A) Chill coma recovery time (N=60); and (B) CT_{max} (N=60). Differences between acclimation temperature were obtained following a Student's t-test, with *** corresponding to $P < 0.001$.

2.5.2 Fatty acid profile

To examine the effect of acclimation on fatty acid profile, we determined the proportion of different fatty acids in the thoraces of 20-day-old male *Drosophila* acclimated to 15 and 24 °C (N=8). Our results show that acclimation to 15 °C increased the proportion of myristic acid (14:0, $P=0.003$), but decreased other long-chain saturated fatty acids such as octadecanoic acid (18:0, $P=0.003$), arachidic acid (20:0, $P=0.02$), behenic acid (22:0, $P=0.016$) and lignoceric acid (24:0, $P=0.04$) (Table 1). We also observed that acclimation to 15 °C caused an increased proportion of some of the long-chain monounsaturated fatty acids such as myristoleic acid (14:1n5, $P < 0.001$) and palmitoleic acid (16:1n7, $P < 0.001$) whereas oleic acid (18:1n9, $P=0.025$) and vaccenic acid (18:1n7, $P < 0.001$) were reduced

(Table 1). *Drosophila* acclimated to 15 °C also showed a reduced proportion of all long-chain polyunsaturated fatty acids (linoleic acid (18:2n6), $P < 0.001$; γ -linolenic acid (18:3n6), $P = 0.041$; and eicosadienoic acid (20:2n6), $P = 0.025$; Table 1). Overall, the acclimation to 15 °C slightly increased the proportion of total saturated fatty acids (but not significantly, $P = 0.065$) and monounsaturated fatty acids ($P = 0.001$) and caused an important decrease in the proportion of total polyunsaturated fatty acids ($P < 0.001$; Table 1).

Table 1 The proportion of fatty acid methyl esters (FAMES) measured in 20-day-old *Drosophila melanogaster* (WT) males thoraces acclimated 15 or 24 °C (N=8).

Fatty Acids	Proportion of FAMES (%)		
	15 °C	24 °C	p-value
Myristic acid (14:0)	21.60 ± 0.53	12.39 ± 2.11	0.003
Myristoleic acid (14:1n5)	2.52 ± 0.06	1.04 ± 0.23	<0.001
Hexadecanoic acid (16:0)	13.90 ± 0.25	13.01 ± 0.74	0.287
Palmitoleic acid (16:1n7)	32.13 ± 0.47	23.25 ± 0.87	<0.001
Octadecanoic acid (18:0)	1.39 ± 0.09	4.68 ± 0.73	0.003
Oleic acid (18:1n9)	18.10 ± 0.29	21.58 ± 1.22	0.025
Vaccenic acid (18:1n7)	0.54 ± 0.02	1.76 ± 0.07	<0.001
Linoleic acid (18:2n6)	9.25 ± 0.56	19.96 ± 1.94	<0.001
γ -Linolenic Acid (18:3n6)	0.051 ± 0.05	0.63 ± 0.23	0.041
Arachidic acid (20:0)	0.21 ± 0.01	0.57 ± 0.08	0.002
Eicosadienoic acid (20:2n6)	0.08 ± 0.02	0.33 ± 0.09	0.025
Behenic acid (22:0)	0.14 ± 0.03	0.43 ± 0.09	0.016
Lignoceric acid (24:0)	0.10 ± 0.02	0.36 ± 0.07	0.004
% Saturated fatty acid	37.34 ± 0.79	31.45 ± 2.65	0.065
% Monounsaturated fatty acid	53.29 ± 0.72	47.64 ± 1.22	0.001
% Polyunsaturated fatty acid	9.37 ± 0.58	20.92 ± 1.99	<0.001

2.5.3 Mitochondrial oxygen consumption and mitochondrial ratios

The OCRs were measured at three assay temperatures (15, 24, and 40 °C) in permeabilized thoraces of *Drosophila* acclimated to either 15 or 24 °C, at multiple steps of the ETS. The CI-LEAK, which corresponds to mitochondrial OCR compensating for proton leakage across the inner mitochondrial membrane without ADP phosphorylation at

the level of complex I, displayed similar pattern for both acclimated groups when measured at either 15 or 24 °C (Fig. 2A). Specifically, it was increased between 15 and 24 °C for both the 15 and 24 °C acclimated groups, albeit only significantly for *Drosophila* acclimated to 24 °C ($P < 0.001$; Fig. 2A). However, when measured at 40 °C a drastic decline was observed in *Drosophila* acclimated to 15 °C compared to the other assay temperatures ($P = 0.025$ and $P < 0.001$ compared to measurements at 15 and 24 °C respectively) whereas CI-LEAK in *Drosophila* acclimated to 24 °C measured at 40 °C was not different than when measured at either 15 or 24 °C (Fig. 2A). This translated into a significant difference between acclimated groups for CI-LEAK measured at 40 °C ($P < 0.001$; Fig. 2A).

When ADP was added to trigger ADP phosphorylation (CI-OXPHOS; Fig. 2B), the same pattern was observed with a significant increase detected between 15 and 24 °C for both acclimated groups ($P = 0.016$ and $P < 0.001$ for *Drosophila* acclimated to 15 and 24 °C, respectively). A sharp decline in CI-OXPHOS was also observed when respiration was measured at 40 °C compared to the 15 and 24 °C assayed temperatures for the two acclimated groups (All P -values < 0.001 ; Fig. 2B). A significant difference ($P < 0.001$) was also detected between both acclimated groups when measured at 40 °C.

The same differences (significantly increased OCR between 15 and 24 °C and decreased at 40 °C for both acclimated groups) were observed with the addition of proline (CI+ProDH-OXPHOS; Fig. 2C), except that a statistical difference between the acclimated groups was detected for this rate when measured at 24 °C ($P < 0.001$) but not at 40 °C (Fig. 2C).

With the addition of succinate (CI+ProDH+CII-OXPHOS; Fig. 2D), a different trend started to emerge. Although in the 15 °C-acclimated group the significant increase between 15 and 24 °C ($P = 0.0156$) was followed by a sharp decline at 40 °C (both P -values < 0.001 when compared to measurements at 15 and 24 °C), this was not the case for the 24 °C-acclimated group as CI+ProDH+CII-OXPHOS rates were increased between 15 and 24 °C ($P < 0.001$) and then returned to values measured at 15 °C (still significantly lower than when measured at 24 °C, $P < 0.001$; Fig. 2D). When comparing CI+ProDH+CII-OXPHOS between acclimated groups at the same assay temperature, increased rates were

detected when measured at both 24 and 40 °C for flies acclimated to 24 °C (both P-values<0.001; Fig. 2D).

With the addition of G3P (CI+ProDH+CII+mG3PDH-OXPHOS), the 15 °C-acclimated flies had similar OCRs when measured at 15 and 24 °C which were, however, both higher than when measured at 40 °C (both P-value<0.001; Fig. 2E). Interestingly, for *Drosophila* acclimated to 24 °C, a significant increase between 15 and 24 °C was still detected but the rate measured at 40 °C was similar to 24 °C (but higher than at 15 °C, P<0.001; Fig. 2E). Statistical increases were also observed between the acclimation groups at assay temperatures of 24 and 40 °C (both P-values<0.001; Fig. 2E).

Finally, for the CIV maximum respiration, no significant differences were detected between assay temperatures for *Drosophila* acclimated to 15 °C but flies acclimated to 24 °C had significantly increased CIV rates when measured at both 24 and 40 °C compared to 15 °C (both P-values<0.001; Fig. 2F). Moreover, CIV maximum respiration rates showed no significant variations between acclimated groups when measured at the same assay temperatures (Fig. 2F).

Mass-specific respiration rates (pmol O₂.s⁻¹.mg⁻¹ tissue)

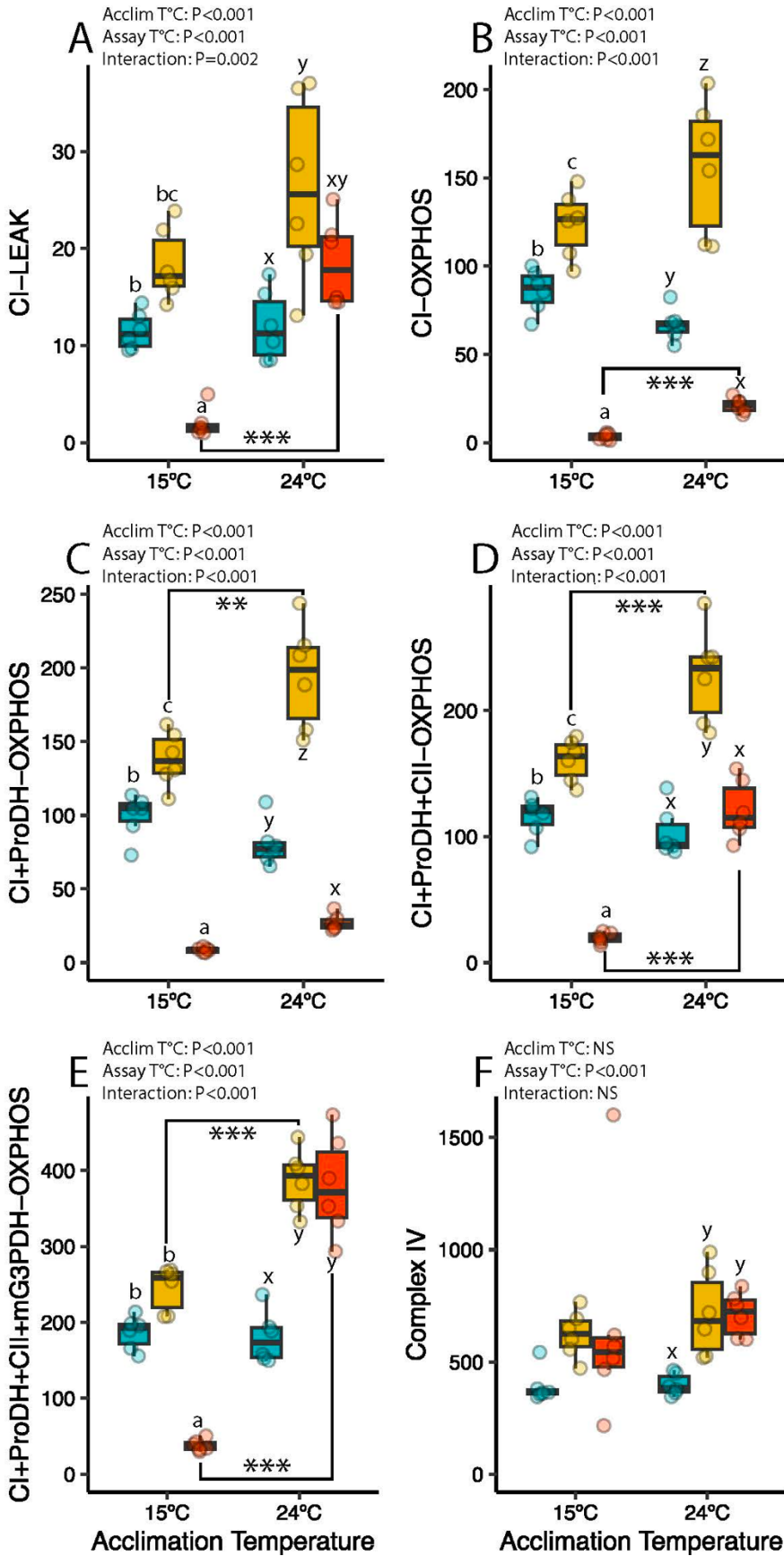


Figure 2. Mitochondrial oxygen consumption rates (OCR) measured at three assay temperatures (15, 24 and 40 °C) of *Drosophila melanogaster* (WT) males thoraces acclimated to 15 or 24 °C (N = 6). OCRs were measured in the presence of : (A) pyruvate, malate and (CI-LEAK) ; (B) + ADP (CI-OXPHOS); (C) + proline (CI+ProDH-OXPHOS); (D) + succinate (CI+ProDH+CII-OXPHOS); (E) + G3P (CI+ProDH+CII+mtG3PDH-OXPHOS); and (F) after inhibition of complexes I, II, and III by rotenone, malonate, antimycin A, respectively, and addition of TMPD + ascorbate (CIV). CIV oxygen consumption rates were corrected with rates obtained in the presence of sodium azide to account for TMPD auto-oxidation. The box plot values consist of the median (center line), the interquartile range (IQR, upper and lower edges of the box) and the whiskers which correspond to the maximum and minimum values not exceeding 1.5 * IQR (Tukey style). Data are presented in pmol O₂.s⁻¹.mg⁻¹ fiber. The results were analyzed using a two-way ANOVA followed by comparisons by Tukey's method or a one-way ANOVA on each significant effect when no significant interaction was detected. Stars represent significant differences between acclimated groups at the same assay temperature with: **P<0.01, ***P<0.001. Different lowercase letters indicate differences between assay temperatures tested for each acclimated group (a,b,c for *Drosophila* acclimated to 15 °C and x,y, z for those acclimated to 24 °C), with different letters representing statistically significant differences within one group (P<0.05).

