

TABLES DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
1. CHAPITRE 1	
1.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.2 Le métabolisme et le vieillissement.....	1
1.3 Le stress oxydant.....	3
1.4 Le métabolisme des ROS.....	3
1.5 Le métabolisme et le stress oxydant.....	12
1.6 Problématique de l'étude.....	14
1.6.1 L'ADN mitochondrial.....	14
1.6.2 La température.....	18
1.7. Objectifs.....	22
2. CHAPITRE 2	
2.1 Divergences of mitochondrial functions in native and introgressed strains of different haplogroups of <i>Drosophila simulans</i>	23
2.2 Abstract (Résumé).....	24
2.3 Introduction.....	25

2.4	Materials and methods (Matériels et methods).....	29
2.5	Results (Résultats).....	34
2.6	Discussion.....	42
2.7	Acknowledgments (Remerciements).....	48
3.	CHAPITRE 3	
3.1	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	49
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	55

LISTE DES TABLEAUX

1. CHAPITRE 1

Tableau 1. Principales théories du vieillissement.....2

2. CHAPITRE 2

Tableau 1. Mean (\pm SD) mass and protein content of *siII*, *siIII* and introgressed *siII* (*siII**) and *siIII* (*siIII**) *Drosophila simulans* strains.....34

Tableau 2. Mean (\pm SD) citrate synthase and aconitase activities (U mg protein⁻¹) of 5, 10 and 15 days old of *siII*, *siIII* and introgressed (*siII**) and *siIII* (*siIII**) *Drosophila simulans* strains (n=6) exposed to different thermal regime.....35

Tableau 3. Mean (\pm SD) electron transport system activities (U mg protein⁻¹) of 5, 10 and 15 days old of *siII*, *siIII* and introgressed (*siII**) and *siIII* (*siIII**) *Drosophila simulans* strains (n=6) exposed to different thermal regime38

Tableau 4. Mean (\pm SD) carbonyl (nmol mg protein⁻¹) and MDA (pmol mg protein⁻¹) content of 5, 10 and 15 days old of *siII*, *siIII* and introgressed (*siII**) and *siIII* (*siIII**) *Drosophila simulans* strains (n=6) exposed to different thermal regime.....41

LISTE DES FIGURES

1. CHAPITRE 1

- Figure 1.** Chaîne de transport des électrons dans la membrane interne mitochondriale.....5
- Figure 2.** La production de ROS dans la chaîne de transport des électrons.....8
- Figure 3.** Phylogénie du sous-groupe *melanogaster*.....15

2. CHAPITRE 2

- Figure 1.** Mean (\pm SD) cytochrome *c* oxidase (COX) activities of 5, 10 and 15 days old *siII*, *siIII* and introgressed (*siII**) and *siIII* (*siIII**) *Drosophila simulans* strains (n=6) exposed to different thermal regime.....39
- Figure 2.** Mean (\pm SD) catalase activities of 5, 10 and 15 days old *siII*, *siIII* and introgressed (*siII**) and *siIII* (*siIII**) *Drosophila simulans* (n=6) exposed to different thermal regime.....40

1. CHAPITRE 1

1.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.2 Le métabolisme et le vieillissement

Pourquoi vieillit-on? Pourquoi les différentes espèces ont-elles des espérances de vie si différentes? Déjà, des contemporains de Darwin ont tenté de répondre à ces questions (Ershler et Longo, 1997; Weinert et Timiras, 2003). Depuis, notre connaissance du sujet s'est approfondie. Cependant, la majorité des chercheurs considèrent que les processus responsables du vieillissement demeurent à identifier. Il existe nombre de théories qui tentent d'expliquer la sénescence des êtres vivants (Tableau 1). Tout d'abord, on définit le vieillissement par une diminution de l'homéostasie, de l'habilité à répondre au stress et par une augmentation de l'incidence des pathologies (Weinert et Timiras, 2003). On définit ce phénomène comme étant intrinsèque, progressif, chronique et délétère, débutant immédiatement après la fécondation et se terminant par la mort (Dufour et Larsson, 2004). Enfin, le vieillissement est un processus spontané, dont les effets sont observés dans la totalité des tissus, organes et systèmes, et ce, à tout âge. Les effets du vieillissement devraient s'accroître avec l'âge et causer des détériorations irréversibles (Luckinbill et Foley, 2000). Enfin, on reconnaît de plus en plus le vieillissement comme un processus multifactoriel.

Néanmoins, certaines causes possibles du vieillissement ont été davantage étudiées et depuis longtemps, les physiologistes ont remarqué une certaine relation entre le métabolisme et l'espérance de vie.

Tableau 1. Principales théories du vieillissement (Tiré de Ershler et Longo, 1997)

Modèles	Théories	Description
Génétiquement programmé	Neuroendocrinien	Altérations du contrôle neuroendocrinien de l'homéostasie.
	Immunitaire	Déclin des fonctions et des systèmes immunitaires causant une augmentation des pathologies avec l'âge.
Stochastique intrinsèque	Soma largable	Les cellules somatiques sont maintenues jusqu'à la reproduction ; après, le soma perd de son utilité.
	Réparation altérée de l'ADN	Les mécanismes de réparation de l'ADN se détériorent avec l'âge.
	Erreur de l'expression génique	Expression génique défailante causant un accroissement des niveaux de protéines dysfonctionnelles.
	Sénescence répllicative	La perte de section de télomères se produisant à chaque division cellulaire limite cette division
Stochastique extrinsèque	Stress oxydant	Les radicaux libres endommagent toutes les structures biologiques

Dès 1908, un physiologiste allemand, M. Rubner, compare les taux métaboliques de cinq espèces de mammifères dont l'espérance de vie diffère et observe une corrélation entre ces deux phénomènes (Beckman et Ames, 1998). Plus tard, en 1928, R. Pearl propose l'hypothèse du taux de vie (*rate living hypothesis*) qui établit le lien entre la consommation d'oxygène et l'espérance de vie (Pearl, 1928). Bien que la nature de ce lien n'y soit pas clairement définie, cette théorie stipule que la durée de vie est déterminée par la disponibilité d'un constituant cellulaire vital (alors inconnu), qui serait lui-même consommé proportionnellement au taux métabolique et qui occasionnerait la mort lorsque non disponible (Van Voorhies, 2001). Aujourd'hui, la théorie métabolique du vieillissement prédit que l'espérance de vie est inversement corrélée au métabolisme (Sohal et Orr, 1992; Beckman et Ames, 1998). Ainsi, les petits animaux vivent généralement moins longtemps que les gros animaux. Cependant, les oiseaux, qui possèdent un métabolisme élevé et une petite taille, ont une espérance de vie au-delà de ce que prédit cette

théorie. De plus, chez plusieurs espèces, on note une diminution du métabolisme aérobie avec l'âge (Van Voorhies, 2002; Lin et Beal, 2003; Ferguson *et al*, 2005). Aussi, plusieurs études ont démontré que le métabolisme ne prédit pas toujours l'espérance de vie (Van Voorhies, 2002; Van Voorhies *et al*, 2003; Van Voorhies *et al*, 2004) et ce, d'autant plus lorsque la masse est considérée (Speakman, 2005).

1.3 Le stress oxydant

En 1956, un chimiste du nom de D. Harman suggère que ce sont les radicaux libres ou espèces réactives d'oxygène (ROS) qui constituent le lien entre le métabolisme et la longévité (Beckman et Ames, 1998; Van Voorhies, 2001; Lin et Beal, 2003; Balaban *et al*, 2005). Cette hypothèse explique la sénescence par l'accumulation de dommages, sur les différentes structures cellulaires, causés par l'action oxydante des ROS. En fait, Harman considérait les ROS comme des sous-produits normaux des réactions rédox cellulaires. Le stress oxydant, quant à lui, constitue un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants, en faveur des premiers (Sies, 1991). Au cours des dernières années, plusieurs études ont démontré l'apport important du stress oxydant parmi les processus de vieillissement, autant chez des invertébrés que chez les mammifères (Sohal *et al*, 1995; Kwong *et al*, 2000; Miwa *et al*, 2003; Bayne *et al*, 2005).

1.4 Le métabolisme des ROS

Un radical libre est une espèce chimique, neutre ou chargée, qui a la particularité de porter un électron célibataire (ou non apparié) sur sa couche externe, ce qui le rend généralement instable et capable de réagir plus ou moins rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes (Beckman et Ames, 1998). Les ROS, eux, sont dérivés de l'oxygène moléculaire.

Ces molécules sont de puissants oxydants qui peuvent altérer la structure des constituants cellulaires. Ils sont considérés comme des sous produits normaux du métabolisme aérobie. Ces molécules sont impliquées dans plusieurs fonctions physiologiques importantes telles que l'apoptose, le développement, la prolifération cellulaire, les signaux de transduction et les fonctions immunitaires (Boveris et Cadenas, 2000; Turrens, 2003).

La production des ROS

Il est dorénavant reconnu que les ROS sont principalement produits par les mitochondries. Entre 0.1 et 4 % de l'oxygène utilisé par ces dernières serait détourné vers la production de ROS (Beckman et Ames, 1998; Miwa *et al*, 2003). Ils sont, plus précisément, formés majoritairement au niveau de la chaîne de transport des électrons, présente dans la membrane interne de la mitochondrie (Ballard, 2005). Cet organelle produit la majeure partie de l'énergie cellulaire grâce aux processus de phosphorylation oxydative où l'oxydation de divers substrats métaboliques (tels les glucides et les acides gras en particulier) produit de l'eau et de l'adénosine triphosphate (ATP), avec l'oxygène (O_2) comme accepteur final d'électrons. Des équivalents réduits (tels que le NADH et le $FADH_2$) sont formés lors du cycle de Krebs, à partir des glucides, et lors de la β -oxydation, à partir des acides gras. Ces équivalents réduits agissent comme donneurs d'électrons et sont transférés vers le système de transport des électrons. Cette dernière est constituée de quatre complexes (Figure 1), soit le complexe I (NADH-coenzyme Q réductase), le complexe II (succinate-coenzyme Q réductase), le complexe III (coenzyme Q-cytochrome c réductase) et le complexe IV (cytochrome *c* oxydase) (Nicholls et Ferguson, 2002). Le passage des électrons dans les complexes I, III et IV libère de l'énergie qui est utilisée, en partie, pour transporter des protons dans l'espace inter-membranaire et ainsi créer un gradient de protons entre cet espace et

la matrice mitochondriale (Navarro et Boveris, 2007). L'ATP synthase (complexe V) utilise cette énergie potentielle en laissant pénétrer les protons et en utilisant l'énergie ainsi libérée pour former de l'ATP.