2.5.4 Mitochondrial substrate contribution ratios

CI-coupling ratio (Fig. 3A) was calculated to determine the coupling between the electron transport due to NADH-linked substrates and ADP phosphorylation while mitochondrial substrate contribution ratios were calculated to estimate the effects of proline (Fig. 3B), succinate (Fig. 3C) and G3P (Fig. 3D) on mitochondrial oxygen consumption.

For CI-coupling ratio, differences were detected in both acclimated groups in which ratios were decreased when measured at 40 °C when compared to 15 and 24 °C (both P-values P<0.001, Fig. 3A).

For proline contribution, differences were detected only in the 15 °C-acclimated groups in which ratios were increased when measured at 40 °C when compared to 15 and 24 °C (P=0.0028 and P<0.001, respectively; Fig. 3B). Moreover, when comparing between

acclimation temperatures, we detected a significant difference ($P=0.0432$) for proline when measured at 40 °C.

For succinate, an increase of contribution ratios for both acclimated groups when measured at 40 °C compared to the other assay temperatures 15 and 24 °C was observed (both P-values $P<0.001$ for 15 °C acclimated *Drosophila*; $P=0.0153$ and $P<0.001$ respectively for 24 °C acclimated *Drosophila*; Fig. 3C). For G3P, the same pattern was observed, with increased contribution ratios for both acclimated groups when measured at 40 °C compared to the other assay temperatures 15 and 24 °C (both P-values $P<0.001$ for 15 °C acclimated *Drosophila*; $P=0.0164$ and $P=0.0139$ respectively for 24 °C acclimated *Drosophila*; Fig. 3D).

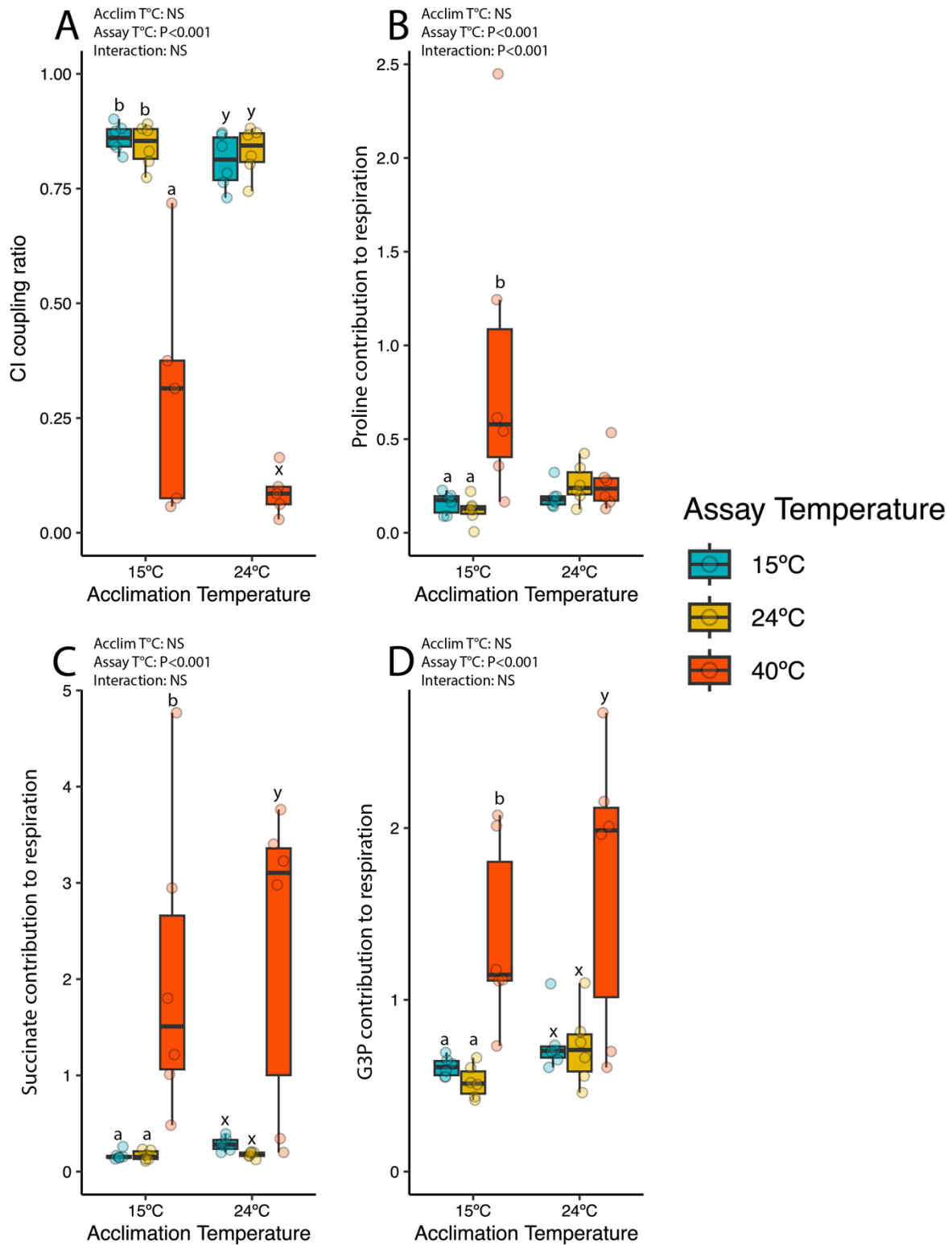


Figure 3. Substrate contribution ratio (SCR) for proline, succinate and G3P calculated from mitochondrial oxygen consumption rates measured in permeabilized

thoraces of 20-day-old *Drosophila melanogaster* (WT) males acclimated to 15 and 24 °C (N=6). (A) CI coupling ratio; (B) Contribution of proline = $(CI+ProDH-OXPHOS - CIc-OXPHOS)/CIc-OXPHOS$; (C) Contribution of succinate = $(CI+ProDH+CII-OXPHOS - CI+ProDH-OXPHOS)/CI+ProDH-OXPHOS$; (D) Contribution of G3P = $(CI+ProDH+CII+mG3PDH-OXPHOS - CI+ProDH+CII-OXPHOS)/CI+ProDH+CII-OXPHOS$. The box plot values consist of the median (center line), the interquartile range (IQR, upper and lower edges of the box) and the whiskers correspond to the maximum and minimum values not exceeding 1.5 * IQR (Tukey style). The results were analyzed using a two-way ANOVA followed by comparisons by Tukey's method or a one-way ANOVA on each significant effect when no significant interaction was detected. Stars represent significant differences between acclimated groups at the same assay temperature with: * $P < 0.05$. Different lowercase letters indicate differences between assay temperatures tested for each acclimated group (a,b for *Drosophila* acclimated to 15 °C and x,y for those acclimated to 24 °C), with different letters representing statistically significant differences within one group ($P < 0.05$).

2.5.5 ATP synthesis rate

To examine mitochondrial ATP production, the ATP synthesis rate was measured at three assay temperatures (15, 24, and 40 °C) in isolated mitochondria of 20-day-old male *Drosophila* acclimated to 15 or 24 °C in the absence and the presence of oligomycin. ATP synthesis rates were obtained after adding the different substrates used for the mitochondrial OCRs during OXPHOS: pyruvate+malate+ADP (CI-OXPHOS; Fig. 4A), +proline (CI+ProDH-OXPHOS; Fig. 4B), +succinate (CI+ProDH+CII-OXPHOS; Fig. 4C), and +G3P (CI+ProDH+CII+mG3PDH-OXPHOS; Fig. 4D).

For CI-OXPHOS ATP synthesis rates no significant differences were detected between acclimated groups nor between assay temperatures (Fig. 4A). However, a small decrease was detected between 24 and 40°C for both groups (Fig. 4A).

With the addition of proline, the ATP synthesis rates increased by 2 to 3.5 fold compared to pyruvate and malate, depending on the assay temperature (Fig. 4B). For *Drosophila* acclimated to 15 °C, CI+ProDH-OXPHOS ATP synthesis rate was the lowest when measured at 15 °C, increased at 24 °C (not significantly) and again at 40 °C ($P=0.002$

when compared to rates at 15°C). For *Drosophila* acclimated to 24 °C, the rates measured at 40 °C were only significantly higher than those measured at 15 °C ($P=0.048$, Fig. 4B). However, no significant differences were observed between acclimated groups for rates measured at the same temperature.

With the addition of succinate (Fig. 4C), the ATP synthesis rates were only slightly increased. Both acclimated groups displayed the same pattern, with CI+ProDH+CII-OXPHOS ATP synthesis rates increasing between 15 and 40 °C ($P < 0.001$ and $P=0.006$ for 15 and 24 °C acclimated *Drosophila*, respectively). No significant differences were detected when comparing the rates measured at the same temperature between acclimated groups.

For ATP synthesis rates with G3P (Fig. 4D), only a significant increase was detected at 40 °C for the 24 °C acclimated group when compared to the rates measured at either 15 or 24 °C ($P = 0.032$ and $P= 0.002$, respectively; Fig. 4D). However, similarly to the other substrates, no significant differences were detected when comparing the rates measured at the same temperature between acclimated groups.

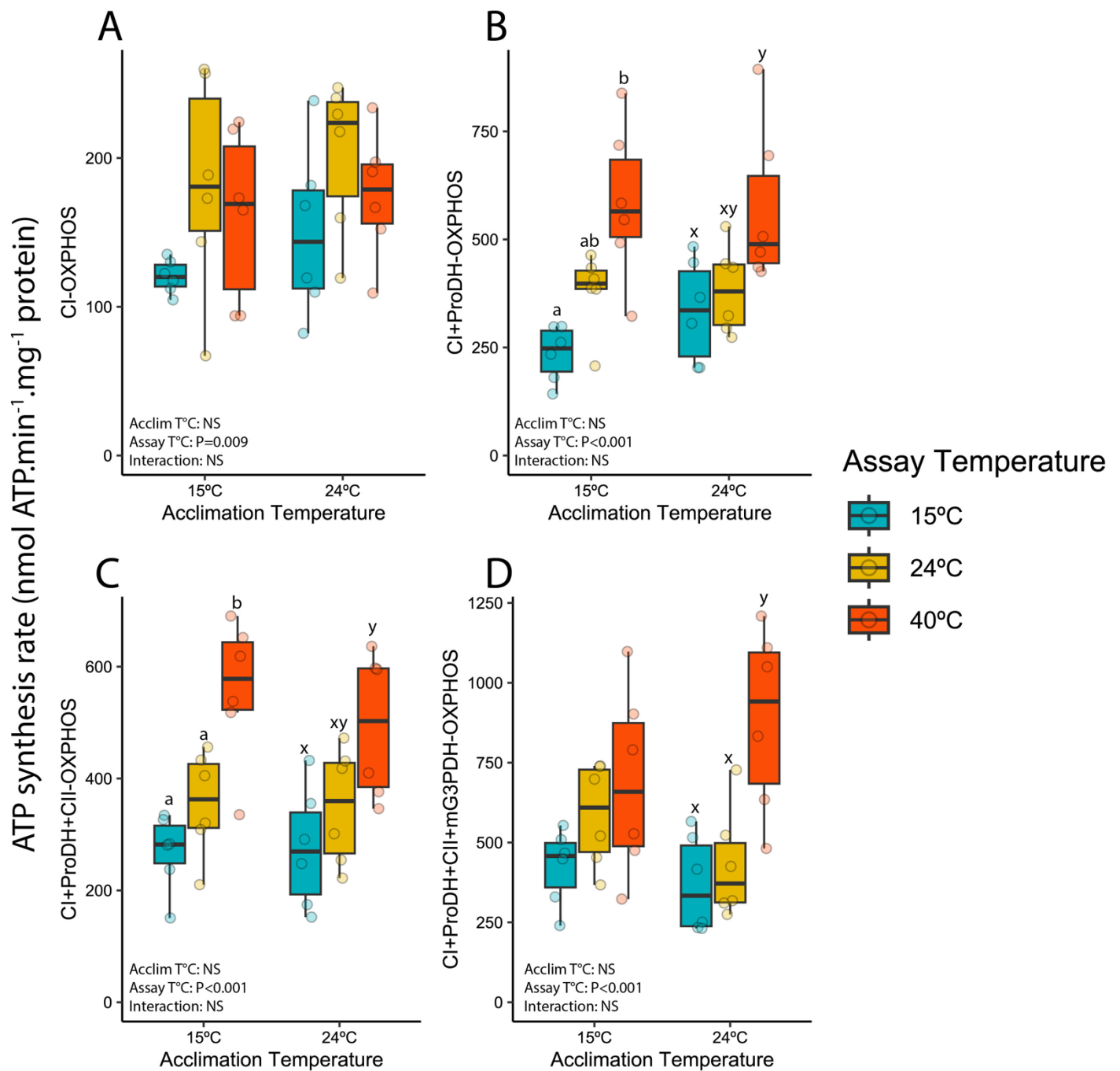


Figure 4. ATP synthesis rates measured at three assay temperatures (15, 24 and 40 °C) in isolated mitochondria of 20-day-old *Drosophila melanogaster* (WT) males thoraces acclimated to 15 and 24 °C (N=6). The ATP synthesis rates were measured in the presence of: (A) pyruvate+malate+ADP+cyt c (CI-OXPPOS); (B) + proline (CI+ProDH-OXPPOS); (C) + succinate (CI+ProDH+CII-OXPPOS) and (D) + G3P

(CI+ProDH+CII+mtG3PDH-OXPHOS). The box plot values consist of the median (center line), the interquartile range (IQR, upper and lower edges of the box) and the whiskers correspond to the maximum and minimum values not exceeding $1.5 * IQR$ (Tukey style). Data are presented in $\text{nmol ATP min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}^{-1}$. The results were analyzed using a two-way ANOVA followed by comparisons by Tukey's method or a one-way ANOVA on each significant effect when no significant interaction was detected ($N=6$). Stars represent significant differences between acclimated groups at the same assay temperature with: $*P<0.05$ and $**P<0.01$. Different lowercase letters indicate differences between assay temperatures tested for each acclimated group (a,b,c for *Drosophila* acclimated to $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ and x,y,z for those acclimated to $24\text{ }^{\circ}\text{C}$), with different letters representing statistically significant differences within one group ($P<0.05$).