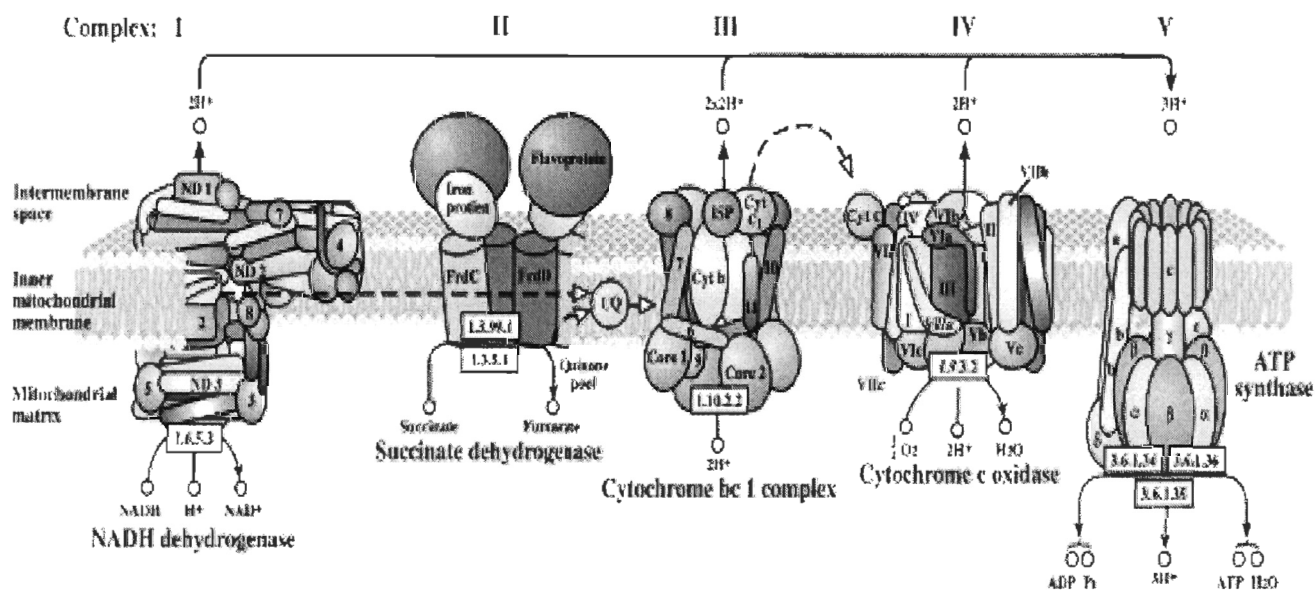


Fig. 1. Chaîne de transport des électrons dans la membrane interne mitochondriale (Tiré de Mandavilli *et al*, 2002)

La réduction de l'oxygène (en tant qu'accepteur final de la chaîne de transport des électrons) en eau nécessite l'apport de quatre électrons (Beckman et Ames, 1998). Or, des réductions à un seul électron, produisant des anions superoxyde, peuvent aussi survenir. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) constitue le précurseur de la plupart des ROS et induit les réactions oxydatives en chaîne. La production de cet anion augmente en présence d'inhibiteur de la chaîne de transport des électrons et, généralement, lorsque les composantes de cette chaîne sont dans un état très réduit (Abele et al, 2002). La production de ROS pourrait aussi dépendre davantage du gradient de protons que de la vitesse de transfert des électrons entre les complexes. Ainsi, lorsque le gradient est élevé, les complexes ont plus de difficulté à transférer les protons dans l'espace inter-

membranaire, ralentissant ainsi le transfert (ce qui augmente l'état réduit de chaque complexe). Dans ce cas, les électrons ont plus de temps pour rencontrer une molécule d'oxygène et créer un anion $\text{O}_2^{\cdot-}$. Des protéines découplantes qui permettent de diminuer le gradient de protons, sans phosphorylation, peuvent assurer une diminution de la production de ROS (Brand *et al*, 2004; Criscuolo *et al*, 2005).

La dismutation de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$, de façon spontanée ou par l'intermédiaire de la superoxyde dismutase (voir plus bas), produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui peut, à son tour, être complètement réduit en eau ou alors partiellement réduit en radical hydroxyle (OH^{\cdot}), l'oxydant le plus puissant parmi ceux observé dans les systèmes biologiques (Turrens, 2003). Ce dernier attaque non spécifiquement toute molécule biologique, ce qui diminue son pouvoir de dispersion. Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre mais joue un rôle oxydant ou réducteur dans plusieurs fonctions physiologiques. À l'inverse de $\text{O}_2^{\cdot-}$, le H_2O_2 diffuse aisément à travers les membranes et les compartiments aqueux. Ces deux ROS sont considérés comme les moins toxiques mais ils ne sont pas à négliger puisqu'ils conduisent à la formation de radicaux OH^{\cdot} (Solomons et Fryhle, 2000).

Les complexes I et III, et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase dans les tissus adipeux bruns et les muscles d'insectes, sont reconnus comme les principaux producteurs de ROS (Chen *et al*, 2003; Brand *et al*, 2004; Kudin *et al*, 2004; Miwa et Brand, 2005). Les mécanismes de production par le complexe I de mitochondries isolées semblent bien compris (la production de l'anion superoxyde s'y produirait à l'aide de la forme réduite de la flavine) alors que ce n'est pas encore le cas des mécanismes présents dans des mitochondries intactes (Lambert et Brand, 2007). Néanmoins, on reconnaît que ce complexe forme des ROS exclusivement du côté de la matrice

mitochondriale (Miwa et Brand, 2003), alors que le complexe III produirait 70% des ROS dans la matrice et 30% dans le cytosol (Miwa et Brand, 2005).

La production de ROS par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase reste aussi un phénomène peu étudié. Les sites de la flavine, du complexe Fe-S et de la semiquinone pourraient tous être impliqués. De récentes études ont démontré que la production de ROS était à moitié cytosolique et à moitié matricielle (Miwa et Brand, 2005). Pour l'instant, il existe probablement autant d'études concluant que le complexe I produit la majorité des ROS que d'études appuyant plutôt le complexe III (Kudin *et al*, 2004).

Il existe quelques autres sites de production de ROS à l'extérieur de la mitochondrie. La β -oxydation peroxysomale des acides gras produit du H_2O_2 . Les peroxysomes possèdent cependant une forte activité de la catalase, une enzyme anti-oxydante qui pourrait significativement limiter le largage de peroxyde du peroxysome dans le cytosol et ainsi minimiser la contribution des peroxysomes au stress oxydant cytoplasmique total. Les enzymes microsomaux cytochrome *P*-450, qui métabolisent des composés xénobiotiques, réduisent directement l' O_2 en $\text{O}_2^{\cdot-}$. Les phagocytes, eux, attaquent les corps étrangers avec un cocktail d'oxydants et de radicaux libres. Enfin, plusieurs enzymes sont aptes à produire des oxydants dans des conditions physiologiques normales ou pathologiques (Beckman et Ames, 1998).

Les cibles des ROS

Les trois grandes classes de macromolécules biologiques (lipide, protéine et acide nucléique) sont toutes susceptibles de subir des attaques oxydantes.

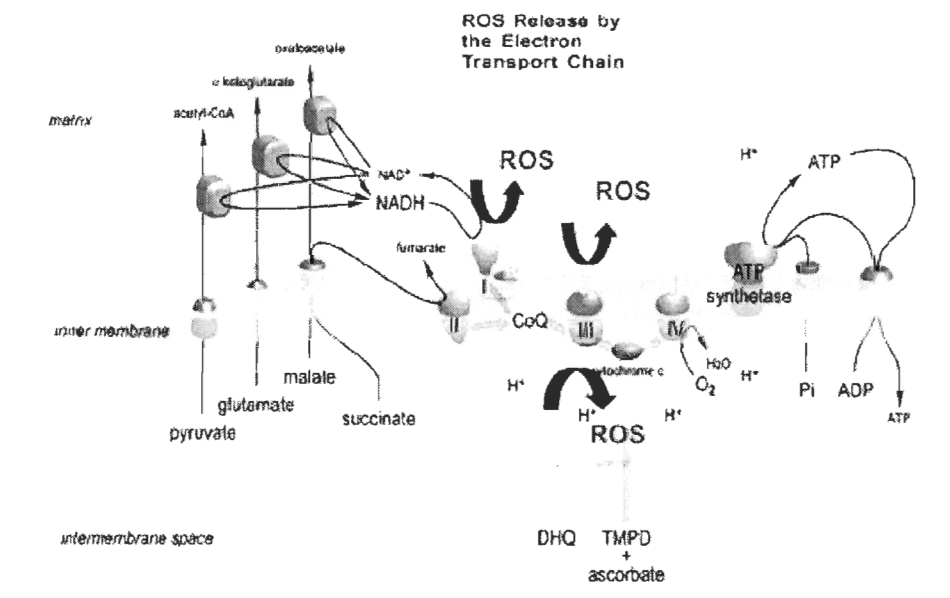


Fig. 2. La production de ROS dans la chaîne de transport des électrons (Tiré de Sedensky et Morgan, 2006)

Les chimistes reconnaissent depuis fort longtemps que l'odeur et le goût acide des vieux aliments proviennent de l'oxydation des lipides (Baynes, 2002). En fait, les acides gras polyinsaturés des lipoprotéines et des phospholipides membranaires sont particulièrement sensibles à cette peroxydation (Bokov *et al*, 2004). Un radical OH^\cdot attire l'électron d'un lipide insaturé voisin et forme un H_2O_2 et un radical alkyle. Ce dernier peut interagir avec l' O_2^\cdot et ainsi recommencer une autre chaîne de peroxydation lipidique. Ultiment, on retrouve des aldéhydes insaturés (telle que la malondialdéhyde) qui peuvent agir comme mutagènes et inhibiteurs d'enzymes (Long *et al*, 2006). Enfin, l'oxydation des lipides altère les propriétés membranaires, en diminue la fluidité et peut briser les liens entre les protéines membranaires et la membrane (Beckman et Ames, 1998).

L'oxydation des protéines est reconnue comme ayant un rôle majeur parmi les processus de vieillissement. Des modifications structurelles, spécialement aux sites actifs, induisent une altération des fonctions biochimiques des protéines et une modification des propriétés catalytiques des enzymes (Das *et al*, 2001). L'oxydation des protéines peut prendre différentes formes; l'oxydation des groupements sulfhydryles, la réduction des sulfides, l'adduction oxydante de certains acides aminés, des réactions avec des aldéhydes et la fragmentation des peptides (Beckman et Ames, 1998). Cependant, la formation de groupements carbonyles dans les chaînes latérales des acides aminés est probablement la modification oxydative la mieux étudiée (Sohal *et al*, 1993; Beckman et Ames, 1998; Das *et al*, 2001). Ces groupements sont formés par l'oxydation directe de la lysine, proline, arginine et la thréonine (Lin et Beal, 2003).

Puisque les réactions avec des radicaux libres n'impliquent pas de catalyseur, on a longtemps cru que l'oxydation des protéines se produisait aléatoirement. Or, récemment, plusieurs études ont démontré la spécificité de ces attaques. En utilisant la mouche domestique (*Musca domestica*) comme modèle, on a découvert que l'aconitase, une enzyme du cycle de Krebs, (Yan *et al*, 1997; Yarian *et al*, 2006) et l'adénosine nucléotide translocase, qui sert de navette pour l'ADP/ATP entre la matrice mitochondriale et le cytoplasme, (Yan et Sohal, 1998) sont des enzymes qui subissent une augmentation particulièrement importante des groupements carbonyles lors du vieillissement.

L'oxydation de l'ADN mitochondrial joue aussi un rôle important parmi les processus du vieillissement. La mitochondrie possède son propre génome (l'ADNmt), qui est transmis de façon uniparentale par la mère (Nicholls et Ferguson, 2002), et qui code pour certaines sous-unités protéiques formant les différents complexes de la chaîne de transport des électrons. Par exemple, chez la majorité des animaux, le complexe I est formé de 7 unités codées par l'ADNmt

et de 36 unités codées par l'ADN nucléaire; le complexe III, respectivement de 1 et 10 unités; le complexe IV, de 3 et 9 unités et le complexe V, de 2 et 14 unités (Ballard, 2005). Les génomes mitochondriaux et nucléaires sont donc contraints à coévoluer pour maintenir optimales les propriétés fonctionnelles des différents complexes mitochondriaux (Blier *et al*, 2001). Advenant qu'un des deux génomes évoluerait de façon indépendante, la nature des interactions, ne pourrait qu'être perturbée. Par exemple, l'hybridation entre différentes populations allopatriques de copépodes (*Tigriopus californicus*) induit non seulement une baisse du fitness, mais aussi une baisse significative de l'activité du système de transport des électrons. En fait, seuls les complexes formés de sous-unités provenant des génomes nucléaires et mitochondriaux (c'est-à-dire les complexes I, III, IV et V) montrent une telle diminution de l'activité (Ellisson et Burton, 2006). Une coévolution concertée semble donc obligatoire dans le maintien des fonctions mitochondriales et de tous les processus qui y sont liés.