2.5.6 ATP synthesis rate substrates contributions ratios

The ATP synthesis rate substrate ratios were calculated to estimate the contribution of proline (Fig. 5A), succinate (Fig. 5B) and G3P (Fig. 5C). Our results surprisingly showed that proline contributed more to ATP synthesis rates (increased by around 125% when proline was added), followed by G3P (increased by around 35% when G3P was added) and succinate which contributed less (almost nothing). For proline, a significant increase in ATP synthesis rate was detected between 15 and $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ acclimation group ($P=0.018$; Fig. 5A). For succinate, the only significant difference detected was between the acclimated group when ATP synthesis rate was measured at $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($P=0.008$; Fig. 5B). Despite the interaction between assay temperature and acclimation temperature being significant for G3P, no specific significant differences were detected (Fig. 5C).

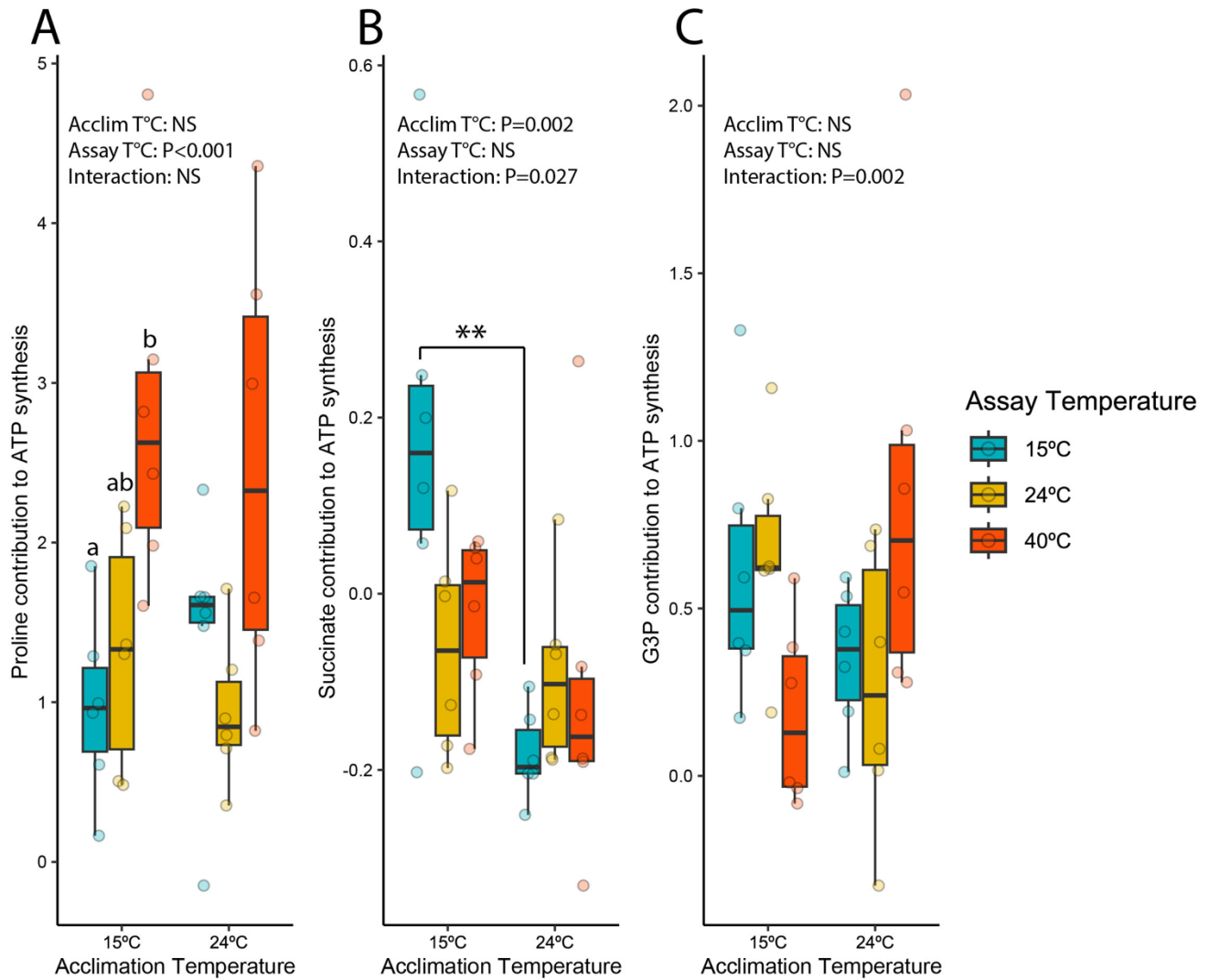


Figure 5. ATP production contribution ratios. Contribution of different substrates to ATP production of 20-day-old *Drosophila melanogaster* (WT) males thoraces acclimated to 15 and 24 °C (N=6). Contribution of proline = $(CI+ProDH\ OXPHOS - CI-OXPHOS)/CI-OXPHOS$; Contribution of succinate = $(CI+ProDH+CII-OXPHOS - CI+ProDH-OXPHOS)/CI+ProDH-OXPHOS$; Contribution of G3P = $(CI+ProDH+CII+mG3PDH-OXPHOS - CI+ProDH+CII-OXPHOS)/CI+ProDH+CII-OXPHOS$. The box plot values consist of the median (center line), the interquartile range (IQR, upper and lower edges of the box) and the whiskers correspond to the maximum and minimum values not exceeding $1.5 * IQR$ (Tukey style). The results were analyzed using a two-way ANOVA followed by comparisons by Tukey's method (N=6). Different

lowercase letters indicate a difference between the temperatures tested in each acclimation group, with each letter representing statistically significant differences ($P < 0.05$).

2.6 Discussion

This study examined the impact of thermal acclimation on metabolic and physiological parameters in *Drosophila* and the potential connection between mitochondrial functions and the upper thermal limit of *Drosophila*. We hypothesized that acclimation would result in physiological and mitochondrial adjustments consistent with metabolic compensation. We also postulated that this metabolic adaptation would induce differential changes in mitochondrial substrate oxidation and ATP production capacities at temperatures near CT_{max} , providing a mechanistic link between upper thermal tolerance and mitochondrial functions. Our findings revealed that *Drosophila* acclimated to 15 °C had higher CCR time but lower CT_{max} as expected. *Drosophila* acclimated to 15 °C also exhibited an increase in the proportion of shorter saturated and monounsaturated fatty acids (14:0, 14:1n5 and 16:1n7) while showing a decline in the proportion of polyunsaturated fatty acids. Moreover, in *Drosophila* acclimated to 15 °C, CI-LEAK greatly decreased when measured at 40 °C but not in the 24 °C acclimated group. In both groups, CI-OXPHOS was also drastically decreased when measured at 40 °C. However, when G3P and succinate were administered as substrates, this decrease was compensated for but only for the flies acclimated to 24 °C suggesting an important impact of acclimation on the mitochondrial functions linked to upper thermal tolerance. The rates of ATP synthesis in mitochondria for CI-OXPHOS slightly but not significantly declined between 24 and 40 °C for both acclimated groups. However, the addition of proline resulted in a significant elevation in the rate of ATP synthesis, especially when measured at 40 °C, which did not match the results for OCR. Succinate did not contribute substantially to ATP synthesis which also did not correspond to ATP production rates at the different temperatures tested, contrary to G3P which both increased oxygen consumption and ATP synthesis only in the flies acclimated to 24 °C. Thus, our study shows that while the substrate switch observed at high temperature is highly influenced by the acclimation temperature and highly related to CT_{max} , ATP production rates are dependent on the substrate combination used and do not seem to be predictive of heat failure, except maybe when G3P was added.

As expected, *Drosophila* acclimated to 15 °C had a better tolerance for cold compared to *Drosophila* acclimated to 24 °C. This is consistent with findings from previous research on different species of *Drosophila* (Goto & Kimura, 1998; Kimura et al., 1994; Košťál et al., 2011) which indicates that cold acclimation improves cold tolerance in *Drosophila*. We then measured CT_{max} as a proxy of upper thermal tolerance. The dynamic method for evaluating CT_{max} , which involves gradually exposing organisms to increasing temperatures, is viewed as an ecologically relevant approach to measure thermal tolerance in flies (Chown et al., 2009; Manenti et al., 2018; Overgaard et al., 2012; Terblanche et al., 2011). As predicted, the flies acclimated to 15 °C had a smaller CT_{max} (38.84 ± 0.05 °C) compared to the flies acclimated to 24 °C (39.49 ± 0.06 °C) and were both close to 40 °C. Jørgensen et al. (2019) established a static CT_{max} of 38.3 °C for *D. melanogaster* when acclimated to 19 °C which can be approximated to 39.9 °C when converted to the dynamic CT_{max} (Jørgensen et al., 2019). This is slightly different from what we observed, probably due to different sex, age and diet used in our study. Nonetheless, our results indicate that the acclimation temperature significantly affects the heat tolerance of flies and highlights the plasticity of heat tolerance in *Drosophila* and the impact of temperature acclimation on their thermal limits.

We then wanted to evaluate membrane fatty acid remodelling which is also known to importantly participate in thermal acclimation in ectotherms. Our results showed that a 15-day acclimation to 15 °C increased the percentage of saturated and monounsaturated fatty acids and decreased the percentage of polyunsaturated fatty acids (Table 1). The desaturation of fatty acids in membrane lipids is the subject of many studies of acclimation or adaptation changes in ectotherms in response to cold temperatures (Hazel, 1995; Kostal & Simek, 1998). It is known that cold-tolerant organisms contain a higher proportion of unsaturated fatty acids in cell membrane phospholipids than cold-sensitive organisms. This phenomenon occurs to ensure the maintenance of membrane fluidity at cold temperatures (Overgaard et al., 2008; Slotsbo et al., 2016). However, our results contradict this notion, as we observe that *Drosophila* acclimated to 15 °C show an increase in the percentage of saturated and monounsaturated fatty acids and a decrease in the percentage of polyunsaturated fatty acids. However, this is consistent with a study by Ohtsu et al. (1998) that showed that cold tolerance was associated with a slight increase in the number of

phospholipid saturated fatty acids as well as a decrease in phospholipid fatty acid chain length, as we detected notably with myristic acid (14:0), as well as with general increase in 16-carbon fatty acids and a decrease in 18-carbon fatty acids. However, it should be noted that we did not examine shorter-chain fatty acids (Ohtsu et al., 1998). It is generally accepted that phospholipids with shorter fatty acid chains help to maintain membrane fluidity at colder temperatures (Košťál, 2010), which is thus consistent with our results. This is also consistent with our results on proxies of thermal tolerance (CCR time and CT_{max}). Interestingly, it has been shown that *Drosophila* lacks delta 5- and delta-6 desaturases which are involved in the synthesis of long-chain unsaturated fatty acids (Shen et al., 2010). Altogether, this suggests that due to generally low polyunsaturated long-chain fatty acid, reduction of fatty acid chains instead of unsaturation of membrane fatty acids is the privileged mechanism for thermal acclimation in *Drosophila*. This change in fatty acid is likely to affect the activity of proteins embedded in membranes such as mitochondrial complexes and thus mitochondrial metabolism.

In terms of the maximum rate of proton leakage (CI-LEAK), the most notable difference was between the acclimated groups when measured at 40 °C, with a drastic decrease in the 15 °C acclimated group (Fig. 2A). This suggests that acclimation does not seem to affect CI-LEAK when measured at 15 and 24 °C, but flies acclimated to 15 °C are not able to sustain CI-LEAK when measured at 40 °C which should have a tremendous impact on mitochondrial functions. When ADP was added to trigger CI-OXPPOS, no differences were observed between the acclimation group when measured at either 15 or 24 °C, albeit a slight increase was observed in 15 °C acclimated flies when measured at 15 °C, consistent with metabolic compensation (Fig. 2B). However, when measured at 40 °C both acclimated groups displayed an important decrease in CI-OXPPOS. This suggests that the NADH-linked substrates derived from glycolysis and the TCA cycle are not actively contributing to mitochondrial respiration. The available evidence strongly supports the idea that temperature has a significant impact on the CI-OXPPOS in fruit flies (El-Wadawi & Bowler, 1996; Jørgensen et al., 2021; Menail et al., 2022). Higher temperatures can significantly hinder the proper functioning of mitochondrial respiration and these findings align with earlier research on *D. melanogaster* (Jørgensen et al., 2021; Menail et al., 2022; Roussel et al., 2023). The alteration of membrane composition that we

detected between acclimated groups might explain the decreases observed for CI-related respiration rates, notably for CI-LEAK (Chung et al., 2018; Chung & Schulte, 2020). Mitochondrial inner membrane fluidity and proton leakage are temperature-sensitive, increasing at higher temperatures (Chung & Schulte, 2015; Power et al., 2014; Roussel et al., 2023). However, when measured close to CT_{max} , although flies acclimated to 24 °C are able to maintain proton leak at high temperatures, CI-OXPHOS is highly affected, resulting in mitochondrial uncoupling, as seen with the CI coupling efficiency (Fig. 3A). Interestingly, this suggests that the 0.65 °C difference in CT_{max} between the acclimated groups translates into important differences in mitochondrial OCRs when measured at 40 °C. Importantly, this was not due to a limitation of complex IV reducing oxygen (downstream), as CIV maximal capacity was maintained between 24 and 40 °C in both acclimated groups (Fig. 2F). Moreover, it confirms that oxidation of NADH by CI is an important determinant of heat failure. However, the drastic decline observed at 40 °C in both groups for CI-OXPHOS was associated with only a small non-significant decrease in ATP production rate compared to the other assay temperatures (Fig. 4A). This is rather surprising, considering that other studies showed a significant decline in ATP production at or near CT_{max} in different species, including *Drosophila* albeit from different populations and under different conditions (Healy & Burton, 2023; Roussel et al., 2023; Willis et al., 2021). Nevertheless, this small decrease in CI-OXPHOS ATP synthesis rates might be insufficient to match the increased ATP demand at high temperatures, resulting in organismal heat failure.

The capacity for proline metabolism is present in insects, therefore this biochemical pathway could potentially play a crucial role in shaping their metabolic evolution (McDonald et al., 2018; Teulier et al., 2016). As previously shown, proline had a minimal impact on OCR in *Drosophila* (R. J. Cormier et al., 2021; Jørgensen et al., 2021; Menail et al., 2022) and did not alter the patterns observed with CI-OXPHOS at any measured temperature, with an important decline when measured at 40 °C for both groups (Fig. 2C). This is further evidenced by the SCR for proline (Fig. 3B), being the substrate that contributed the least to OCR (Fig. 3). However, when added with CI substrates for ATP production, the rates with proline were doubled when measured at 15 and 24 °C and increased by 3.5 folds when measured at 40 °C denoting of a differential thermal sensitivity

for ATP production. The oxidation of proline to pyrroline-5-carboxylate (P5C) provides electrons to Q, supporting CIII and CIV that participate in proton pumping (Hancock et al., 2016; McDonald et al., 2018), but P5C is also further catabolized to α -ketoglutarate via glutamate which enters the TCA cycle to yield NADH. Thus, the observed increased ATP production induced by proline could either come from the direct oxidation of proline by ProDH (via CIII and CIV proton pumping) or by increased oxidation of NADH (via CI, CIII and CIV proton pumping). These explanations are not mutually exclusive at assay temperatures of 15 and 24 °C but considering the drastic decline in both CI-OXPHOS and CI+ProDH-OXPHOS at 40 °C, this is rather unlikely at this temperature. Recently, it has been shown in mouse tissues with high ProDH activity (liver and kidney) that in combination with CI substrates, the effects of proline on oxygen consumption are masked (Pallag et al., 2022). However, proline participates in proton pumping supporting high ATP production even when CI is inhibited as seen with the measurement of the membrane potential (Pallag et al., 2022). Thus, the most parsimonious explanation for our results is that despite OCR due to NADH oxidation (CI-OXPHOS) are repressed at 40 °C, proline oxidation can sustain high rates of ATP production likely by participating indirectly to proton pumping despite no increased CI+ProDH-OXPHOS due to the masking effect of CI substrates. However, further experiments aiming at measuring membrane potential, NADH oxidation and Q redox status are required to properly understand the involvement of proline oxidation in mitochondrial thermal sensitivity.

When succinate was added, similar patterns as CI-OXPHOS and CI+ProDH-OXPHOS were observed (Fig. 2D). However, when CI+ProDH+CII-OXPHOS was measured at 40 °C in flies acclimated to 24 °C, the drastic decrease observed with the previous substrates was attenuated (Fig. 2D), suggesting a partial compensation of OCR by succinate oxidation also consistent with previous studies (Jørgensen et al., 2021; Menail et al., 2022; Roussel et al., 2023) as well as an important impact of acclimation on succinate oxidation. Despite this compensation in OCR, the addition of succinate did not significantly increase the ATP synthesis rate (Fig. 4C). Recently, Roussel et al. (2023) showed that succinate, in combination with pyruvate and malate, were able to rescue both OCR and ATP synthesis rates at high temperature in *Drosophila* (Roussel et al., 2023). Here, our results imply that the substrate combination used has an important impact on mitochondrial functions:

pyruvate, malate and proline were able to rescue ATP synthesis rates only, while pyruvate, malate, proline, and succinate were able to partially rescue OCR at high temperatures. This is also exacerbated when G3P is added, as OCR measured at 40 °C are fully compensated for in flies acclimated to 40 °C (doubling the rates compared with succinate; Fig. 2E), but again not in flies acclimated to 15 °C, denoting that acclimation capacity is also important for G3P oxidation. G3P also generally increased substantially ATP synthesis rates (around 50%; Fig. 5C). Although no differences were detected between acclimation groups at all temperatures assayed, it is interesting to note that the ATP synthesis rate with G3P was increased significantly between 24 and 40 °C in 24 °C-acclimated flies but was stable between these same temperatures for the 15 °C-acclimated flies. This translates into slightly lower G3P contribution for ATP production in flies acclimated to 15 °C (Fig. 5C). Thus, our results suggest that G3P is an important alternative substrate for mitochondrial flexibility at high temperatures, both for ATP production and OCR, and that acclimation to lower temperatures may hinder the capacity to oxidize G3P and produce ATP with this substrate at high temperature. Future studies considering different substrate combinations as well as NAD⁺ requirements in relation to oxygen consumption and ATP production should help understand how mitochondrial substrate oxidation is associated with heat failure.

In summary, our study reveals distinct thermal tolerances in *Drosophila* acclimated to different temperatures which is linked to a remodelling of membrane fatty acids as well as oxidation of different substrate combinations but not necessarily to ATP synthesis rates when measured at temperatures close to CT_{max}. Specifically, acclimation to lower temperatures hinders the proton leak supported by complex I as well as the capacity to oxidize succinate and G3P when measured at 40 °C. This translated into a small but non-significant impact on ATP synthesis rate when G3P is used as a substrate. Our study also demonstrates that despite being a poor substrate sustaining oxygen consumption, proline is however important for ATP synthesis in *Drosophila* likely by increasing proton pumping through CIII and CIV. Thus, our study shows that the CT_{max} of *Drosophila* is intricately linked to the mitochondrial substrate oxidation capacity (especially succinate and G3P) which is importantly influenced by thermal acclimation. This suggests that compensatory mechanisms to sustain mitochondrial oxygen consumption are in place to buffer the effects

of critically high temperatures in *Drosophila*. However, this buffering capacity is highly dependent on the thermal environment individuals are acclimated to. Considering the higher frequency and intensity of heatwaves observed in recent years, this has thus important implications for the survival and adaptation of natural populations. Moreover, our study challenges the role of ATP in shaping thermal tolerance and temperature adaptation in insects and indicates that the substrate combination used by mitochondria is essential to understand temperature effects on organisms. However, maximizing substrate fluxes that fuel mitochondria for oxygen consumption and ATP synthesis is not necessarily a good indicator of the *in vivo* situation. Studies on how *in vivo* metabolic fluxes are altered at high temperatures and influence mitochondrial ATP synthesis and oxygen consumption in ectotherms are therefore essential to fully grasp the connection between mitochondria and heat failure.

3 DISCUSSION GÉNÉRALE

3.0 Discussion générale

La capacité d'acclimatation joue un rôle crucial dans la tolérance thermique chez les insectes et pourrait aider à atténuer les effets du changement climatique et jouer un rôle dans l'adaptation aux changements de température. La température environnementale exerce une forte influence sur les performances et la survie des insectes si les températures deviennent extrêmes, car tous les processus biochimiques et physiologiques dépendent de la température (Jørgensen et al., 2023). Cependant, l'étude des insectes a été négligée en matière de fonctions mitochondriales et des ajustements du métabolisme à haute température. Des liens forts existent entre le CT_{max} et l'échec du métabolisme mitochondrial, mais le mécanisme précis derrière cet échec reste inconnu.

3.1 Effet de la température sur le phénotype de l'organisme (HTA et CCR)

Nos résultats démontrent que la température d'acclimatation affecte la tolérance au froid et au chaud des drosophiles. Les drosophiles acclimatées à 15 °C ont démontré une meilleure tolérance au froid, car elles ont mis moins de temps à retrouver des fonctions neuromusculaires contrôlées après avoir été exposées à 0 °C pendant 2 heures, par rapport aux drosophiles acclimatées à 24 °C. Kimura et al. (1994) ont étudié les effets de l'acclimatation à 11 et 15 °C avec une exposition à 2 °C chez *D. lutescens*, *D. trilineata*, *D. protipennis* et *D. takahashii*. Les drosophiles acclimatées à la température la plus froide ont survécu significativement plus longtemps que les drosophiles acclimatées à la température la plus chaude (Kimura et al., 1994). Une autre étude réalisée par Goto et Kimura (1998) sur la tolérance au froid et à la chaleur chez *D. watanabei*, *D. trapezifrons* et *D. triauraria* élevées à 15 °C et 23 °C a montré que les mouches élevées à 15 °C ont une plus grande résistance au froid que celles élevées à 23 °C (Goto & Kimura, 1998), ce qui est en adéquation avec nos résultats. Une étude de Košťál et al. (2011) sur l'acclimatation au froid à long terme et les larves de *D. melanogaster* a aussi montré que l'acclimatation au froid à long terme améliorerait considérablement la tolérance au froid chez les larves de troisième stade adulte en comparant les températures d'acclimatation de 15 °C et de 25 °C (Košťál et al., 2011). Nos résultats et la littérature semblent suggérer que l'acclimatation au froid améliore la tolérance au froid chez la drosophile.

La température peut avoir un impact significatif sur le métabolisme, en particulier chez les ectothermes, elle affecte les enzymes métaboliques qui sont responsables de la gestion de l'homéostasie de l'énergie cellulaire, ce qui peut affecter la sensibilité thermique et conduire à une défaillance (Roussel et al., 2023; Sokolova, 2023). Le CT_{max} d'une espèce est un bon indicateur de sa tolérance à la chaleur. Dans notre étude, nous avons réalisé un essai de CT_{max} pour mesurer la tolérance à la chaleur sur des mâles de drosophile âgés de 20 jours acclimatés à 15 ou 24 °C. Comme prévu, les mouches acclimatées à 15 °C avaient un CT_{max} plus petit (38.84 ± 0.05 °C) que les mouches acclimatées à 24 °C (39.49 ± 0.06 °C). Moins d'un degré Celsius sépare les CT_{max} des deux températures d'acclimatation. Dans une étude récente, nous avons démontré que la tolérance thermique (CT_{max}) était corrélée à l'échec de la consommation d'oxygène mitochondriale au niveau du CI et à l'utilisation de substrats oxydatifs alternatifs (Jørgensen et al., 2021). Plus précisément, la consommation d'oxygène mitochondriale soutenue par les substrats du CI était significativement réduite à des températures proches du CT_{max} et l'oxydation du G3P par la mG3PDH était augmentée (Jørgensen et al., 2021). Cela indique que les mitochondries font preuve d'une remarquable flexibilité face aux changements de température, ce qui leur permet de passer d'une voie métabolique standard à une voie plus résistante à la chaleur. Cette capacité d'adaptation peut faciliter un renouvellement plus important de l'énergie, assurant ainsi l'homéostasie pendant les fluctuations de température (Menail et al., 2022).

3.2 Effet de la température sur le profil d'acide gras

Le maintien de la fonction membranaire et de l'intégrité structurelle des membranes cellulaires face aux températures froides est essentiel à la survie des animaux ectothermes, comme les insectes (Hazel, 1995; Slotsbo et al., 2016). En réponse aux températures froides, les insectes ont développé des modifications structurelles compensatoires au niveau de la composition des lipides membranaires pour contrebalancer les effets indésirables du froid sur leurs membranes lipidiques (Cooper et al., 2014; Hazel, 1995; Overgaard et al., 2008; Slotsbo et al., 2016). De plus, selon l'hypothèse de l'adaptation homéovisqueuse (Hazel, 1995), l'adaptation ou l'acclimatation au froid induit des modifications de la composition des lipides membranaires, ce qui contribue au maintien

d'une fluidité membranaire relativement constante pour les espèces/populations acclimatées à des conditions thermiques différentes.