L'ADNmt étant situé plus près des sites de production de ROS que ne l'est l'ADN nucléaire, il est plus susceptible de souffrir du stress oxydant. De plus, cet ADN possède peu de moyen de défense (tel que l'histone) comparativement à l'ADN nucléaire. Plusieurs études ont démontré que les dommages oxydants sont beaucoup plus importants dans l'ADNmt que dans l'ADN nucléaire (Barja et Herrero, 2000). Les anions superoxyde et le peroxyde d'hydrogène ne réagissent avec l'ADN qu'en présence d'ions métalliques permettant la formation de radicaux hydroxyles (Beckman et Ames, 1998). Ces radicaux peuvent attaquer les purines, pyrimidines et le déoxyribose, pour former de nombreux composés tels que le 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-oxodG), le thymidine glycol et le 8-hydroxyadénosine (Sastre *et al*, 2000). Généralement, le marqueur le plus utilisé pour mesurer l'oxydation des acides nucléiques est le 8-oxodG, qui est la forme oxydée du déoxyguanosine (Agarwal et Sohal, 1994; Mandavilli *et al*, 2002; Lin et Beal,

2003). La guanine, de part son potentiel d'ionisation le plus bas parmi les acides nucléiques, est la cible préférée des agents oxydants (Cadet *et al*, 2003). Plusieurs croient que les mutations de l'ADNmt induisent la disparition ou le dysfonctionnement de certaines sous-unités des complexes de la chaîne de transport des électrons (Yui *et al*, 2003). Une forte production de ROS provoque ainsi davantage de mutations à l'ADNmt, ce qui induit des dysfonctions dans le transfert des électrons, et augmente la production de ROS. Cette réaction en chaîne constitue le cercle vicieux des ROS (Beckman et Ames, 1998; Bokov *et al*, 2004).

Le système antioxydant

Lorsque les conditions physiologiques sont normales, on observe un équilibre entre la formation des ROS et leur élimination. Il existe un important répertoire de molécules capables de contrer les effets néfastes liés aux ROS, tels que des enzymes et des molécules de faibles poids moléculaires, dérivées, pour la plupart, de l'alimentation (fruits et légumes). Ces molécules comprennent notamment les enzymes antioxydantes (telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathione peroxydase (Best-Belpomme et Ropp, 1982; Sun *et al*, 2002; Bagnyukova *et al*, 2005), l'ascorbate et le glutathion (apte à détruire les OH^\cdot), le tocophérol, les caroténoïdes et flavonoïdes, qui sont capables de détruire les radicaux lipophyliques (Barata *et al*, 2005) et la machinerie cellulaire maintenant un environnement réduit telle que, par exemple, la glucose-6-phosphate qui régénère les niveaux de NADPH (Beckman et Ames, 1998).

Bien que la nature des défenses antioxydantes diffère d'une espèce à l'autre, il existe quelques antioxydants très conservés, notamment la superoxyde dismutase (SOD). Cette enzyme est considérée comme le premier rempart contre les dommages des ROS car elle seule peut détoxifier les anions superoxyde, transformant le O_2^\cdot en H_2O_2 (Beckman et Ames, 1998). La

SOD se trouve sous deux formes dans les cellules eucaryotes; Cu/ZnSOD dans le cytoplasme et l'espace inter-membranaire mitochondrial, et MnSOD dans la matrice mitochondriale (Landis et Tower, 2005). La dismutation de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ est catalysée par des ions métalliques tels que le cuivre, le manganèse ou le fer (Balaban *et al*, 2005). Outre le cytosol et la mitochondrie, on retrouve la SOD dans les peroxysomes (Barata *et al*, 2005)

La catalase et la glutathione peroxydase transforment, sans autre catalyseur, le H_2O_2 en eau et en oxygène, achevant la cascade antioxydante (Bagnyukova *et al*, 2005; Barata *et al*, 2005). Elles préviennent donc la formation du radical hautement toxique, OH^{\cdot} . La catalase est cependant reconnue comme la principale enzyme antioxydante dans les peroxysomes et le cytosol des cellules animales. Chez les insectes, la catalase est la seule enzyme capable de détoxifier le peroxyde puisque la glutathione peroxydase y est absente (Orr et Sohal, 1992).

1.5 Le métabolisme et le stress oxydant

La théorie métabolique du vieillissement prédit que l'espérance de vie est corrélée avec le métabolisme (Sohal et Orr, 1992; Beckman et Ames, 1998). Cette prédiction n'est toutefois pas toujours confirmée et, chez plusieurs espèces, on note une diminution du métabolisme aérobie avec l'âge (Van Voorhies, 2002; Van Voorhies *et al*, 2003; Van Voorhies *et al*, 2004). Tous les compartiments du métabolisme sont touchés d'une façon ou d'une autre lors du vieillissement. Ainsi, à un âge élevé, on note une diminution du taux métabolique basal (Bell *et al*, 2003), de l'activité du cycle de Krebs (Samokhvalov *et al*, 2004; Yarian *et al*, 2006), de la respiration mitochondriale et de la chaîne de transport des électrons (Van Voorhies, 2002; Lin et Beal, 2003; Ferguson *et al*, 2005; Dubessay *et al*, 2007). Plusieurs études ont donc démontré que le

métabolisme ne prédit pas toujours l'espérance de vie. Dès lors, cette théorie ne peut plus expliquer, à elle seule, le vieillissement.

Simultanément à cette baisse du métabolisme, de nombreuses études remarquent une augmentation de la production des ROS qui semble alors, inversement corrélée à l'espérance de vie chez les mammifères (Sohal *et al*, 1990; Barja, 1998) et les insectes (Sohal *et al*, 1995; Bayne *et al*, 2005). Les ROS induisant d'importants dommages, on note aussi une augmentation des dommages oxydants durant le vieillissement. Ainsi, l'oxydation des lipides (Salganik *et al*, 1994; Long *et al*, 2006), des protéines (Yan *et al*, 1997; Chavous *et al*, 2001; Das *et al*, 2001) et des acides nucléiques mitochondriaux (Agarwal et Sohal, 1994; Mandavilli *et al*, 2002; Yui *et al*, 2003) augmentent durant la sénescence.

Enfin, simultanément à tous ces phénomènes, l'activité du système antioxydant semble aussi diminuer avec l'âge (Barata *et al*, 2005). On comprend encore difficilement quelle est son importance dans les processus de vieillissement puisque plusieurs études semblent se contredire. Ainsi, Sohal *et al* observent un déclin de la catalase et de la SOD chez *Musca domestica* (1984), et non chez *Drosophila* (Sohal *et al*, 1990). Plusieurs études, testant l'utilité de suppléments alimentaires composés d'antioxydants, n'ont pas réussi à démontrer un impact significatif sur l'espérance de vie chez les drosophiles (Le Bourg, 2001). Malgré ces résultats contradictoires, il semble généralement admis que la balance entre la production et la suppression des ROS doit jouer un rôle de première ligne dans les processus de vieillissement et que la gestion du stress oxydant est nécessairement liée au métabolisme et, plus particulièrement, au métabolisme aérobie ou mitochondrial.

1.6 Problématique de l'étude

1.6.1 L'ADN mitochondrial

La mitochondrie étant la principale productrice de ROS, elle est donc davantage susceptible de subir les dommages oxydants. En plus, l'ADNmt possède peu de moyen de défenses, comparativement à l'ADN nucléaire (Ballard, 2005; Mandavilli *et al*, 2002). Ainsi, l'augmentation des dommages oxydants sur les acides nucléiques mitochondriaux peut occasionner des défauts dans les structures qui sont codées par cet ADN. Ce cercle vicieux peut donc induire des ratés au niveau de la chaîne de transport des électrons et ainsi augmenter la production de ROS. Comme l'ADNmt est davantage attaqué par les agents oxydants que ne l'est l'ADN nucléaire, l'haplotype mitochondrial pourrait donc avoir un rôle plus important que celui de l'ADN nucléaire dans les processus de vieillissement (et, plus spécialement, dans la gestion du stress oxydant). Benedictis *et al.* (1999) ont démontré qu'un haplotype mitochondrial spécifique était retrouvé plus souvent chez des humains centenaires. En plus, l'ADNmt est impliqué dans une foule de pathologies telles les maladies neurodégénératives impliquant plusieurs systèmes, comme l'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Drew et Leeuwenburgh, 2002). Enfin, la capacité d'adaptation aux environnements plus froids pourrait être associée à la variabilité de l'ADNmt chez plusieurs populations (Blier *et al*, 2006) tout comme il a été démontré que le génotype mitochondrial affecte le fitness (James et Ballard, 2003). L'ADNmt joue donc, sans aucun doute, un rôle primordial parmi les processus de vieillissement.

Les études sur l'humain démontrent de plus en plus l'importance de la variabilité structurale de l'ADNmt, et cette variabilité est directement liée à différentes maladies et au métabolisme mitochondrial (Ballard, 2005). Comme on peut l'imaginer, il est cependant difficile d'échantillonner chez l'humain. Pour cette raison, plusieurs modèles animaux ont été développés pour étudier plus aisément les processus de vieillissement. À l'heure actuelle, peu d'études sont orientées sur l'impact de la variabilité de l'ADNmt sur le métabolisme et la gestion du stress oxydant durant le vieillissement, puisque peu d'espèces présentent suffisamment de variabilité naturelle au niveau de l'ADNmt.

Un modèle unique : *Drosophila simulans*

Il existe toutefois une espèce possédant une importante variabilité intraspécifique au niveau de l'ADNmt; *Drosophila simulans*. Chez cette espèce, on trouve trois haplotypes mitochondriaux géographiquement subdivisés (*sil*, *II* et *III*), avec 3,0% de divergence inter-groupe et 0,06% de diversité intra-

groupe (James et Ballard, 2003; Ballard, 2005). Cette divergence produit un fort pouvoir analytique pour déterminer les effets spécifiques de l'ADNmt sur différents processus physiologiques.

Les origines de *Drosophila simulans*

D. simulans a été décrite pour la première fois, en 1919 par Alfred Sturvenant. *D. melanogaster* et *D. simulans* ont probablement partagé un ancêtre commun il y a entre deux et

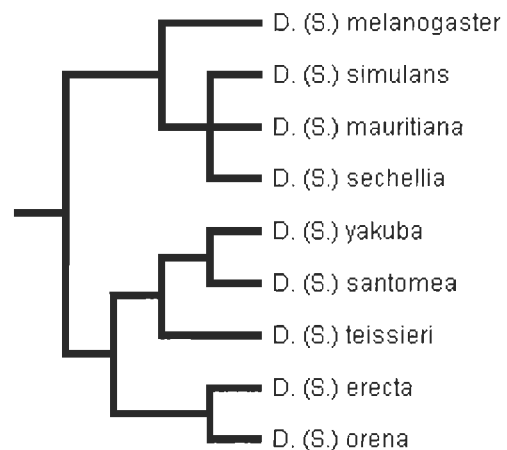


Fig. 3. Phylogénie du sous-groupe *melanogaster*

trois millions d'années. Aujourd'hui, il existe environ 141 espèces connues parmi le groupe *melanogaster* qui sont divisées en onze sous-groupes (Lemeunier et Ashburner, 1984). Le sous-groupe *melanogaster* comprend les espèces *melanogaster*, *sechellia*, *mauritiana* et *simulans*. Les croisements à l'intérieur de ce sous-groupe produisent une descendance plus ou moins stérile : les mâles y sont généralement stériles alors que les femelles y sont généralement fertiles. En fait, il semblerait que *D. simulans* et *D. mauritiana* soient moins isolées les unes des autres qu'elles ne le sont de *D. sechellia*. Aussi, *D. melanogaster* serait l'espèce la plus isolée par rapport aux trois autres (Lachaise *et al*, 1986). Enfin, il semblerait que les deux espèces insulaires *sechellia* et *mauritiana* découleraient d'une population continentale de *D. simulans* (Kliman *et al*, 2000).

Les trois haplogroupes de *D. simulans* ne sont pas répartis uniformément sur la planète. On trouve *siI* à Hawaï, en Nouvelle Calédonie, à Tahiti et aux Seychelles. Cette souche est la seule à ne pas vivre en sympatrie avec un autre haplogroupe. Les haplogroupes *siII* et *III* se trouvent, en sympatrie, principalement à l'est du continent africain (Ballard, 2005). Dans ces régions, on trouve la souche *siIII* dans une fréquence d'environ 40 % (Ballard, 2004).

Enfin, l'utilité de ce modèle est aussi supportée par le fait que le génome mitochondrial et le système de transport des électrons sont fortement conservés chez la drosophile, la souris et les humains (Ballard, 2005). En plus, son temps de génération très court, sa facilité d'élevage et de manipulation expérimentale et génétique en font un modèle exceptionnel pour l'avancement des connaissances sur la gestion du métabolisme mitochondrial et du stress oxydant lors du vieillissement.