Nos résultats démontrent qu'une acclimatation de 15 jours à 15 °C entraîne une augmentation du pourcentage d'acides gras saturés et monoinsaturés, ainsi qu'une diminution du pourcentage d'acides gras polyinsaturés. La désaturation des acides gras dans les lipides membranaires fait l'objet de nombreuses études sur les processus d'acclimatation ou d'adaptation chez les ectothermes en réponse aux températures froides (Hazel, 1995; Kostal & Simek, 1998). Certaines modifications structurelles de la composition de la membrane sont généralement associées à l'adaptation au froid, comme le raccourcissement de la longueur des chaînes d'acides gras des phospholipides, de l'insertion de doubles liaisons supplémentaires dans les acides gras des phospholipides, et de la modification des groupes de tête des phospholipides (Košťál, 2010).

Les organismes tolérants au froid sont connus pour contenir une plus grande proportion d'acides gras insaturés dans les phospholipides des membranes cellulaires que les organismes susceptibles au froid. Ce phénomène a lieu pour assurer le maintien de la fluidité membranaire à des températures froides (Overgaard et al., 2008; Slotsbo et al., 2016). Les acides gras insaturés ont des doubles liaisons dans leurs chaînes d'hydrocarbures qui introduisent des 'coudes' et empêchent les molécules de se serrer les unes contre les autres. Cette caractéristique accroît la fluidité de la bicouche lipidique, ce qui permet à la membrane d'être plus souple et de ne pas devenir trop rigide à des températures froides. Cependant, nos résultats semblent contredire cette notion, car nous avons observé une augmentation du pourcentage d'acides gras saturés et monoinsaturés ainsi qu'une diminution du pourcentage d'acides gras polyinsaturés chez les drosophiles acclimatées à 15 °C. À cet égard, nos observations s'accordent avec une étude d'Ohtsu et al. (1998), qui a montré que la tolérance au froid était associée à une légère augmentation du nombre d'acides gras saturés des phospholipides, ainsi qu'à un raccourcissement des chaînes d'acides gras des phospholipides, ce que nous avons notamment observé avec l'acide myristique, ainsi qu'avec une augmentation générale des acides gras à 16 carbones et une diminution des acides gras à 18 carbones. Toutefois, il convient de noter que nous n'avons pas examiné les acides gras à chaînes plus courtes (Ohtsu et al., 1998).

Il est largement reconnu que les phospholipides avec des chaînes d'acides gras plus courtes aident à préserver la fluidité de la membrane à des températures plus froides (Košťál, 2010). Nos résultats supportent cette notion, du fait que les drosophiles avec une meilleure tolérance au froid avaient plus d'acides gras à courtes chaînes comparativement aux drosophiles moins tolérantes au froid qui avaient plus d'acides gras à longues chaînes.

Il est aussi intéressant de noter que Shen et al. (2010) ont démontré que la drosophile est dépourvue de delta 5- et delta 6-désaturases, qui jouent un rôle dans la production d'acides gras insaturés à longues chaînes (Shen et al., 2010). On peut donc en déduire qu'en raison de la proportion très faible d'acides gras polyinsaturés à longues chaînes, la drosophile a recours à la réduction des chaînes d'acides gras plutôt qu'à l'insaturation des acides gras membranaires comme mécanisme d'acclimatation thermique. Cette altération des acides gras est susceptible d'avoir un impact sur le fonctionnement des protéines membranaires, y compris celles des complexes mitochondriaux, avec des conséquences potentielles sur le métabolisme mitochondrial.

3.3 Effet de la température sur la respiration mitochondriale

Notre étude s'est concentrée sur les changements de la respiration mitochondriale dans les thorax perméabilisés de la drosophile, en réponse à différentes températures de mesure et températures d'acclimatation. Nous avons observé que l'acclimatation de la drosophile et les températures de mesures exercent un impact significatif sur la respiration mitochondriale. Plus précisément, la capacité du CI de l'ETS à fonctionner lors du stade de phosphorylation oxydative (CI-OXPHOS) s'est avérée significativement altérée chez les drosophiles acclimatées à 15 et 24 °C lorsqu'elles ont été mesurées à 40 °C. Ces résultats suggèrent que les substrats liés au NADH (pyruvate et malate) dérivés de la glycolyse et du cycle TCA ne participent pas activement à la respiration mitochondriale à de hautes températures.

Le CI-LEAK qui correspond au retour des protons dans la matrice mitochondriale de l'espace intermembranaire sans passer par l'ATP synthase a démontré une différence significative entre les températures d'acclimatation (15 et 24 °C), lorsque mesurées à 40 °C. Une explication potentielle serait que les drosophiles acclimatées à 24 °C ont plus d'acides gras polyinsaturés comparativement aux drosophiles acclimatées à 15 °C, ce qui

pourrait affectés leurs fluidités membranaires et comme conséquences augmenter le CI-LEAK.

Le CI, élément crucial de l'ETS situé dans la membrane mitochondriale interne, assure le transfert des électrons du NADH à la coenzyme Q (ubiquinone) tout en pompant les protons à travers la membrane mitochondriale interne, créant ainsi un gradient de protons essentiel à la synthèse de l'ATP. Les preuves disponibles suggèrent fortement que la température a un impact significatif sur le CI-OXPHOS chez les drosophiles : des températures élevées peuvent entraver le bon fonctionnement de la respiration mitochondriale, soulignant l'importance du contrôle de la température lors de l'étude de la respiration mitochondriale chez les drosophiles. Ces résultats s'accordent avec des recherches antérieures portant sur *Drosophila melanogaster* ainsi que sur d'autres insectes au niveau des effets de la température sur la respiration mitochondriale (Jørgensen et al., 2021; Menail et al., 2022; Roussel et al., 2023).

Par ailleurs, il est à noter que les températures élevées peuvent non seulement dénaturer les protéines, mais aussi réorganiser les membranes et influencer la fluidité membranaire, induire une production élevée de ROS, perturber le transport des substrats et affecter l'apport d'oxygène. Tous ces facteurs peuvent perturber le fonctionnement optimal des mitochondries, potentiellement entraînant un découplage mitochondrial menant à un déséquilibre entre l'offre et la demande d'ATP, et perturbant ainsi le métabolisme aérobie et la physiologie de l'organisme au complet (Blier et al., 2014; Chung & Schulte, 2020; Hochachka & Somero, 2002; Menail et al., 2022; Schulte, 2015).

Comme évoqué précédemment, l'une des explications possibles de la diminution du taux de consommation d'oxygène du CI pourrait résider dans la réorganisation des membranes et donc des ajustements au niveau de la fluidité membranaire (Chung et al., 2018; Chung & Schulte, 2020). L'échec du CI à des températures élevées pourrait en effet être lié aux changements des propriétés physiques de la bicouche lipidique qui forme la membrane interne de la mitochondrie, ce qui affecte le fonctionnement des protéines enchâssées dans cette membrane, telle que les complexes de l'ETS (Christen et al., 2018). Le CI est constitué de plusieurs sous-unités protéiques, dont certaines traversent la membrane mitochondriale interne et qui sont donc intégrées dans la bicouche lipidique.

L'intégrité structurelle et la bonne disposition des sous-unités sont cruciales pour l'activité du CI. Il est aussi important de noter que la fluidité de la membrane mitochondriale interne et la fuite de protons sont sensibles à la température, augmentant à des températures élevées (Roussel et al., 2023). À des températures élevées, il est donc possible que la fluidité accrue de la membrane entraîne des changements dans l'organisation des sous-unités protéiques, affectant ainsi leurs interactions et leur stabilité globale, ce qui provoque une diminution de l'efficacité ou une défaillance du CI dans le transfert des électrons et le pompage des protons. Sachant que les membranes biologiques, y compris les membranes mitochondriales, possèdent une capacité d'adaptation homéovisqueuse comme mentionné précédemment, ce qui leur permet de maintenir une fluidité constante dans une plage fonctionnelle, même en cas de variations de température (Hazel, 1995; Sinensky, 1974), nos résultats suggèrent que malgré un ajustement de composition en acide gras des membranes durant l'acclimatation, la température de mesure de 40°C est trop élevée pour assurer les membranes, ce qui pourrait être la cause de la défaillance du CI.

Afin d'aller évaluer d'autres entrées d'électrons au niveau de l'ETS, d'autres substrats ont ensuite été utilisés afin de mesurer la consommation d'oxygène mitochondriale. La proline n'a que peu influencé les taux de consommation d'oxygène lorsqu'elle a été mesurée aux trois températures d'essai et, globalement, n'a pas modifié la tendance observée avec CI-OXPHOS. Ceci est également démontré par le taux de contribution des substrats pour la proline, étant le substrat qui a contribué le moins. Le CII a montré des tendances similaires au CI pour les drosophiles acclimatées à 15°C, mais lorsque mesuré à 40°C dans les mouches acclimatées à 24°C, une augmentation a été observée, suggérant que les taux d'oxydation du succinate sont influencés par la température d'acclimatation. Ainsi, contrairement aux mouches acclimatées à 15°C, les mouches acclimatées à 24°C sont capables de compenser partiellement la chute drastique de la consommation d'oxygène à haute température par un taux d'oxydation plus élevé du succinate. Ceci est encore plus flagrant lorsque le G3P est ajouté comme substrat oxydatif : la mG3PDH a maintenu des taux de consommation d'oxygène élevés, notamment à des températures élevées. La seule condition où les taux de consommation d'oxygène n'ont pas augmenté était lorsque les drosophiles étaient acclimatées à 15 °C et mesurées à 40 °C. Ceci pourrait être dû au CT_{max} , qui est un bon indicateur de la tolérance thermique d'une

espèce. Les drosophiles acclimatées à 15 °C ont un CT_{max} plus petit (38.84 ± 0.05 °C) que les drosophiles acclimatées à 24 °C (39.49 ± 0.06 °C) : moins d'un degré Celsius sépare le CT_{max} des deux températures d'acclimatation. Cette différence pourrait donc expliquer la diminution de la consommation d'oxygène précédemment décrite chez les drosophiles acclimatées à 15 °C par rapport à 24 °C. Le fait d'être acclimatées à une température plus chaude ferait qu'elles puissent tolérer une température d'essai plus chaude. Pour les drosophiles acclimatées à 24 °C et mesurées à 40 °C, la valeur des taux de consommation d'oxygène a doublé. Les drosophiles acclimatées à 24 °C ont montré une augmentation significative de l'augmentation des taux de consommation d'oxygène par rapport aux drosophiles acclimatées à 15 °C lorsqu'elles ont été mesurées à 24 °C. Cela montre que le succinate, mais surtout le G3P sont des substrats importants pour les drosophiles, ce qui est également démontré dans les taux de contributions de substrats, le succinate et le G3P étant les substrats qui contribuent le plus. Ceci est cohérent avec les recherches montrant que le G3P est un substrat important pour la respiration mitochondriale (R. J. Cormier et al., 2021; Jørgensen et al., 2021; Menail et al., 2022; Pichaud et al., 2010, 2011). Le taux de consommation maximale du CIV augmente avec la température et est similaire pour les drosophiles acclimatées à 15 et 24 °C lorsqu'il est mesuré à 15, 24 et 40 °C. En fin de compte, ces résultats mettent en lumière la complexité de la régulation de la respiration mitochondriale en réponse à la température et aux substrats, tout en soulignant l'importance de la fluidité membranaire et de la composition lipidique dans ce contexte.

3.4 Effet de la température sur la production d'ATP

Nos résultats mettent aussi en évidence l'influence significative de la température d'acclimatation et de la température d'essai sur la synthèse d'ATP. La réduction du taux de synthèse d'ATP observée lors de l'ajout de pyruvate, malate et ADP pourrait découler de l'incapacité des enzymes du cycle TCA à fournir suffisamment de NADH au CI (Jørgensen et al., 2021; Roussel et al., 2023). Ce dysfonctionnement pourrait être attribuable aux températures élevées et à leur impact négatif sur l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH) et de la citrate synthase (CS). En revanche, l'ajout de proline a entraîné une augmentation significative du taux de synthèse de l'ATP, en particulier lorsque mesuré à 40 °C. Ceci est également démontré par le SCR pour la production d'ATP, avec la proline

comme principal contributeur. Il est important de noter que, bien que la plupart des animaux ne se reposent pas sur les protéines comme source principale d'énergie, la proline semble jouer un rôle crucial en tant que source métabolique dans plusieurs insectes. Par exemple, les diptères utilisent la proline comme source d'énergie principale dans leurs muscles de vol (Misener et al., 2001), et certains insectes hématophages tels que la mouche tsétsé dépendent également de la proline (Bursell, 1963; Teulier et al., 2016). La capacité à métaboliser la proline est présente chez les insectes, et a donc probablement joué un rôle essentiel dans l'évolution de leur métabolisme (Teulier et al., 2016). De plus, des niveaux accrus de proline ont été corrélés à l'acclimatation au froid et à la tolérance au froid chez des espèces telles que les mouches, les coléoptères et les grillons. Contrairement aux vertébrés, les plantes et les insectes peuvent stocker les acides aminés, et des niveaux élevés de proline peuvent être trouvés dans l'hémolymphe de certains insectes (Misener et al., 2001).