Variation entre les différents haplogroupes de *D. simulans*

À ce jour, plusieurs études ont observé des différences entre les haplogroupes au niveau du fitness, de certains traits d'histoire de vie (James et Ballard, 2003; Ballard *et al*, 2007), de la production mitochondriale de ROS, de la consommation mitochondriale d'O₂, de la capacité de la cytochrome *c* oxydase et de l'ATPase (Katewa et Ballard, 2007a). Cependant, ces études sont incapables d'identifier la cause véritable de cette variation entre les haplogroupes. Étant donné que les complexes enzymatiques du système de transport des électrons sont codés à la fois par l'ADN nucléaire et l'ADNmt (à l'exception du complexe II), les différences observées entre les haplogroupes peuvent être influencées par l'ADN nucléaire ou l'ADNmt, mais aussi par les gènes codés par l'ADN nucléaire qui produisent des protéines qui sont importées dans la mitochondrie ou, plus simplement, par les interactions mitonucléaires.

Une étude a démontré que les mouches dans lesquelles on avait remplacé les mitochondries par celles d'un autre haplogroupe étaient grandement désavantagées par rapport aux souches qui avaient conservé leur haplotype original (Nigro, 1994). Plus tard, on a découvert qu'en brisant les interactions mitonucléaires, on observait une diminution importante de l'activité des mouches (James et Ballard, 2003). Sachant qu'en brisant ces mêmes interactions, on a observé une chute drastique de la capacité des complexes enzymatiques de la chaîne de transport des électrons (voir plus haut) chez *Tigriopus californicus* (Ellisson et Burton, 2006), ces résultats semblent suggérer que les différences métaboliques observées entre les haplogroupes de *D. simulans* pourraient être aussi influencées par les interactions mitonucléaires. Il serait donc important d'examiner et de confirmer l'origine de ces différences métaboliques dans le but de mieux comprendre l'effet de la variabilité de l'ADNmt (et des interactions mitonucléaires) sur le métabolisme mitochondrial et la gestion du stress oxydant.

1.6.2 La température

La température est un facteur crucial qui affecte les processus physiologiques et le vieillissement (Berrigan, 1997; Berrigan et Partridge, 1997; Clark et Fucito, 1998; Robinson et Partridge, 2001; Pörtner, 2002; Lannig *et al*, 2003), particulièrement chez les ectothermes qui ne régulent pas leur température corporelle. Au point de vue chimique, une augmentation de la température entraîne une augmentation des vitesses de réaction (Chang et Papillon, 1998). Tous les processus physiologiques seront donc affectés par les changements de température. Il a été démontré, par exemple, que des drosophiles (*D. melanogaster*) élevées à 18 °C ont une taille plus importante et une croissance plus rapide que celles élevées à 25 °C (Berrigan et Partridge, 1997; Robinson et Partridge, 2001).

Le métabolisme

Le métabolisme aérobie n'échappe pas au phénomène et va aussi être influencé par les changements de température. Chez les ectothermes, le métabolisme est directement dépendant de la température (Hochachka et Somero, 1984). La diminution du métabolisme aérobie, observée à des températures extrêmes, peut être dictée par les niveaux d'oxygène dans les fluides corporels et par les limites des systèmes circulatoires à assurer un apport suffisant en oxygène à de telles températures. En fait, la capacité aérobie mitochondriale serait limitée par la ventilation et la circulation à faible température alors qu'à haute température, une très forte demande en oxygène induirait une diminution des niveaux d'oxygène dans les fluides corporels (Pörtner, 2002). Les limites fonctionnelles du métabolisme à basse température pourraient aussi être causées par une diminution de la sensibilité aux différents régulateurs (Blier et Lemieux, 2001). D'ailleurs, une

forte diminution de la température réduit significativement la sensibilité mitochondriale à l'ADP (Blier et Guderley, 1993).

Entre ces extrêmes, se trouve la gamme de température à laquelle une espèce est adaptée, et l'on doit s'attendre à y voir une augmentation du métabolisme avec la température. Cependant, chez les espèces adaptées ou acclimatées au froid, le métabolisme (par unité de poids) est souvent plus important que chez les espèces adaptées ou acclimatées à des climats plus tempérés ou tropicaux lorsque celui-ci est mesuré à basse température (Johnston *et al*, 1994; Berrigan, 1997; Berrigan et Partridge, 1997). À basses températures, on remarque chez certaines espèces une augmentation de la quantité de mitochondries (Pörtner, 2001), ce qui pourrait constituer une réponse pour contrer la perte d'affinité à l'ADP. Cette compensation permet à ces espèces de survivre et de maintenir les processus physiologiques qui seraient autrement nettement ralentis à de telles températures.

Tous les compartiments du métabolisme aérobie ne sont cependant pas affectés de la même façon par la température. Ainsi, les enzymes oxydantes, la créatine kinase, la citrate synthase et l'AMP désaminase montrent de forts niveaux de compensation dans le froid alors que ce n'est pas le cas des enzymes glycolytiques (Pörtner, 2002).

La production et le métabolisme de ROS

Puisque la température influence fortement le métabolisme aérobie, principal producteur de ROS, celle-ci devrait affecter la production de radicaux libres mais, à ce jour, le lien entre le métabolisme, la température et la gestion des ROS est très peu étudiée. D'un côté, comme les ROS constituent des sous produits normaux du métabolisme, il serait normal qu'une

augmentation du métabolisme avec la température entraîne une augmentation de la production des ROS. Mais, d'un autre côté, on sait que cette production est supposée être maximale lorsque les différents complexes de la chaîne de transport des électrons sont dans un état réduit extrême (Abele *et al*, 2002). Or, à des températures plus froides, le métabolisme est plus lent, donc la vitesse de transport des électrons est ralentie, le niveau de réduction de la chaîne de transport est augmenté, ce qui accentue la probabilité pour un électron de rencontrer une molécule d'oxygène et ainsi créer un ROS.

La température influant sur l'apport des tissus en oxygène, et l'apport en oxygène influant aussi sur la production de ROS, l'effet de la température s'en trouve d'autant plus important. Puisque l'oxygène est l'accepteur final des électrons, il constitue nécessairement un régulateur important de la respiration mitochondriale. Ainsi, sous des conditions hypoxiques, les complexes ralentissent, maximisent leur état réduit et la production de ROS. Au contraire, lorsque la PO_2 est élevée, l'oxydation phosphorylante augmente et minimise la production de ROS (Abele *et al*, 2002; Pörtner, 2002).

Pour contrer une plus grande production de ROS due à un éloignement de l'optimum thermique, on observe généralement une augmentation des capacités antioxydantes chez les ectothermes (Parihar et Dubey, 1995; Bagnyukova *et al*, 2005; Sollid *et al*, 2005; Heise *et al*, 2006). De plus, en augmentant la production des radicaux libres (suite à un éloignement de l'optimum thermique, par exemple), on pourrait s'attendre à observer une augmentation des résidus oxydés sur les structures cellulaires (les groupements carbonyles par exemple). Cependant, il est possible que l'oxydation des biomolécules soit contrecarrée par des ajustements des capacités antioxydantes, tout dépendamment du niveau de stress auquel l'animal est exposé et auquel il peut résister (Bagnyukova *et al*, 2005).

Le but de cette étude était de tester l'effet de la variabilité de l'ADNmt et des interactions mitonucléaires sur le métabolisme mitochondrial et la gestion du stress oxydant, au cours du vieillissement, sous différentes conditions thermiques optimales ou non, en utilisant différents haplotypes de *Drosophila simulans*. Pour ce faire, quatre lignées ont été utilisées. Deux lignées kenyanes à l'haplotype original (*siII* et *siIII*), ainsi que deux lignées introgressées; soit *siII** (possédant l'ADNmt de l'haplogroupe *siII* avec l'ADN nucléaire de *siIII*) et *siIII** (possédant l'ADNmt de l'haplogroupe *siIII* avec l'ADN nucléaire de *siII*) ont été utilisées. Les différentes lignées ont été exposées à quatre régimes thermiques différents; soit 12, 18, 24 et 28 °C. Ensuite, des enzymes clés de différentes étapes du métabolisme mitochondrial ont été mesurées à trois âges différents (soit 5, 10 et 15 jours, sauf pour le traitement à 28 °C où les mouches sont mortes majoritairement avant l'âge de 15 jours): (i) la citrate synthase et l'aconitase pour le cycle de Krebs, (ii) l'ETS pour la chaîne de transport des électrons (qui représente la mesure simultanée des complexes I et III) et le complexe IV. Les capacités de défense contre les ROS ont été estimées par la mesure de la catalase alors que les dommages oxydants l'ont été par la mesure des niveaux de protéines (groupements carbonyles) et de lipides (malondialdéhyde) oxydés.

1.7 Objectifs

Objectif 1

Le premier objectif de cette étude était de mesurer l'effet des haplotypes mitochondriaux sur les capacités métaboliques mitochondriales et la gestion du stress oxydant lors du développement et du vieillissement. Afin de tester cet effet, il était indispensable de tester la coadaptation mitonucléaire, en brisant les interactions mitonucléaires (par rétrocroisement) pour déterminer l'origine (mitochondriale, nucléaire ou mitonucléaire) des propriétés métaboliques chez les différentes lignées utilisées. Selon nos hypothèses, les capacités métaboliques de la chaîne de transport des électrons devraient varier selon les interactions mitonucléaires. De plus, certaines interactions mitonucléaires assureront une meilleure gestion du stress oxydant dans des conditions thermiques sous optimales. Nous prédisons que les enzymes codées par le génome mitochondrial, les dommages oxydants et l'activité du système antioxydant varieront significativement entre les différentes lignées de *Drosophila simulans*.

Objectif 2

Le deuxième objectif de cette étude était d'étudier l'effet de la température sur les capacités métaboliques mitochondriales et la gestion du stress oxydant durant le vieillissement chez différents haplotypes de *D. simulans*. Nous croyons qu'une température environnementale qui s'éloigne de l'optimum thermique altère les capacités enzymatiques et accélère les processus de vieillissement à cause d'un dérèglement de la gestion du stress oxydant. Nous prédisons que les drosophiles exposées à des températures extrêmes (haute et basse) auront un stress oxydant plus élevé. Les dommages oxydants augmenteront, tout comme l'activité des systèmes antioxydants.

2. CHAPITRE 2

2.1 Titre

Divergence of mitochondrial functions in native and introgressed strains of different haplotypes of *Drosophila simulans*

Étienne Hébert Chatelain¹, Nicolas Pichaud¹, William Ballard², Robert Tanguay³, Geneviève Morrow³, Pierre U. Blier^{1*}

¹ Laboratoire de Biologie Évolutive, Département de Biologie, Université du Québec à Rimouski, 300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada G5L 3A1

² Ramaciotti Centre for Gene Function Analysis, Scholl of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University of New South Wales, Sydney 2052, Australia

³ Laboratoire de Génétique Cellulaire et développementale, Département de Médecine CREFSIP, Pavillon C. E.-Marchand, Université Laval, Québec, Canada G1K 7P4

* Corresponding author. Tel.: 1 418 7231986 #1262; fax: 1 418 7241849.
E-mail address: pierre_blier@uqar.qc.ca (Pierre U. Blier)

2.2 Abstract

Drosophila simulans possesses three different mitochondrial haplotypes (*siI*, *II* and *III*) non-randomly geographically subdivided with a 3% interhaplogroup variation without any difference in nuclear genome. The aim of this study was to test the effect of mtDNA variability on mitochondrial metabolism and oxidative stress management at three ages in *Drosophila simulans* exposed to different thermal regimes. Significant differences in cytochrome *c* oxydase activities were observed between *siII* and *siIII* lines used here while oxidative stress markers (carbonyls and MDA residues) were not different between these lines. In order to identify the origin of these metabolic differences, the two native strains were backcross to disrupt interactions between nuclear and mitochondrial genome. The observed collapse of cytochrome *c* oxydase capacities in introgressed lines compared to pure lines of *siII* suggests that metabolic differences observed here and in previous studies are dictated by mitonuclear interactions rather than mitochondrial DNA alone. However, these mitochondrial differences were not translated in different level of oxidative stress markers. Although *D. simulans* present important structural mitochondrial DNA differences among haplogroups, no clear metabolic and oxidative stress status difference was observed among strains exposed to different thermal regimes, suggesting a strong conservatism of mitochondrial functions between strains studied.

2.3 Introduction

Mitochondria, which produce most of the energy used by the cell, possess its own DNA (mtDNA) that code for several subunits of mitochondrial electron transport system complexes. Energy production occurs through oxidative phosphorylation (OXPHOS) where reducing equivalents are transferred from Krebs cycle to electron transport chain complexes. The course of electrons through the complexes I, II, III and IV allows a four-electron reduction of O_2 to form H_2O and the passage of protons to mitochondrial inter-membrane space which are then used by the ATP synthase (complex V) to produce ATP (Navarro and Boveris, 2007). One-electron reduction of O_2 to form superoxide (O_2^-) can occur at complex I and III along with glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* (Chen et al., 2003; Miwa et al., 2003). This anion can lead to spontaneous or enzymatic formation of other reactive oxygen species (ROS) such as H_2O_2 and hydroxyl radical (Beckman and Ames, 1998; Finkel and Holbrook, 2000). These ROS can oxidize DNA, proteins and lipids (Barja and Herrero, 2000; Das et al., 2001; Bokov et al., 2004) especially when they overflow the capacity of antioxidant enzymes (catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase) and other non enzymatic antioxidant compounds derived from food (Beckman and Ames, 1998). ROS are recognized as important determinant of aging processes (Finkel and Holbrook, 2000). There is evidence that mtDNA presents more oxidative damage than nuclear DNA (Wei et al., 1998; Barja and Herrero, 2000) because of its closer position to ROS production sites and its limited repair mechanisms (Bogenhagen, 1999). Mutant mtDNA could impair OXPHOS (Yui et al., 2003) and lead to an increase of ROS production (Bokov et al., 2004): highlighting the importance of mtDNA in oxidative stress management during aging. However, it is difficult to assess the effect of mtDNA variability on physiological

processes during aging since most models used (including *D. melanogaster*) show low mtDNA variations (Ballard and Kreitman, 1994).

Drosophila simulans was recently proposed as a new model to study adaptive value of mtDNA because it possesses three different mitochondrial haplotypes (*siI*, *II* and *III*) non-randomly geographically subdivided with a 3% interhaplogroup variation (Ballard, 2000; Ballard, 2005) and without any nuclear subdivision at nuclear encoded loci tested to date (Katewa and Ballard, 2007b). Important fitness and life history-traits differences were observed among different haplogroups of *D. simulans* (De Stordeur, 1997; James and Ballard, 2003; Ballard et al, 2007). Significant differences were also noted between *siII* and *III* haplogroups mitochondrial H₂O₂ production, O₂ consumption, cytochrome *c* oxidase and ATPase activity (Katewa and Ballard, 2007a). However, because sub-units of mitochondrial electron transport chain complexes are encoded by both nuclear and mitochondrial DNA (except for complex II), origin of variations in mitochondrial bioenergetics among haplogroups remains unclear. These differences may be influenced by mitochondrial DNA (mtDNA) encoded genes, nuclear encoded genes that produce peptides imported into the mitochondrion or interactions between mtDNA and nuclear encoded peptides (mitonuclear interactions). Previous study based on population cage competition had shown that *D. simulans* strain where foreign mitochondria were micro-injected was outcompeted by strains that had kept the original haplotype (Nigro, 1994). Also, backcrossing studies had shown that disruption of mitonuclear interactions caused a significant decrease in fitness and mitochondrial bioenergetics efficiency in introgressed lines (James and Ballard, 2003; Sackton et al, 2003; Ellisson and Burton, 2006). Together, these data suggest that mitonuclear interactions could also influence competition abilities and mitochondrial metabolism among *D. simulans* haplogroups. Nevertheless, comparisons between native and introgressed mitochondrial

haplotypes are still necessary if we want to elucidate whether mtDNA itself or mitonuclear interactions are responsible of metabolic differences among *D. simulans* haplogroup. Also, studying mitonuclear interactions disruption seems essential to our understanding of its influence on oxidative stress management during aging among different *D. simulans* haplogroups.

Recent studies showed that environmental factors may outcome the effect of mitonuclear interactions in plants (Galloway and Fenster 1999; Campbell and Wasser 2001) and insects (Dowling et al, 2007). Indeed, temperature has a major impact on all physiological processes especially in ectotherms that do not control their body temperature: metabolic rate of these animals is proportional to environmental temperature (Hochachka and Somero, 1984). Since mtDNA has been suggested to influence the ability to acclimate to different thermal environment (Blier et al., 2001; Fontanillas et al., 2005), proteins encoded in different mitochondrial haplotypes could have different functional properties and thermal sensitivities. Further, if ROS production and oxidative stress management are also influenced by temperature (see below), different haplogroups could respond differently to thermal stress. It appears that temperature impact on oxidative stress management during aging is poorly understood: if ROS are by-products of mitochondrial metabolism, it should be expected that their production (and probably oxidative stress) increase with temperature. On the other side, ROS production is supposed to be maximal when mitochondrial electron transport chain complexes are in a maximally reduced state (Abele et al., 2002), which occur when the rate of electron flow slow down at low temperature. In fact, lifespan in *Drosophila* is temperature-dependant and longevity is known to decrease exponentially with increasing temperature between 12 and 30 °C (David, 1988). Thus, high temperature regimes are expected to accelerate aging processes and consequently ROS and/or oxidative residues production. Since oxidative stress is supposed to be an important

determinant of aging processes, studying the influence of temperature on mitochondrial metabolism and oxidative stress management in *D. simulans* seems essential in improving our understanding of biochemical and physiological implications of mtDNA variability during aging.

The aim of this study is to test the effect of mtDNA and mitonuclear interactions variability on mitochondrial metabolism capacity and oxidative stress management at three ages using four different strains of *Drosophila simulans*: *siII*, *siIII* and introgressed *siII* (*siII**) and *siIII* (*siIII**) strains, exposed to different temperature treatments (12, 18, 24 and 28 °C). First, we have analysed different steps of mitochondrial metabolism: (i) citric acid cycle with citrate synthase (CS) and aconitase (ACO) and (ii) electron transport system with ETS, which comprises the simultaneous activity of two enzymes of the respiratory chain: NADH dehydrogenase and cytochrome *c* reductase (respectively complexes I and III) and the fourth complex: cytochrome *c* oxydase (COX). Defense capacity against oxidative stress has been estimated by the activity of catalase (CAT). Finally, oxidative damages were evaluated by the measurement of oxidized proteins and lipids (respectively, carbonyls and malondialdehyde residues).

2.4 Material and methods

Fly lines

Two native strains of *Drosophila simulans* were used during this experiment: a Kenyan *siII* strain (*siII*) and a Kenyan *siIII* strain (*siIII*). These lines (respectively, 2KY21 and 3KY20) were collected in Nairobi in November 2004 and were selected from those used in Ballard *et al* (2007). In order to examine the possible influence of mitonuclear interactions on mitochondrial metabolism, two introgressed lines, a *siII* mtDNA introgressed in *siIII* nuclear DNA strain (*siII**) and a *siIII* mtDNA introgressed in *siII* nuclear DNA strain (*siIII**) were also studied. *siII** strain was constructed by mating *siII* virgin females with *siIII* males. The virgin female progeny (F_1) of these parents were then backcrossed with *siIII* males. This was repeated until eight generations of backcrossing were complete. Because mitochondria are maternally inherited, backcross allows maintenance of maternal mtDNA while increasing the proportion of nuclear DNA from male. Theoretically, this procedure allows a replacement of 99.9 % of nuclear DNA (but see Dermitzakis *et al*, 2000) to obtain *siII* mtDNA with *siIII* nuclear DNA. *siIII** strain was developed by using the same procedure with *siIII* females and *siII* males. For each introgressed strains, four independent replicate lines were made. The mtDNA type of each line was determined using allele-specific PCR (Dean, 2003) and the absence of *Wolbachia* was verified using conserved 16S rDNA primers (James and Ballard, 2000). Each strain was started with adults of less than 14 days old (Hercus and Hoffman, 2000) and maintained at constant density, temperature ($24.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$), humidity (50 % RH), diurnal cycle (12 h light and 12 h dark) and standard cornmeal medium diet: for 1 L of medium; 5 g sugar, 6 g agar, 27 g dried yeast, 53 g cornmeal, 4 mL propionic acid and 16 mL methyl 4-hydroxybenzoate 10% (v/v) in ethanol. A limitation of this

study is that a single haplotype representative of *siII* and *siIII* haplogroups was included. However, we assume that *siII* and *siIII* strains used here are representative of the lines within each haplogroup, since there is little within-haplogroup divergence: Ballard *et al* (2007) analysed over 5500 bp and note only one nonsynonymous change within *siII* lines and one nonsynonymous change within *siIII* lines studied.

Our analyses were done only on males, because oocytes in the abdomens of females are rich in mitochondria and could likely alter the measurements. Flies were sexed on ice and males were deposited in sterile recipients in equal density during a 24 hours period after hatching. These recipients were then randomly divided among incubators with different treatment: 12.0, 18.0, 24.0 and 28.0 ± 0.1 °C (two incubators by treatment were used). 24.0° C is considered as an optimal temperature for *Drosophila* species (David, 1988) although it is not yet known if this temperature is optimal for kenyan *D. simulans*. Further, 5, 10 and 15 days old males were randomly taken from each incubator except at 28.0 °C where most flies died before 15 days (probably because of the decrease in longevity which occurs at high temperature). Flies were immediately stored at – 80 °C until further analyses (less than one month).

Enzymatic assays

Fifteen male flies were weighed with an electrobalance (Mettler Toledo) with a resolution of 0.1 µg, pooled and homogenized three times for 10 s in ice cold buffer (100 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA and 0.1% Triton X-100, pH 7.5) with a Tekmar homogenizer (approximately one fly in 100 µL buffer). Homogenates were then centrifuged at 750 g (except for the CAT assay where homogenates were centrifuged at 13000 g) during 3 minute at 4 °C and the supernatant was used for all analyses. All the manipulations were performed on ice. Enzyme activities (and the

determination of protein content and carbonyl residues) were measured using a UV/VIS spectrophotometer (Perkin Elmer, Lambda 11) equipped with a thermostated cell holder and a circulating refrigerated water bath. Enzymatic assays were performed at a constant temperature (24°C) to allow comparison of the thermal regime effect on metabolic capacity and oxidative stress management during aging among the different treatments. All assays were run in duplicate and specific activities were expressed as $U \cdot mg^{-1}$ protein where U represents μmol of substrate transformed per minute. Conditions for enzymatic assays were as follows:

CS (EC 4.1.3.7): 100 mM imidazole-HCl (pH 8.0), 0.1 mM 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid), 0.1 mM acetyl CoA and 0.15 mM oxaloacetate. Activity was measured at 24°C by following the increase in absorbance due to the oxidation of DTNB at 412 nm ($\epsilon_{412} = 13.6 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) (Thibeault *et al*, 1997).

ACO (EC 4.2.1.3): 50 mM Tris-HCl, 0.1 % Triton X-100 (pH 7.4), 0.6 mM $MnCl_2$, 5 mM sodium citrate, 0.2 mM NADP, 0.4 $U \cdot ml^{-1}$ isocitrate dehydrogenase. Activity was followed at 24°C with the appearance of NADPH at 340 nm ($\epsilon_{340} = 6.22 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) (Miwa and Brand, 2005).

ETS: 0.1 M sodium phosphate (pH 8.5), 0.85 mM NADH, 2 mM iodonitrotetrazolium chloride and 0.03% Triton X-100. Activity was recorded at 24°C by following the reduction of INT, which yields an increase in absorbance at 490 nm ($\epsilon_{490} = 15.9 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) (Lannig *et al*, 2003).