Au niveau de la tolérance au froid, des niveaux accrus de proline protègent les cellules contre le stress oxydatif en préservant l'environnement redox du glutathion. Il a donc été suggéré que la biosynthèse de la proline peut être considérée comme une réponse au stress oxydatif plutôt qu'un mécanisme direct de tolérance au froid (MacMillan et al., 2016). De plus, la proline peut être utilisée pour augmenter les intermédiaires du cycle TCA, favorisant ainsi le flux métabolique dans cette voie (MacMillan et al., 2016). Il est tout de même intéressant de noter que ce substrat n'ait pas augmenté significativement les taux de consommation d'oxygène, quelles que soient les températures testées ou les températures d'acclimatation des drosophiles. Les taux de production d'ATP ont doublé avec ce substrat aux températures de mesure de 15 et 24 °C et ont plus que triplés à 40 °C. Il a récemment été démontré chez le foie et le rein de souris (qui ont une activité de la proline déshydrogénase) que l'ajout de substrats du CI (pyruvate et malate) avant la proline masque l'effet de celle-ci sur la consommation d'oxygène (Pallag et al., 2022). Dans cette étude, les auteurs ont aussi démontré que malgré cet effet, l'oxydation de la proline participait quand même au potentiel membranaire et donc au pompage de protons à travers la membrane interne mitochondriale et de ce fait à la production d'ATP (Pallag et al., 2022). Selon nos résultats, il reste difficile de savoir exactement l'effet de la proline sur les

fonctions mitochondriales, mais il semblerait que ce substrat permettrait le pompage de protons et participerait activement à la production d'ATP, surtout à hautes températures.

L'ajout de succinate et de G3P n'a pas semblé affecter significativement la synthèse d'ATP, ce qui est cohérent avec les conclusions de Roussel et al. (2023). Ces auteurs ont démontré qu'une réduction de l'oxydation du pyruvate + malate à 35 °C entraîne une baisse de la synthèse d'ATP et une baisse du rapport ATP/O, tandis que l'ajout de succinate a compensé cette diminution au niveau des taux de consommation d'oxygène et de synthèse d'ATP à haute température. En revanche, l'ajout de G3P a augmenté le taux de consommation d'oxygène sans apporter de bénéfice supplémentaire en termes de production d'ATP (Roussel et al., 2023). Ces observations sont en partie en accord avec nos résultats. En effet, les résultats démontrant une forte augmentation de consommation d'oxygène avec le succinate et le G3P, mais quasiment aucune participation à la production d'ATP suggère que le transport des électrons à haute température est découplé du processus de phosphorylation oxydative. Ce processus de découplage pourrait être une stratégie pour minimiser l'augmentation de la production de ROS attendue à haute température, comme précédemment suggéré (Brand, 2000). Cependant, nos résultats sur l'effet des hautes températures sur la production d'ATP au niveau du CI n'est pas en accord avec cette étude, car une diminution significative des taux de synthèse d'ATP aurait été attendue. Cependant, bien qu'une diminution significative ne soit pas observée à 40 °C, nous observons tout de même une petite diminution qui pourrait entraîner un déséquilibre au niveau de la production d'ATP comparativement à la consommation accrue d'ATP requise pour alimenter différents processus cellulaires. De ce fait, il est aussi possible qu'à haute température, la production d'ATP ne soit pas suffisante, ce qui participerait au mécanisme cellulaire de perte de contrôle neuromusculaire observé lors de la mesure du CT_{max} .

3.5 Limites de l'étude

Notre étude présente des avancées significatives dans la compréhension des mécanismes sous-jacents de l'effet de la température sur les fonctions mitochondriales chez les drosophiles, tout en exposant certaines limites inhérentes à tout projet de recherche. L'une de ces limites réside dans notre première tentative d'exploiter le système Gal4 X UAS pour créer un modèle déficient en mG3PDH. Initialement notre projet allait être plus

axé sur l'implication de la mG3PDH chez la drosophile. Le système Gal4-UAS est un outil génétique couramment utilisé en recherche biologique pour réguler de manière précise et spécifique l'expression génique dans divers tissus. Il est constitué de deux éléments principaux : le facteur de transcription Gal4, qui se lie à la séquence d'activation en amont (UAS), et l'UAS lui-même. Lorsque Gal4 se lie à l'UAS, il déclenche la transcription du gène cible. Les chercheurs peuvent induire l'expression de Gal4 dans un type spécifique de cellule ou de tissu en utilisant des promoteurs spécifiques. Une fois que Gal4 est présent dans le tissu souhaité, les gènes cibles peuvent être activés ou inhibés via l'UAS. Ce système est largement utilisé dans des organismes modèles tels que les drosophiles (Halpern et al., 2008; Webster et al., 1988). Malgré nos efforts soutenus, nous n'avons pas réussi à obtenir des drosophiles déficientes en mG3PDH à l'aide de ce système. Plusieurs problèmes potentiels, tels que le choix du promoteur, la qualité de la lignée transgénique, la compatibilité Gal4-UAS, le contexte génétique, la régulation de la température (car le système Gal4-UAS peut être sensible à la température), les niveaux d'expression de Gal4, l'efficacité de la lignée UAS et les stratégies de croisement, ont pu influencer nos résultats. Pour l'avenir, il pourrait être envisagé de recourir à des stratégies alternatives pour créer une lignée déficiente en mG3PDH afin de bien déterminer le rôle de cette protéine dans l'établissement de la tolérance thermique chez les drosophiles.

Une deuxième limite de notre étude concerne le manque de prise en compte du concept de degrés-jour (DJ) (Allsopp & Butler, 1987; Baskerville & Emin, 1969). Les ectothermes, comme les drosophiles, sont incapables de maintenir une température corporelle constante en raison de leur incapacité à produire suffisamment de chaleur (Flouris & Piantoni, 2015). De plus, il est établi que la température affecte le taux métabolique et la durée de vie des ectothermes (Miquel et al., 1976). Les DJ sont une mesure utile pour évaluer les conditions thermiques disponibles pour la croissance ectothermique (Honsey et al., 2019). Toutefois, dans notre étude, nous avons choisi de ne pas tenir compte des DJ, préférant nous baser uniquement sur l'âge en jours des drosophiles. Par conséquent, théoriquement, les drosophiles acclimatées à 15 °C pendant 15 jours pourraient être plus jeunes que celles acclimatées à 24 °C pendant la même durée, en fonction des DJ, ce qui pourrait influencer leur métabolisme.

Une troisième limite pour cette étude est au niveau des choix de substrats utilisés pour les expériences du taux de consommation d'oxygène mitochondriale et de la production d'ATP. Pour ces expériences divers substrats et combinaisons de substrats ont été utilisés et une limitation de cette étude serait donc le choix de substrats injectés. Comme démontré par nos résultats, la combinaison des substrats a des effets distincts sur la consommation d'oxygène et la production d'ATP. En plus des groupes de substrats que nous avons injectés, il aurait été possible d'évaluer individuellement chaque substrat et d'explorer d'autres combinaisons. Toutefois, l'ajout de ces mesures supplémentaires aurait été peu réaliste dans le cadre de notre expérience actuelle. Une prochaine étude pourrait se consacrer à cette problématique.

Une dernière limite de notre étude est l'utilisation exclusive de drosophiles mâles. En recherche scientifique, l'objectif est de réduire au maximum la variabilité afin d'augmenter la confiance dans le fait que toute modification observée chez un animal ou un être humain est attribuable à l'intervention expérimentale. C'est pourquoi de nombreuses études excluent les femelles de leurs modèles scientifiques. Cependant, cette approche soulève diverses problématiques pour la recherche actuelle, notamment dans le contexte des essais sur les humains. Afin de remédier à cette limitation, il aurait été bénéfique d'inclure un groupe de drosophiles femelles dans nos expériences. Il est essentiel de reconnaître que chaque étude comporte des limitations significatives, mais qu'il existe toujours des opportunités d'amélioration et d'optimisation des expériences, comme c'est le cas pour notre recherche. Aborder ces limitations pourrait contribuer à répondre à des questions supplémentaires soulevées par nos découvertes.

3.6 Perspectives

Comme perspective pour cette étude, l'exploration de plusieurs autres paramètres visant à évaluer la fluidité membranaire serait pertinente. Pour ce faire, il serait possible de mesurer la variation du rapport entre la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC) au sein des membranes des drosophiles. Ces deux composants, PE et PC, constituent les principaux glycérophospholipides des membranes des drosophiles, et des modifications dans leur rapport PE/PC et la saturation des chaînes d'acyl peuvent influencer les forces de Van der Waals au sein de la bicouche lipidique, ce qui,

selon certaines prévisions, régulerait la fluidité membranaire en réaction à diverses conditions thermiques (Cooper et al., 2012).

De plus, il serait intéressant d'évaluer la production de ROS, car ceci pourrait apporter une contribution significative à notre étude. La température est un élément crucial de notre recherche, et elle peut influencer la vitesse des réactions biochimiques, notamment celles impliquées dans le métabolisme cellulaire. Les températures élevées ont tendance à augmenter la production de ROS, qui sont des sous-produits de la respiration cellulaire (Jørgensen et al., 2021). Alors que le CI de l'ETS est généralement reconnu comme une source de ROS, la mG3PDH est aussi reconnue comme étant un contributeur important, et même le plus important chez la drosophile (Orr et al., 2014). De plus, la température a un impact sur la fluidité membranaire, et des membranes plus fluides favorisent la diffusion des ROS, augmentant ainsi les risques de dommages oxydatifs. Par conséquent, les lipides de la membrane entourant les protéines du système de transport d'électrons, qui génèrent des ROS, peuvent être particulièrement vulnérables aux dommages oxydatifs (Hagopian et al., 2010). Certains ROS peuvent déclencher la peroxydation des lipides, un processus au cours duquel un radical peroxy se forme lorsqu'un ROS suffisamment réactif élimine un atome d'hydrogène d'un lipide intact. Cette interaction entre les ROS et les lipides constitue l'un des mécanismes les plus courants de dommages cellulaires (Halliwell & Gutteridge, 1989). Par conséquent, l'étude de la production de ROS à des températures élevées pourrait constituer une voie prometteuse pour la recherche future, en particulier en relation avec les déficiences observées dans le CI-OXPHOS et la fluidité membranaire.

Enfin, il serait également pertinent d'évaluer le rapport entre l'ATP produit et l'oxygène consommé (ATP/O). Cette mesure permet d'évaluer l'efficacité de la respiration cellulaire et de la phosphorylation oxydative, en quantifiant l'ATP produite par molécule d'oxygène consommée au cours de ces processus. Des changements dans le rapport ATP/O pourraient indiquer des modifications au niveau du système de transport d'électrons ou de l'ATP synthase, apportant ainsi une nouvelle dimension à notre étude et fournissant des informations supplémentaires sur la production d'énergie, les fonctions mitochondriales et la santé cellulaire en général.

3.7 Conclusions

Cette thèse permet de mieux comprendre l'impact de la plasticité phénotypique sur la production d'ATP et la capacité d'oxydation des substrats à température normale et élevée (CT_{max}) chez un organisme modèle, *Drosophila melanogaster*. Particulièrement, nous avons analysé la tolérance au froid et au chaud, analysé le profil lipidique, élucidé la dynamique de l'oxydation des substrats impliqués dans la respiration mitochondriale et dans la synthèse d'ATP dans les muscles thoraciques suivant une acclimatation à deux températures (15 et 24 °C).

Notre étude révèle des tolérances thermiques distinctes chez les drosophiles acclimatées à différentes températures qui sont liées à un remodelage des acides gras membranaires ainsi qu'à l'oxydation de différentes combinaisons de substrats, mais pas nécessairement aux taux de synthèse de l'ATP. Plus précisément, les drosophiles acclimatées à 15 °C affichent une moindre tolérance à la chaleur, mais une plus grande résistance au froid par rapport aux drosophiles acclimatées à 24 °C. Par ailleurs, les drosophiles acclimatées à 15 °C présentent une augmentation des acides gras saturés et monoinsaturés, ainsi qu'une diminution d'acides gras polyinsaturés. Également, le CT_{max} de la drosophile semble être lié à la capacité d'oxydation de divers substrats lors des ajustements de température, avec des répercussions potentielles sur la production d'ATP. De plus, l'acclimatation à des températures plus basses limite la fuite de protons au niveau du CI ainsi que la capacité d'oxyder le succinate et le G3P. Notre étude démontre également que malgré le fait que la proline soit un mauvais substrat soutenant la consommation d'oxygène, elle est cependant importante pour la synthèse d'ATP chez la drosophile, probablement en augmentant le pompage de protons à travers CIII et CIV. Ainsi, notre étude montre que le CT_{max} de la drosophile est étroitement lié à la capacité d'oxydation des substrats mitochondriaux, particulièrement le succinate et le G3P, qui est fortement influencée par l'acclimatation thermique. Cela suggère la mise en place d'un mécanisme compensatoire visant à soutenir la consommation d'oxygène mitochondrial pour atténuer les effets des températures très élevées. Toutefois, il est important de noter que cette capacité d'atténuation dépend de l'environnement thermique auquel les individus sont acclimatés. Compte tenu de la fréquence et de l'intensité accrues des vagues de chaleur observées ces dernières années, ceci a donc des implications importantes pour la survie et l'adaptation des populations naturelles. De plus, notre étude remet en question l'importance

de l'ATP dans le processus de tolérance et d'adaptation des insectes à la température, tout en soulignant que la combinaison de substrats employée par les mitochondries et donc la flexibilité mitochondriale joue un rôle essentiel dans la compréhension des effets de la température sur ces organismes. Toutefois, les flux de substrats qui approvisionnent les mitochondries pour la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP lors de nos expériences ne constituent pas nécessairement un indicateur adéquat de la situation *in vivo*. Ainsi, des études sur la manière dont les flux métaboliques *in vivo* sont altérés à des températures élevées et influencent la synthèse d'ATP par les mitochondries, ainsi que la consommation d'oxygène chez les ectothermes, se révèlent essentielles pour une compréhension approfondie de la relation entre les mitochondries et la défaillance liée à la chaleur.