COX (EC 1.9.3.1): 100 mM potassium phosphate and 0.05 mM horse heart cytochrome *c* (pH 7.4). Cytochrome *c* was reduced by the addition of dithionite (4 mM) and the solution was bubbled with air to eliminate the excess of reducing agent (Hodges and Leonard, 1974). Control

samples consisted of 0.05 mM cytochrome *c* oxidized with potassium ferricyanide (0.05%). Activity was measured at 24°C by following the oxidation of cytochrome *c* at 550 nm and calculated using an extinction coefficient (ϵ_{550}) of $29.1 \text{ ml}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$.

CAT (EC 1.11.1.6): 100 mM sodium phosphate (pH 7.5) and 60 mM H_2O_2 . CAT activity was determined at 24 °C by following the decomposition rate of H_2O_2 at 240 nm ($\epsilon_{340} = 40 \text{ ml}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mmol}^{-1}$) (Nusetti *et al*, 2005).

Biomarkers of oxidative stress

Determination of carbonyl residues: fly homogenates were incubated in 2,4-dinitrophenylhydrazine-HCl (10 mM), precipitated in 20 % trichloroacetic acid (TCA) (w:v) and centrifuged at 10000 g for 5 minutes. Supernatant was discarded and the remaining pellet was rinsed with 1:1 ethanol-ethylacetate (v:v). Proteins were resuspended in guanidine-HCl (6 M). Carbonyl residues were then detected by reading the absorbance at 370 nm and 24°C (modified from Lenz *et al*, 1989). Carbonyls residues are presented as nmol carbonyls per mg of protein.

Determination of malondialdehyde (MDA): MDA were measured with a TBARS assay kit (cat. no. 0801192) from Zeptometrix (Buffalo, NY, USA). This method relies on the fluorometric measurement of pink chromophor produced during the reaction of thiobarbituric acid (TBA) with MDA. MDA content were measured at 24°C and with light excitation set at 530 nm, emission set at 550 nm and width of 5 nm using a fluorescence spectrophotometer (F-2500 from Hitachi) equipped with a thermostated cell holder and a circulating refrigerated water bath and estimated following the manufacturer's protocol.

Protein assays

Total protein content of each sample was determined by the bicinchoninic acid method (Smith *et al*, 1985). Homogenization with Triton X-100 may interfere with protein determination assay by causing a precipitate. However, since its concentration is very low (0.1%), it was not considered.

Chemicals

All chemicals used for enzymatic, biomarkers of oxidative stress and protein assays were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA).

Statistical analyses

All analyses were performed with SAS software (9.1.3). Because incubators did not affect any parameters ($p > 0.05$), this factor was not considered in analyses. Since mass was significantly correlated with protein content, CS and ETS, three-way ANCOVA with three fixed factors (strain, temperature and age) and mass as concomitant variable was used to evaluate statistical differences in those enzymes among different *D. simulans* strains at different ages and in different treatment. ANOVA with three fixed factors (strain, temperature and age) was used to evaluate all other parameters. Normality assumption was verified with Shapiro Wilk test (protein content were log transformed to respect normality). When possible, multiple comparisons test was done with least square means method. Significance was assessed at the 0.05 level (or lower) for all tests. *F* and *p* are presented in the text but only for primary factors (strain, temperature and age) and the interaction strain*age*temperature to simplify the presentation of results.

2.5 Results

Average mass and protein content of different *D. simulans* lines were not different ($p > 0.05$) between temperature treatments at any age (Table 1). ANOVA showed that mass was not influenced by strain ($F_{3, 4177} = 1.48$: $p = 0.22$), age ($F_{2, 4177} = 0.68$: $p = 0.50$), temperature ($F_{3, 4177} = 1.38$: $p = 0.25$) and their interaction ($F_{15, 4177} = 0.81$: $p = 0.67$). Also, ANCOVA showed that protein contents were not influenced by strain ($F_{3, 176} = 1.49$: $p = 0.22$), age ($F_{2, 176} = 0.34$: $p = 0.71$), temperature ($F_{3, 176} = 1.31$: $p = 0.27$) and their interaction ($F_{15, 176} = 0.83$: $p = 0.64$).

Table 1. Mean (\pm SD) mass and protein content of *siII*, *siIII* and introgressed *siII* (*siII**) and *siIII* (*siIII**) *Drosophila simulans* strains. No difference in mass (according to ANOVA) and protein content (according to ANCOVA) was detected among strains, ages and temperatures.

		<i>siII</i>	<i>siIII</i>	<i>siII</i> *	<i>siIII</i> *
Mass (mg)	(n = 384)	0.69 (0.08)	0.67 (0.07)	0.69 (0.08)	0.68 (0.06)
Protein content (mg g ⁻¹)	(n = 24)	80.00 (4.86)	71.18 (7.50)	87.03 (10.13)	78.29 (4.64)

Citric acid cycle

CS and ACO activities were not different ($p > 0.05$) among strains at any age and temperature treatment (Table 2). ANCOVA showed that citrate synthase was not influenced by strain ($F_{3, 176} = 0.05$: $p = 0.99$), age ($F_{2, 176} = 0.08$: $p = 0.93$), temperature ($F_{3, 176} = 1.60$: $p = 0.19$) and their interaction ($F_{15, 176} = 1.24$: $p = 0.24$) while ANOVA showed a significant effect of strain ($F_{3, 219} = 10.87$: $p < 0.01$), but not of age ($F_{2, 219} = 0.53$: $p = 0.59$), temperature ($F_{3, 219} = 2.60$: $p = 0.06$) nor their interaction ($F_{15, 219} = 0.50$: $p = 0.94$) on ACO capacities.

Table 2. Mean (\pm SD) citrate synthase and aconitase activities ($\text{U}\cdot\text{mg protein}^{-1}$) of 5, 10 and 15 days old of *siII*, *siIII* and introgressed (*siII**) and *siIII* (*siIII**) *Drosophila simulans* strains (n=6) exposed to different thermal regime. No difference was detected among citrate synthase activities (according to ANCOVA) and aconitase activities (according to ANOVA).

Age	<i>siII</i>			<i>siIII</i>			<i>siII*</i>			<i>siIII*</i>		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Citrate synthase												
12°C	0.46 (0.06)	0.54 (0.06)	0.60 (0.16)	0.62 (0.06)	0.65 (0.02)	0.73 (0.05)	0.47 (0.21)	0.55 (0.110)	0.56 (0.04)	0.53 (0.04)	0.56 (0.04)	0.54 (0.03)
18°C	0.47 (0.03)	0.53 (0.05)	0.53 (0.06)	0.65 (0.03)	0.68 (0.07)	0.68 (0.06)	0.51 (0.03)	0.51 (0.02)	0.57 (0.04)	0.55 (0.03)	0.56 (0.03)	0.56 (0.04)
24°C	0.51 (0.07)	0.54 (0.04)	0.47 (0.08)	0.70 (0.05)	0.69 90.06)	0.63 (0.05)	0.51 (0.11)	0.54 (0.08)	0.53 (0.03)	0.56 (0.05)	0.60 90.03)	0.56 90.03)
28°C	0.45 (0.05)	0.56 (0.07)	-	0.68 (0.080)	0.67 90.07)	-	0.48 (0.06)	0.44 (0.17)	-	0.59 (0.04)	0.58 (0.03)	-
Aconitase (*10²)												
12°C	3.86 (0.50)	3.56 (1.23)	4.41 (0.25)	3.65 (0.54)	4.01 (0.52)	3.54 (0.87)	3.07 (0.74)	2.98 (0.59)	3.48 (0.94)	3.19 (1.18)	3.87 (0.83)	3.58 (1.14)
18°C	3.39 (0.46)	3.64 (0.89)	4.09 (0.38)	3.81 (0.86)	3.71 (0.88)	3.97 (1.56)	3.05 (0.79)	2.98 (0.59)	2.84 (0.69)	3.53 (0.83)	4.13 (1.36)	3.65 (1.15)
24°C	4.36 (0.31)	3.91 (1.32)	3.95 (0.27)	4.11 (0.82)	4.50 (0.80)	4.22 (0.61)	3.56 (1.37)	3.28 (1.37)	3.02 (0.71)	3.94 (1.06)	3.48 (0.93)	3.42 (0.99)
28°C	3.53 (0.66)	2.86 (0.80)	-	3.76 (0.67)	4.17 (0.54)	-	3.18 (0.46)	3.13 (0.60)	-	3.45 (0.36)	2.63 (0.39)	-

Electron transport chain

ETS (which comprises the simultaneous activity of complex I and III) activities were not different ($p > 0.05$) among strains at any age and temperature treatment (Table 3): ANCOVA showed no effect from strain ($F_{3, 176} = 0.96$: $p = 0.41$), age ($F_{2, 176} = 0.06$: $p = 0.94$), temperature ($F_{3, 176} = 0.44$: $p = 0.74$) nor their interaction ($F_{15, 176} = 0.88$: $p = 0.59$) on this enzyme capacities. ANOVA showed a significant effect of strain ($F_{3, 220} = 253.10$: $p < 0.01$) and of age ($F_{2, 220} = 5.42$: $p = 0.01$) but not of temperature ($F_{3, 220} = 1.87$: $p = 0.14$) on CCO activities. Also, there was a significant effect of the interaction strain*age*temperature ($F_{15, 220} = 2.49$: $p < 0.01$) on this enzyme capacity. CCO activities were always higher in *siII* line while decline of its catalytic activity was only observed in *siIII* strain at 28°C. Moreover, CCO capacities always break down after backcrossing *siII* native strain while this collapse was observable only at 18°C and 15 days old for *siIII* haplotype (Figure 1).

Oxidative stress management

Catalase capacity was significantly influenced by strain ($F_{3, 263} = 53.45$: $p < 0.01$) but not by age ($F_{2, 263} = 0.45$: $p = 0.64$) and temperature ($F_{3, 263} = 1.52$: $p = 0.21$). Strain *age*temperature interaction ($F_{15, 263} = 1.82$: $p = 0.03$) also affected catalase activity: introgressed *siIII* strains (*siIII**) capacities were always higher compared to *siIII* native strains. Increment of catalase activity during aging was noted in *siII* strain in all temperature treatment but 24°C while decrease of its activities were only noted in *siIII* strain at 24°C. Finally, although catalase capacities were higher at 12 and 18°C in 5 days old introgressed *siII* strain (*siII**), no clear tendency was observed between catalase capacities and temperature regime (Figure 2). Carbonyl and MDA

contents were not different ($p > 0.05$) between strains at any age and temperature treatment (Table 4). ANOVA showed that carbonyl contents were not influenced by strain ($F_{3, 220} = 0.48$: $p = 0.70$), age ($F_{2, 220} = 1.24$: $p = 0.29$), temperature ($F_{3, 220} = 0.51$: $p = 0.67$) and their interaction ($F_{15, 220} = 1.33$: $p = 0.19$) while it showed significant effect of strain ($F_{3, 220} = 7.55$: $p < 0.01$) and age ($F_{2, 220} = 13.98$: $p < 0.01$) but not from temperature ($F_{3, 220} = 1.97$: $p = 0.12$) nor their interaction ($F_{15, 220} = 1.32$: $p = 0.19$) on MDA contents. MDA contents seemed globally more important (although not significantly) in introgressed strains compared to pure strains, especially at 5 and 10 days in *siII* mitochondrial haplotype but only at 5 days in *siIII* mitochondrial haplotype. This tendency is probably illustrated by the significant effect of strain and age on MDA contents.

Table 3. Mean (\pm SD) electron transport system activities ($\text{U}\cdot\text{mg protein}^{-1}$) of 5, 10 and 15 days old of *siII*, *siIII* and introgressed (*siII**) and *siIII* (*siIII**) *Drosophila simulans* strains (n=6) exposed to different thermal regime. No difference was detected among activities according to ANCOVA.

Age	<i>siII</i>			<i>siIII</i>			<i>siII</i> *			<i>siIII</i> *		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Electron transport system												
12°C	0.18 (0.02)	0.22 (0.03)	0.21 (0.01)	0.25 (0.02)	0.25 (0.02)	0.26 (0.01)	0.25 (0.07)	0.24 (0.04)	0.24 (0.01)	0.21 (0.01)	0.22 (0.02)	0.20 (0.01)
18°C	0.19 (0.03)	0.23 (0.01)	0.22 (0.02)	0.28 (0.02)	0.27 (0.02)	0.25 (0.02)	0.23 (0.03)	0.23 (0.01)	0.26 (0.02)	0.22 (0.02)	0.23 (0.01)	0.24 (0.02)
24°C	0.19 (0.01)	0.23 (0.020)	0.21 (0.01)	0.30 (0.03)	0.27 (0.02)	0.26 (0.01)	0.25 (0.05)	0.27 (0.05)	0.26 (0.02)	0.23 (0.01)	0.27 (0.03)	0.21 (0.11)
28°C	0.20 (0.02)	0.23 (0.04)	-	0.28 (0.02)	0.27 (0.02)	-	0.24 (0.02)	0.26 (0.02)	-	0.25 (0.01)	0.25 (0.01)	-

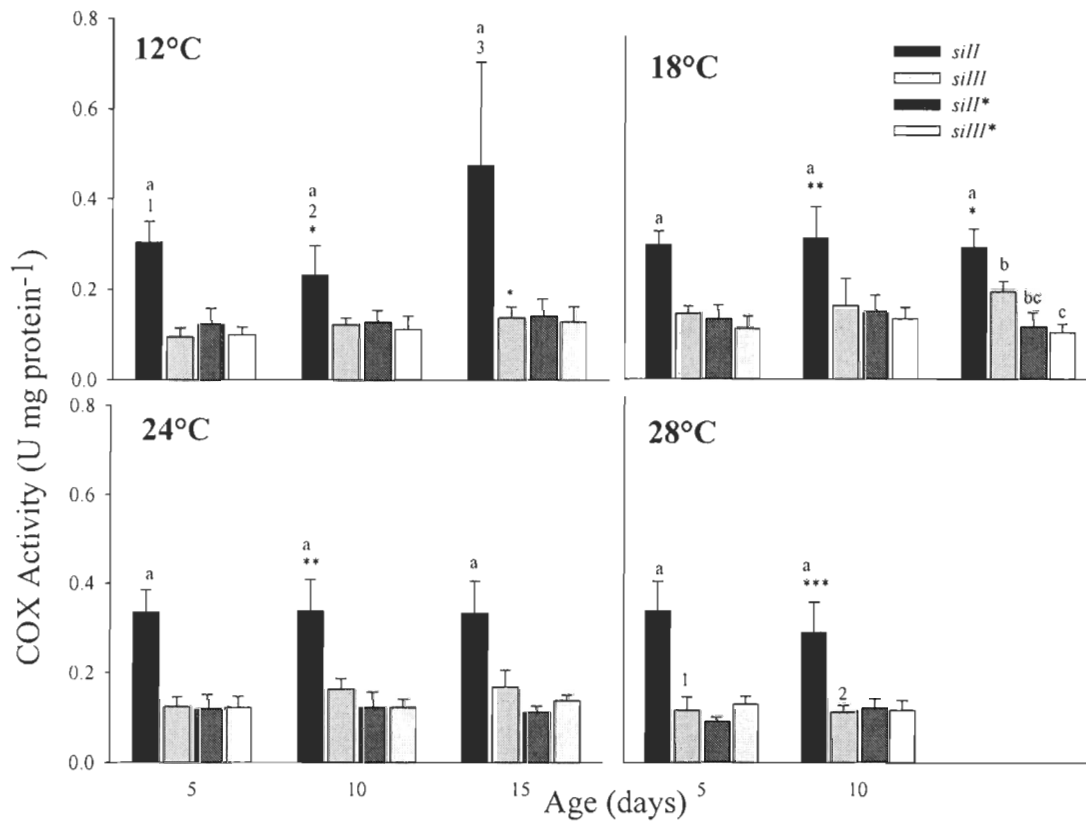


Fig. 1. Mean (\pm SD) cytochrome *c* oxidase (COX) activities of 5, 10 and 15 days old *siII*, *siIII* and introgressed (*siII**) and *siIII* (*siIII**) *Drosophila simulans* strains (n=6) exposed to different thermal regime. Letters (a, b) indicate significant differences among strains at the same age, numbers (1, 2, 3) indicate significant differences among ages in a single strain and asterisk (*, **, ***) indicate significant differences among temperature treatment at the same age and for a single strain according to ANOVA with strain, age and temperature as fixed factors.

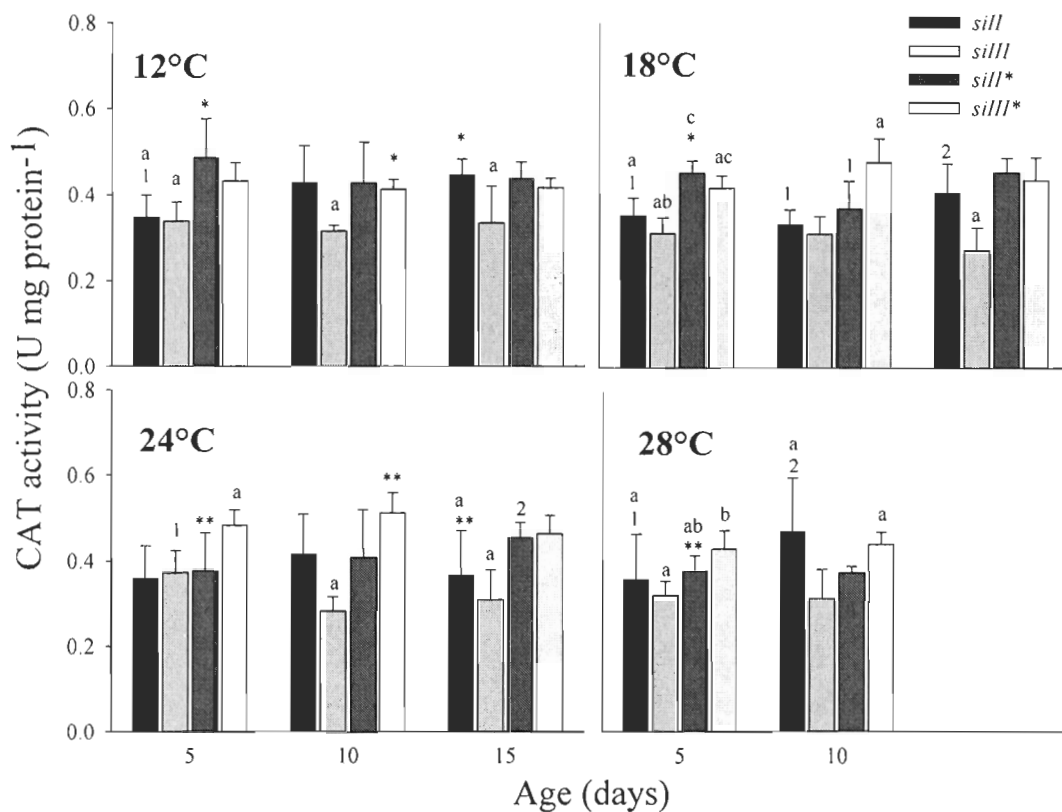


Fig. 2. Mean (\pm SD) catalase activities of 5, 10 and 15 days old *sill*, *siIII* and introgressed (*sill**) and *siIII* (*siIII**) *Drosophila simulans* (n=6) exposed to different thermal regime. Letters (a, b, c) indicate significant differences among strains at the same age, numbers (1, 2, 3) indicate significant differences among ages in a single strain and asterisk (*, **, ***) indicate significant differences among temperature treatment at the same age and for a single strain according to ANOVA with strain, age and temperature as fixed factors.

Table 4. Mean (\pm SD) carbonyl (nmol mg protein⁻¹) and MDA (pmol·mg protein⁻¹) content of 5, 10 and 15 days old of *siII*, *siIII* and introgressed (*siII**) and *siIII* (*siIII**) *Drosophila simulans* strains (n=6) exposed to different thermal regime. No difference was detected among carbonyl and MDA content according to ANOVA.

Age	<i>siII</i>			<i>siIII</i>			<i>siII</i> *			<i>siIII</i> *		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Carbonyl												
12°C	25.63 (3.32)	29.41 (5.03)	21.73 (9.88)	33.22 (14.01)	23.45 (16.49)	26.50 (11.81)	22.22 (9.61)	27.51 (11.32)	34.32 (6.64)	20.91 (11.04)	35.92 (6.38)	27.64 (9.10)
18°C	27.03 (10.02)	25.98 (8.84)	32.14 (16.37)	30.76 (9.91)	40.36 (11.96)	27.48 (7.74)	28.88 (12.40)	26.56 (95.39)	233.81 (7.48)	26.14 (18.30)	32.36 (5.96)	31.80 (13.87)
24°C	33.74 (10.26)	26.04 (14.79)	26.96 (10.78)	34.80 (12.37)	26.73 (10.17)	26.14 (7.67)	25.09 (8.75)	32.75 (8.68)	24.36 (11.05)	29.59 (8.50)	26.94 (10.61)	31.18 (15.01)
28°C	27.41 (3.15)	33.70 (14.33)	-	26.80 (6.05)	35.50 (11.91)	-	26.38 (11.97)	30.74 (8.47)	-	23.68 (16.34)	27.83 (10.02)	-
MDA												
12°C	19.73 (4.50)	29.33 (8.07)	36.86 (5.59)	20.35 (9.60)	35.00 (6.62)	33.51 (7.37)	28.79 (7.88)	41.71 (28.30)	32.47 (8.82)	51.74 (12.21)	45.19 (15.89)	33.79 (2.62)
18°C	21.47 (8.28)	29.79 (6.73)	44.24 (7.63)	18.46 (5.88)	41.96 (13.52)	41.51 (6.99)	27.80 (9.09)	40.74 (9.93)	37.91 (9.07)	40.33 (8.32)	34.50 (4.06)	49.68 (18.37)
24°C	18.06 (93.29)	25.32 (8.91)	44.98 (8.58)	21.78 (12.04)	33.71 (10.27)	35.37 (9.09)	38.20 (11.13)	32.59 (12.67)	34.47 (11.81)	34.36 (11.01)	36.73 (11.77)	43.74 (9.03)
28°C	35.63 (8.54)	40.59 (13.75)	-	18.33 (10.16)	39.25 (9.28)	-	48.69 (19.24)	32.63 (24.93)	-	41.64 (18.04)	30.87 (7.70)	-

2.6 Discussion

By presenting different mitochondrial haplotypes, *D. simulans* may unravel the influence of natural mtDNA variation on mitochondrial metabolism and oxidative stress management during aging. Fitness and mitochondrial bioenergetics differences among *D. simulans* haplogroups observed in earlier studies (De Stordeur, 1997; James and Ballard, 2003; Ballard et al, 2007; Katewa and Ballard, 2007a) may be influenced by (i) mitochondrial DNA (mtDNA) encoded peptides, (ii) nuclear encoded mitochondrial peptides or proteins or (iii) interactions between mtDNA and nuclear encoded proteins. By disrupting co-adapted mitonuclear enzymatic complexes of the electron transport chain, backcrosses allow to test whether genomes or their interactions affect metabolic differences. Indeed, variations would be due to mtDNA itself only if mitochondrial properties were conserved in both introgressed and native strains. They should however be induced by mitonuclear interactions when enzymatic capacities crash down in introgressed strains compared to native strains. Strict nuclear influence seems improbable since none of the fully nuclear encoded mitochondrial enzymes (*ie* CS and ACO) measured in this study presented significant difference according to the strain. In fact, COX is the only enzyme that presents important differences among *D. simulans* strains studied. Different COX capacities observed in native strains are corroborated by those of Ballard et al (2007) but the response of introgressed strains was quite intriguing: COX activities broke down after disruption of mitonuclear interactions in *siII* haplogroup. Indeed, this COX activity change occurs not only when we compare *siII* haplotype in different nuclear environments (*ie*, *siII* vs *siII**) but also when we compare a unique nuclear environment with different haplotype (*ie*, *siII* vs *siIII**). Therefore, our results support the importance of mitonuclear interactions (instead of an exclusive nuclear or mitochondrial genome influence) in the establishment of COX catalytic capacity. Complex IV

capacities did not however collapse after backcrossing *siIII* lines (except at 15 days old in the 18°C treatment). This might suggest that all mitonuclear interactions expressed in *D. simulans* strains have not coadapted to respond to the same metabolic or environmental constraints. More recent appearance of *siIII* *D. simulans* haplogroups compared to *siII* haplogroup (Ballard, 2000; Ballard et al, 2007) could also have lowered the potential of coevolution between both genomes in this strain: likely explaining why *siIII* complex IV catalytic capacity does not collapse after disruption of mitonuclear interactions in *siIII* line.