RÉFÉRENCES

- Abrahamson, J. L. A., Baker, L. G., Stephenson, J. T., & Wood, J. M. (1983). Proline Dehydrogenase from *Escherichia coli* K12. *European Journal of Biochemistry*, *134*(1), 77–82. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07533.x>
- Ahmad, M., Wolberg, A., & Kahwaji, C. I. (2022). Biochemistry, Electron Transport Chain. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526105/>
- Allsopp, P. G., & Butler, D. G. (1987). Estimating day-degrees from daily maximum-minimum temperatures: A comparison of techniques for a soil-dwelling insect. *Agricultural and Forest Meteorology*, *41*(1), 165–172. [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(87\)90076-1](https://doi.org/10.1016/0168-1923(87)90076-1)
- Arentson, B. W., Sanyal, N., & Becker, D. F. (2012). Substrate channeling in proline metabolism. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, *17*, 375–388.
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). INSECT FAT BODY: ENERGY, METABOLISM, AND REGULATION. *Annual Review of Entomology*, *55*, 207–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Baskerville, G. L., & Emin, P. (1969). Rapid Estimation of Heat Accumulation from Maximum and Minimum Temperatures. *Ecology*, *50*(3), 514–517. <https://doi.org/10.2307/1933912>
- Beenackers, A. M. Th., Van der Horst, D. J., & Van Marrewijk, W. J. A. (1984). Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochemistry*, *14*(3), 243–260. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(84\)90057-X](https://doi.org/10.1016/0020-1790(84)90057-X)

- Blier, P. U., & Lemieux, H. (2001). The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. *Journal of Comparative Physiology B*, 171(3), 247–253.
<https://doi.org/10.1007/s003600000169>
- Blier, P. U., Lemieux, H., & Pichaud, N. (2014). Holding our breath in our modern world: Will mitochondria keep the pace with climate changes? *Canadian Journal of Zoology*, 92(7), 591–601. <https://doi.org/10.1139/cjz-2013-0183>
- Brand, M. D. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology*, 35(6), 811–820.
[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00135-2)
- Bursell, E. (1963). Aspects of the metabolism of amino acids in the tsetse fly, *Glossina* (Diptera). *Journal of Insect Physiology*, 9(4), 439–452.
[https://doi.org/10.1016/0022-1910\(63\)90054-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(63)90054-4)
- Bursell, E., & Slack, E. (1976). Oxidation of proline by sarcosomes of the tsetse fly, *Glossina morsitans*. *Insect Biochemistry*, 6(2), 159–167.
[https://doi.org/10.1016/0020-1790\(76\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0020-1790(76)90026-3)
- Candy, D. J., Becker, A., & Wegener, G. (1997). Coordination and Integration of Metabolism in Insect Flight*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 117(4), 497–512.
[https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00212-5](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00212-5)
- Chinopoulos, C., Vajda, S., Csanády, L., Mándi, M., Mathe, K., & Adam-Vizi, V. (2009). A Novel Kinetic Assay of Mitochondrial ATP-ADP Exchange Rate Mediated by

- the ANT. *Biophysical Journal*, 96(6), 2490–2504.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3915>
- Chown, S. L., Jumbam, K. R., Sørensen, J. G., & Terblanche, J. S. (2009). Phenotypic variance, plasticity and heritability estimates of critical thermal limits depend on methodological context. *Functional Ecology*, 23(1), 133–140.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01481.x>
- Christen, F., Desrosiers, V., Dupont-Cyr, B. A., Vandenberg, G. W., Le François, N. R., Tardif, J.-C., Dufresne, F., Lamarre, S. G., & Blier, P. U. (2018). Thermal tolerance and thermal sensitivity of heart mitochondria: Mitochondrial integrity and ROS production. *Free Radical Biology & Medicine*, 116, 11–18.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.037>
- Chung, D. J., & Schulte, P. M. (2015). Mechanisms and costs of mitochondrial thermal acclimation in a eurythermal killifish (*Fundulus heteroclitus*). *The Journal of Experimental Biology*, 218(Pt 11), 1621–1631. <https://doi.org/10.1242/jeb.120444>
- Chung, D. J., & Schulte, P. M. (2020). Mitochondria and the thermal limits of ectotherms. *The Journal of Experimental Biology*, 223(Pt 20), jeb227801.
<https://doi.org/10.1242/jeb.227801>
- Chung, D. J., Sparagna, G. C., Chicco, A. J., & Schulte, P. M. (2018). Patterns of mitochondrial membrane remodeling parallel functional adaptations to thermal stress. *Journal of Experimental Biology*, 221(7), jeb174458.
<https://doi.org/10.1242/jeb.174458>

- Colinet, H., Renault, D., & Roussel, D. (2017). Cold acclimation allows *Drosophila* flies to maintain mitochondrial functioning under cold stress. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *80*, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.11.007>
- Collier, R. J., Baumgard, L. H., Zimelman, R. B., & Xiao, Y. (2019). Heat stress: Physiology of acclimation and adaptation. *Animal Frontiers*, *9*(1), 12–19. <https://doi.org/10.1093/af/vfy031>
- Cooper, B. S., Hammad, L. A., Fisher, N. P., Karty, J. A., & Montooth, K. L. (2012). IN A VARIABLE THERMAL ENVIRONMENT SELECTION FAVORS GREATER PLASTICITY OF CELL MEMBRANES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Evolution*, *66*(6), 1976–1984. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01566.x>
- Cooper, B. S., Hammad, L. A., & Montooth, K. L. (2014). Thermal adaptation of cellular membranes in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*, *28*(4), 886–894. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12264>
- Cormier, R. J., Strang, R., Menail, H., Touaibia, M., & Pichaud, N. (2021). Systemic and mitochondrial effects of metabolic inflexibility induced by high fat diet in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *133*, 103556. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103556>
- Cormier, R. P. J., Champigny, C. M., Simard, C. J., St-Coeur, P.-D., & Pichaud, N. (2019). Dynamic mitochondrial responses to a high-fat diet in *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports*, *9*(1). Scopus. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36060-5>

- Divakaruni, A. S., & Jastroch, M. (2022). A practical guide for the analysis, standardization, and interpretation of oxygen consumption measurements. *Nature Metabolism*, 4(8), 978–994. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00619-4>
- El-Wadawi, R., & Bowler, K. (1996). The effect of in vivo heat treatments on blowfly flight muscle mitochondrial function: Effects on partial reactions of the respiratory chain. *Journal of Thermal Biology*, 21(5), 403–408. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(96\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(96)00024-1)
- Estabrook, R. W. (1967). [7] Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. In *Methods in Enzymology* (Vol. 10, pp. 41–47). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(67\)10010-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(67)10010-4)
- Flouris, A. D., & Piantoni, C. (2015a). Links between thermoregulation and aging in endotherms and ectotherms. *Temperature*, 2(1), 73–85. <https://doi.org/10.4161/23328940.2014.989793>
- Flouris, A. D., & Piantoni, C. (2015b). Links between thermoregulation and aging in endotherms and ectotherms. *Temperature*, 2(1), 73–85. <https://doi.org/10.4161/23328940.2014.989793>
- Fontanesi, F. (2015). *Mitochondria: Structure and Role in Respiration* (pp. 1–13). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001380.pub2>
- García-Robledo, C., Kuprewicz, E. K., Staines, C. L., Erwin, T. L., & Kress, W. J. (2016). Limited tolerance by insects to high temperatures across tropical elevational gradients and the implications of global warming for extinction. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences, 113(3), 680–685.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1507681113>

Goto, S. G., & Kimura, M. T. (1998). Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*. *Journal of Insect Physiology*, 44(12), 1233–1239. [https://doi.org/10.1016/s0022-1910\(98\)00101-2](https://doi.org/10.1016/s0022-1910(98)00101-2)

Gouspillou, G., Rouland, R., Calmettes, G., Deschodt-Arsac, V., Franconi, J.-M., Bourdel-Marchasson, I., & Diolez, P. (2011). Accurate Determination of the Oxidative Phosphorylation Affinity for ADP in Isolated Mitochondria. *PLOS ONE*, 6(6), e20709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020709>

Guderley, H. (2004). Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79(2), 409–427. <https://doi.org/10.1017/s1464793103006328>

Hagopian, K., Weber, K. L., Hwee, D. T., Eenennaam, A. L. V., López-Lluch, G., Villalba, J. M., Burón, I., Navas, P., German, J. B., Watkins, S. M., Chen, Y., Wei, A., McDonald, R. B., & Ramsey, J. J. (2010). Complex I-Associated Hydrogen Peroxide Production Is Decreased and Electron Transport Chain Enzyme Activities Are Altered in n-3 Enriched fat-1 Mice. *PLOS ONE*, 5(9), e12696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012696>

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press.

- Halpern, M. E., Rhee, J., Goll, M. G., Akitake, C. M., Parsons, M., & Leach, S. D. (2008). Gal4/UAS Transgenic Tools and Their Application to Zebrafish. *Zebrafish*, 5(2), 97–110. <https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0530>
- Hancock, C. N., Liu, W., Alvord, W. G., & Phang, J. M. (2016). Co-regulation of mitochondrial respiration by proline dehydrogenase/oxidase and succinate. *Amino Acids*, 48(3), 859–872. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2134-7>
- Harada, A. E., Healy, T. M., & Burton, R. S. (2019). Variation in Thermal Tolerance and Its Relationship to Mitochondrial Function Across Populations of *Tigriopus californicus*. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.00213>
- Hazel, J. R. (1995). Thermal Adaptation in Biological Membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation? *Annual Review of Physiology*, 57(1), 19–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.000315>
- Healy, T. M., & Burton, R. S. (2023). Loss of mitochondrial performance at high temperatures is correlated with upper thermal tolerance among populations of an intertidal copepod. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 266, 110836. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2023.110836>
- Hochachka, P. W., & Somero, G. N. (2002). *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford University Press.
- Hoffmann, A. A., & Sgrò, C. M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, 470(7335), Article 7335. <https://doi.org/10.1038/nature09670>

- Hoffmann, A. A., Sørensen, J. G., & Loeschcke, V. (2003). Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: Bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology*, 28(3), 175–216. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(02\)00057-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(02)00057-8)
- Honsey, A. E., Venturelli, P. A., & Lester, N. P. (2019). Bioenergetic and limnological foundations for using degree-days derived from air temperatures to describe fish growth. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 76(4), 657–669. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2018-0051>
- Iftikar, F. I., & Hickey, A. J. R. (2013). Do Mitochondria Limit Hot Fish Hearts? Understanding the Role of Mitochondrial Function with Heat Stress in *Notolabrus celidotus*. *PLOS ONE*, 8(5), e64120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064120>
- Iftikar, F. I., MacDonald, J. R., Baker, D. W., Renshaw, G. M. C., & Hickey, A. J. R. (2014). Could thermal sensitivity of mitochondria determine species distribution in a changing climate? *Journal of Experimental Biology*, 217(13), 2348–2357. <https://doi.org/10.1242/jeb.098798>
- Jørgensen, L. B., Hansen, A. M., Willot, Q., & Overgaard, J. (2023). Balanced mitochondrial function at low temperature is linked to cold adaptation in *Drosophila* species. *Journal of Experimental Biology*, 226(8), jeb245439. <https://doi.org/10.1242/jeb.245439>
- Jørgensen, L. B., Malte, H., & Overgaard, J. (2019). How to assess *Drosophila* heat tolerance: Unifying static and dynamic tolerance assays to predict heat distribution

- limits. *Functional Ecology*, 33(4), 629–642. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13279>
- Jørgensen, L. B., Ørsted, M., Malte, H., Wang, T., & Overgaard, J. (2022). Extreme escalation of heat failure rates in ectotherms with global warming. *Nature*, 611(7934), Article 7934. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05334-4>
- Jørgensen, L. B., Overgaard, J., Hunter-Manseau, F., & Pichaud, N. (2021). Dramatic changes in mitochondrial substrate use at critically high temperatures: A comparative study using *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology*, 224(6), jeb240960. <https://doi.org/10.1242/jeb.240960>
- Kimura, M. T., Ohtsu, T., Yoshida, T., Awasaki, T., & Lin, F.-J. (1994). Climatic adaptations and distributions in the *Drosophila takahashii* species subgroup (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Natural History*, 28(2), 401–409. <https://doi.org/10.1080/00222939400770181>
- Košťál, V. (2010). Cell structural modifications in insects at low temperatures. In D. L. Denlinger & J. Lee Richard E. (Eds.), *Low Temperature Biology of Insects* (pp. 116–140). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511675997.006>
- Košťál, V., Korbelová, J., Rozsypal, J., Zahradníčková, H., Cimlová, J., Tomčala, A., & Šimek, P. (2011). Long-term cold acclimation extends survival time at 0°C and modifies the metabolomic profiles of the larvae of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *PloS One*, 6(9), e25025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025025>

- Kostal, V., & Simek, P. (1998). Changes in fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerols after cold-acclimation of an aestivating insect prepupa. *Journal of Comparative Physiology B*, 168(6), 453–460. <https://doi.org/10.1007/s003600050165>
- Kuznetsov, A., Veksler, V., Gellerich, F., Saks, V., Margreiter, R., & Kunz, W. (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature Protocols*, 3, 965–976. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.61>
- Lark, D. S., Torres, M. J., Lin, C.-T., Ryan, T. E., Anderson, E. J., & Neuffer, P. D. (2016). Direct real-time quantification of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in permeabilized skeletal muscle myofibers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 311(2), C239–C245. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00124.2016>
- MacMillan, H. A., Knee, J. M., Dennis, A. B., Udaka, H., Marshall, K. E., Merritt, T. J. S., & Sinclair, B. J. (2016). Cold acclimation wholly reorganizes the *Drosophila melanogaster* transcriptome and metabolome. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep28999>
- Manenti, T., Cunha, T. R., Sørensen, J. G., & Loeschcke, V. (2018). How much starvation, desiccation and oxygen depletion can *Drosophila melanogaster* tolerate before its upper thermal limits are affected? *Journal of Insect Physiology*, 111, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.09.002>

- Marques, J. T., & Imler, J.-L. (2016). The diversity of insect antiviral immunity: Insights from viruses. *Current Opinion in Microbiology*, 32, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.002>
- McDonald, A. E., Pichaud, N., & Darveau, C.-A. (2018). “Alternative” fuels contributing to mitochondrial electron transport: Importance of non-classical pathways in the diversity of animal metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 224, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.11.006>
- Melzner, F., Bock, C., & Pörtner, H.-O. (2006). Critical temperatures in the cephalopod *Sepia officinalis* investigated using in vivo ³¹P NMR spectroscopy. *Journal of Experimental Biology*, 209(5), 891–906. <https://doi.org/10.1242/jeb.02054>
- Menail, H. A., Cormier, S. B., Ben Youssef, M., Jørgensen, L. B., Vickruck, J. L., Morin, P., Boudreau, L. H., & Pichaud, N. (2022). Flexible Thermal Sensitivity of Mitochondrial Oxygen Consumption and Substrate Oxidation in Flying Insect Species. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2022.897174>
- Menzel, F., & Feldmeyer, B. (2021). How does climate change affect social insects? *Current Opinion in Insect Science*, 46, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.01.005>
- Miquel, J., Lundgren, P. R., Bensch, K. G., & Atlan, H. (1976). Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of*

- Ageing and Development*, 5(5), 347–370. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(76\)90034-8](https://doi.org/10.1016/0047-6374(76)90034-8)
- Misener, S. R., Chen, C.-P., & Walker, V. K. (2001). Cold tolerance and proline metabolic gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 47(4), 393–400. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00141-4)
- Morgan, T. H. (1910). SEX LIMITED INHERITANCE IN DROSOPHILA. *Science (New York, N.Y.)*, 32(812), 120–122. <https://doi.org/10.1126/science.32.812.120>
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman.
- Ohtsu, T., Kimura, M. T., & Katagiri, C. (1998). How *Drosophila* species acquire cold tolerance. *European Journal of Biochemistry*, 252(3), 608–611. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2520608.x>
- Olsen, R. K. J., Andresen, B. S., Christensen, E., Bross, P., Skovby, F., & Gregersen, N. (2003). Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Human Mutation*, 22(1), 12–23. <https://doi.org/10.1002/humu.10226>
- Ong, C., Yung, L.-Y. L., Cai, Y., Bay, B.-H., & Baeg, G.-H. (2015). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, 9(3), 396–403. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.940405>
- Orr, A. L., Ashok, D., Sarantos, M. R., Ng, R., Shi, T., Gerencser, A. A., Hughes, R. E., & Brand, M. D. (2014). Novel inhibitors of mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate

- dehydrogenase. *PloS One*, 9(2), e89938.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089938>
- Ouhabi, R., Boue-Grabot, M., & Mazat, J. P. (1998). Mitochondrial ATP synthesis in permeabilized cells: Assessment of the ATP/O values in situ. *Analytical Biochemistry*, 263(2), 169–175. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2776>
- Overgaard, J., Kristensen, T. N., & Sørensen, J. G. (2012). Validity of Thermal Ramping Assays Used to Assess Thermal Tolerance in Arthropods. *PLOS ONE*, 7(3), e32758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032758>
- Overgaard, J., Tomčala, A., Sørensen, J. G., Holmstrup, M., Krogh, P. H., Šimek, P., & Košťál, V. (2008). Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 54(3), 619–629.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.12.011>
- Ownby, D. R., Newman, M. C., Mulvey, M., Vogelbein, W. K., Unger, M. A., & Arzayus, L. F. (2002). Fish (*Fundulus heteroclitus*) populations with different exposure histories differ in tolerance of creosote-contaminated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(9), 1897–1902.
- Pallag, G., Nazarian, S., Ravasz, D., Bui, D., Komlódi, T., Doerrier, C., Gnaiger, E., Seyfried, T. N., & Chinopoulos, C. (2022). Proline Oxidation Supports Mitochondrial ATP Production When Complex I Is Inhibited. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), Article 9.
<https://doi.org/10.3390/ijms23095111>

- Pichaud, N., Ballard, J. W. O., Tanguay, R. M., & Blier, P. U. (2011). Thermal sensitivity of mitochondrial functions in permeabilized muscle fibers from two populations of *Drosophila simulans* with divergent mitotypes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *301*(1), R48–R59. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00542.2010>
- Pichaud, N., Chatelain, E. H., Ballard, J. W. O., Tanguay, R., Morrow, G., & Blier, P. U. (2010). Thermal sensitivity of mitochondrial metabolism in two distinct mitotypes of *Drosophila simulans*: Evaluation of mitochondrial plasticity. *Journal of Experimental Biology*, *213*(10), 1665–1675. <https://doi.org/10.1242/jeb.040261>
- Pichaud, N., Ekström, A., Breton, S., Sundström, F., Rowinski, P., Blier, P. U., & Sandblom, E. (2019). Cardiac mitochondrial plasticity and thermal sensitivity in a fish inhabiting an artificially heated ecosystem. *Scientific Reports*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54165-3>
- Pörtner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *132*(4), 739–761. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00045-4)
- Power, A., Pearson, N., Pham, T., Cheung, C., Phillips, A., & Hickey, A. (2014). Uncoupling of oxidative phosphorylation and ATP synthase reversal within the hyperthermic heart. *Physiological Reports*, *2*(9), e12138. <https://doi.org/10.14814/phy2.12138>

- Robichaud, P. P., Poirier, S. J., Boudreau, L. H., Doiron, J. A., Barnett, D. A., Boilard, E., & Surette, M. E. (2016). On the cellular metabolism of the click chemistry probe 19-alkyne arachidonic acid [S]. *Journal of Lipid Research*, *57*(10), 1821–1830. <https://doi.org/10.1194/jlr.M067637>
- Roussel, D., Janillon, S., Teulier, L., & Pichaud, N. (2023). Succinate oxidation rescues mitochondrial ATP synthesis at high temperature in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14701>
- Rubalcaba, J. G., Verberk, W. C. E. P., Hendriks, A. J., Saris, B., & Woods, H. A. (2020). Oxygen limitation may affect the temperature and size dependence of metabolism in aquatic ectotherms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(50), 31963–31968. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003292117>
- Sacktor, B., & Childress, C. C. (1967). Metabolism of proline in insect flight muscle and its significance in stimulating the oxidation of pyruvate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *120*(3), 583–588. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(67\)90522-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(67)90522-X)
- Salin, K., Teulier, L., Rey, B., Rouanet, J.-L., Voituron, Y., Duchamp, C., & Roussel, D. (2010). Tissue variation of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in cold-acclimated ducklings. *Acta Biochimica Polonica*, *57*(4), 409–412.
- Salin, K., Villasevil, E. M., Auer, S. K., Anderson, G. J., Selman, C., Metcalfe, N. B., & Chinopoulos, C. (2016). Simultaneous measurement of mitochondrial respiration and ATP production in tissue homogenates and calculation of effective P/O ratios. *Physiological Reports*, *4*(20), e13007. <https://doi.org/10.14814/phy2.13007>

- Schenkel, L. C., & Bakovic, M. (2014). Formation and Regulation of Mitochondrial Membranes. *International Journal of Cell Biology*, 2014, e709828. <https://doi.org/10.1155/2014/709828>
- Schulte, P. M. (2015). The effects of temperature on aerobic metabolism: Towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1856–1866. <https://doi.org/10.1242/jeb.118851>
- Shen, L. R., Lai, C. Q., Feng, X., Parnell, L. D., Wan, J. B., Wang, J. D., Li, D., Ordovas, J. M., & Kang, J. X. (2010). Drosophila lacks C20 and C22 PUFAs. *Journal of Lipid Research*, 51(10), 2985–2992. <https://doi.org/10.1194/jlr.M008524>
- Simard, C. J., Pelletier, G., Boudreau, L. H., Hebert-Chatelain, E., & Pichaud, N. (2018). Measurement of Mitochondrial Oxygen Consumption in Permeabilized Fibers of Drosophila Using Minimal Amounts of Tissue. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 134. <https://doi.org/10.3791/57376>
- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous Adaptation—A Homeostatic Process that Regulates the Viscosity of Membrane Lipids in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(2), 522–525. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.2.522>
- Slotsbo, S., Sørensen, J. G., Holmstrup, M., Kostal, V., Kellermann, V., & Overgaard, J. (2016). Tropical to subpolar gradient in phospholipid composition suggests adaptive tuning of biological membrane function in drosophilids. *Functional Ecology*, 30(5), 759–768. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12568>

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, *150*(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Soares, J. B. R. C., Gaviraghi, A., & Oliveira, M. F. (2015). Mitochondrial Physiology in the Major Arbovirus Vector *Aedes aegypti*: Substrate Preferences and Sexual Differences Define Respiratory Capacity and Superoxide Production. *PLOS ONE*, *10*(3), e0120600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120600>
- Sokolova, I. M. (2023). Ectotherm mitochondrial economy and responses to global warming. *Acta Physiologica*, *237*(4), e13950. <https://doi.org/10.1111/apha.13950>
- Sørensen, J. G., Kristensen, T. N., & Overgaard, J. (2016). Evolutionary and ecological patterns of thermal acclimation capacity in *Drosophila*: Is it important for keeping up with climate change? *Current Opinion in Insect Science*, *17*, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.08.003>
- Stanley, P. E. (1989). A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, *4*(1), 375–380. <https://doi.org/10.1002/bio.1170040151>
- Stec, N., Saleem, A., & Darveau, C.-A. (2021). Proline as a Sparker Metabolite of Oxidative Metabolism during the Flight of the Bumblebee, *Bombus impatiens*. *Metabolites*, *11*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/metabo11080511>

- Stork, N. E. (2018). How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? *Annual Review of Entomology*, 63, 31–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348>
- Terblanche, J. S., Hoffmann, A. A., Mitchell, K. A., Rako, L., le Roux, P. C., & Chown, S. L. (2011). Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures. *Journal of Experimental Biology*, 214(22), 3713–3725. <https://doi.org/10.1242/jeb.061283>
- Teulier, L., Weber, J.-M., Crevier, J., & Darveau, C.-A. (2016). Proline as a fuel for insect flight: Enhancing carbohydrate oxidation in hymenopterans. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1834), 20160333. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0333>
- Vinagre, C., Leal, I., Mendonça, V., Madeira, D., Narciso, L., Diniz, M. S., & Flores, A. A. V. (2016). Vulnerability to climate warming and acclimation capacity of tropical and temperate coastal organisms. *Ecological Indicators*, 62, 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.11.010>
- Wanduragala, S., Sanyal, N., Liang, X., & Becker, D. F. (2010). Purification and characterization of Put1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 498(2), 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.020>
- Webster, N., Jin, J. R., Green, S., Hollis, M., & Chambon, P. (1988). The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human hela cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell*, 52(2), 169–178. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90505-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90505-3)

Willis, J. R., Hickey, A. J. R., & Devaux, J. B. L. (2021). Thermally tolerant intertidal triplefin fish (Tripterygiidae) sustain ATP dynamics better than subtidal species under acute heat stress. *Scientific Reports*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90575-y>

Zhao, Q., Yu, P., Mahendran, R., Huang, W., Gao, Y., Yang, Z., Ye, T., Wen, B., Wu, Y., Li, S., & Guo, Y. (2022). Global climate change and human health: Pathways and possible solutions. *Eco-Environment & Health*, *1*(2), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2022.04.004>