Actually, optimal catalytic capacity of COX depends on the concerted evolution of both genomes: unconcerted evolution could result in mismatched amino acid residues which could directly lower the catalytic efficiency of COX (Sackton et al, 2003) or cause an improper assembly of COX sub-units (Smeitink et al, 2001). Functional coadaptation of cytochrome *c* and COX complex also seems essential to maintain its optimal enzymatic capacity. For example, different populations of intertidal copepod *T. californicus* possess distinct variants of COX and cytochrome *c* and it was shown that COX activity was higher when assayed with cytochrome *c* variants from the same population (Rawson and Burton, 2002). Moreover, a recent study measured sequence variation in complete coding regions for all COX mtDNA and nuclear loci within and among the three mtDNA haplogroups of *D. simulans* (Melvin et al, 2008). This work revealed nonsynonymous amino acid changes (fixed and polymorphic) only in *siI* and *siII* haplogroups. Most of these mutations noted in *siIII* lines occurred in amino acids that are close to contact sites. From our results, these amino acid changes seem to be advantageous in the pure *siIII* line studied here. Indeed, although COX activity is globally higher in *siIII* compared to *siII* haplogroups, it presents high variation within haplogroup (Ballard et al, 2007). These combine results illustrate well the importance of mitonuclear interactions in establishing COX catalytic

capacity in the different lines of *D. simulans*. COX activity in whole fly homogenates also depends on density of COX enzymes in the inner mitochondrial membrane, the total surface area of the inner membrane, the density of mitochondria per unit of protein and proper biogenesis of mitochondrial inner membrane (Sackton et al, 2003). However, since our results showed no CS and ETS capacities difference among strains, mitochondrial density and surface area could not explain COX differences in this study. Further analysis of electron transport complexes catalytic capacities among native haplogroups and introgressed strains are still necessary in order to improve our understanding of the influence of mtDNA on metabolism in *D. simulans*, but we could suggest that the higher activity of COX is a specific metabolic adaptation of the pure *siII* strain studied here that requires the proper combination of co-evolved nuclear and mitochondrial genomes.

As the terminal component of electron transport system, impairment of COX could increase the residence time of electrons (or the reduced state) on upstream complexes and consequently increase ROS production (Ferguson et al, 2005; Katewa and Ballard, 2007b). COX capacity usually decreases during aging in drosophila (Morel et al, 1995; Ferguson et al, 2005; Dubessay et al, 2007) and this decrease was advanced for explaining the increase of H₂O₂ production observed in aged flies (Sohal et al, 1995; Bayne et al, 2005). Increment of oxidized residues was also observed in drosophila (Argawal and Sohal, 1994; Yan *et al*, 1997; Chavous *et al*, 2001; Yui *et al*, 2003). In this study, COX only decreased in *siIII* strain at 28°C. However, considering that this decrease was only observed in the treatment where flies died prematurely (data not shown), it could suggest that duration of the study was too short to detect the impact of senescence. Indeed, the ages used in this study are quite younger than in other studies using *drosophila* species (Dubessay et al, 2007; Katewa and Ballard, 2007b). However, since aging processes are

observable from fecundation to death (Dufour and Larsson, 2004), results from the present work are at least representative of early aging. Previous results have shown the same decrease only in *siIII*, which corresponded to a H_2O_2 production increase (Katewa and Ballard, 2007b). Here, although COX activities were different among strains, no significant difference in whole fly oxidized residues (ie carbonyls and MDA) was detected. It is still possible that different mitochondrial *in vivo* H_2O_2 production is not translated in different level of oxidized residues at organismal level for few reasons. First, it is possible that H_2O_2 production measured *in vitro* do not reflect what is happening *in vivo* (Halliwell and Whiteman, 2004). Second, COX is known to present an excess capacity in ectotherm species (Blier and Lemieux, 2001), suggesting that small changes in its activity barely affect the overall mitochondrial respiration, electron transfer rate and consequently oxidative stress. Indeed, Dubessay et al (2007) observed a general decline of electron transport chain complexes activities during aging in *D. melanogaster* that was not correlated with lower mitochondrial oxygen consumption. However, this hypothesis seems unlikely since recent results of our laboratory suggest an absence of excess capacity for COX in *D. simulans* (manuscript in preparation). As a key step of electron transport system, especially when there is no excess catalytic capacity (Ferguson *et al*, 2005), COX could be responsible for the different mitochondrial respiration capacity and H_2O_2 production rate observed earlier between *D. simulans* haplogroup (Ballard et al, 2007; Katewa and Ballard, 2007a). Antioxidant system could also play an important role in controlling oxidized residues. Differences in catalase activities observed in this study (and possibly other non measured antioxidant pathways) could have minimized oxidative differences among lines: although more important catalase capacities (which could likely signify higher oxidative stress) were noted in *siIII** compared to *siIII* strain, oxidative damages were not different between these strains. It thus appears that differences in COX capacities are not sufficient to create different levels of oxidative damage among the strains

studied. In fact, different H₂O₂ production and antioxidant capacities between *siII* and *siIII* haplogroups observed earlier (Katewa and Ballard, 2007a; Katewa and Ballard, 2007b) are not translated in important differences of their mortality rates (Ballard et al, 2007). Nevertheless, MDA contents showed a tendency that oxidative damages were globally not equivalently managed in different strains. Indeed, higher MDA contents (but not significantly) in introgressed strains were not observed at the same ages in different mitochondrial haplotypes. This variation is also maintained when a single mitochondrial haplotype is exposed to different nuclear DNA, suggesting that oxidative damage management is also likely influenced by mitonuclear interactions rather than nuclear or mtDNA alone. However, since no significant difference were observed among strains used here, comparison of oxidative damages among different haplotypes and introgressed strains must be realized in numerous strains to confirm or infirm this tendency.

Temperature change crucially affects many aspects of metabolism: an increase in temperature usually causes enhanced respiration, oxygen consumption, metabolic rate and oxidative stress in ectotherms (Parihar and Dubey, 1995; Bagnyukova et al., 2003; Sollid et al., 2005; Heise et al., 2006). A shift to lower temperatures may also result in oxidative stress and may require enhanced antioxidant defenses. However, as ectotherms, *D. simulans* are supposed to be able to cope with the variable environmental conditions that they face. Here, only COX capacity of *siII* native strain varied according to temperature but neither catalase nor oxidized residues clearly adjusted with environmental temperature. The lack of clear response of metabolic enzymes and oxidative stress markers to thermal stress in both native strains suggests that, although possessing different mitochondrial haplotypes, thermal sensitivities of these two *D. simulans* native lines are equivalent. However, measurements of ROS production in different

thermal conditions are still needed to improve our understanding of the mechanisms responsible of ROS production and management as well as their translation into oxidized residues.

In conclusion, our results suggest that cytochrome *c* oxydase catalytic capacities are likely influenced by interactions between mitochondrial and nuclear DNA rather than mtDNA alone. Since there is slight intrahaplogroup metabolic differences in *D. simulans* (Ballard et al, 2007), backcrossing procedure should be undertaken in numerous strains in order to confirm observations of this study. Also, although *D. simulans* present important structural mitochondrial DNA differences among haplogroups, no clear metabolic (except for COX capacities) and oxidative stress status difference was observed among pure and introgressed strains exposed to different thermal regimes suggesting a strong conservatism of mitochondrial functions between strains studied. Future research should focused on ROS production and their translation into oxidized residues in different thermal regimes in order to improve our understanding of oxidative stress management among stenothermal *D. simulans* haplogroups.

2.7 Acknowledgments

We thank S. Breton, R. Vergilino and S. Lamarre for helpful comments on experimental procedures. This study was supported by research grants from the National Sciences and Engineering Research Council (NSERC) to P.U. Blier. Étienne Hébert Chatelain was financially supported by a scholarship from Université du Québec à Rimouski Foundation.

3. CHAPITRE 3

3.1 CONCLUSION GÉNÉRALE

Premièrement, la diversité mitochondriale inter-haplogroupe nous permet de déterminer l'influence de la variabilité de l'ADNmt sur le métabolisme et la gestion du stress oxydant durant le vieillissement chez *D. simulans*. Dans un premier temps, les différences structurales de l'ADNmt entre les deux lignées originales utilisées (c'est-à-dire *siII* et *siIII*) n'occasionnent des différences significatives que dans les capacités enzymatiques du complexe IV. Ces résultats semblent suggérer que les différences de respiration mitochondriale (stade 3 et 4) observée préalablement (Katewa et Ballard, 2007a) ne sont expliquées que par les différentes capacités de la cytochrome *c* oxydase. Un séquençage complet des différentes lignées utilisées dans cette étude pourrait permettre de pointer précisément les substitutions non synonymes responsables de ces différences (voir plus bas).

Cependant, la cause de ces dissemblances métaboliques reste inconnue car les différentes sous-unités de la chaîne de transport des électrons sont codées par l'ADN nucléaire ou l'ADNmt: ces différences pourraient être causées soit par (1) l'ADN nucléaire codant pour des protéines qui seront intégrées dans la mitochondrie, (2) l'ADNmt codant pour les sous-unités de la chaîne de transport des électrons ou encore, (3) les interactions entre les sous-unités codées par l'ADN nucléaire et l'ADNmt (les interactions mitonucléaires). Afin de mieux comprendre l'influence de la variabilité de l'ADNmt, l'origine des différences métaboliques doit être clairement établie. Tout d'abord, nos résultats paraissent éliminer une influence strictement nucléaire car aucune des enzymes mitochondriales, mesurées ici, entièrement codées par l'ADN nucléaire (c'est-à-dire la

citrate synthase et l'aconitase) ne présentent de différence entre les lignées. Plusieurs études ont démontré que les haplogroupes *siII* et *siIII* présentaient des différences de fitness mais aussi au niveau du métabolisme mitochondrial, c'est-à-dire la respiration mitochondriale, les activités de la cytochrome *c* oxydase (corroborés par les résultats de la présente étude) et de l'ATPase, les contenus en cytochrome *c* et les niveaux de fuite de protons (Katewa et Ballard, 2007a; Katewa et Ballard, 2007b). Ces résultats semblent appuyer une influence mitochondriale sans toutefois pouvoir discriminer l'influence strictement mitochondriale de l'influence mitonucléaire. Cette étude est la première à tenter de déterminer précisément l'origine de ces dissimilitudes.

La procédure de rétrocroisement permet de briser les interactions entre les deux génomes: en croisant des femelles avec des mâles d'un haplotype différent, on obtient une progéniture qui possède l'ADNmt maternel mais avec un ADN nucléaire provenant des deux parents. Ainsi, en réalisant cette procédure d'introgession sur plusieurs générations, il est théoriquement possible d'obtenir une lignée possédant, par exemple, l'ADNmt de *siII* avec l'ADN nucléaire de *siIII* (Dermitzakis *et al*, 2000). Advenant que les propriétés mitochondriales (ici, au niveau de la cytochrome *c* oxydase) soit maintenues chez les lignées introgressées, on pourrait conclure que les différences métaboliques seraient dues à l'influence de l'ADNmt seulement. À l'inverse, si ces propriétés ne sont pas maintenues après introgression d'un nouvel haplotype mitochondrial, on pourrait en conclure que les interactions mitonucléaires sont davantage responsables des propriétés observées. On observe donc un effondrement des capacités de la cytochrome *c* oxydase chez la lignée introgressée *siII** (par rapport à la lignée *siII* originale) et chez *siIII** (par rapport à *siIII*) à 18°C à l'âge de 15 jours. Ceci pourrait suggérer que cet effondrement est dû à l'ADN nucléaire. Or, lorsqu'on compare les haplotypes mitochondriaux dans un même environnement nucléaire (c'est-à-dire en comparant *siII* avec *siIII** et *siIII* avec *siII**), on observe

aussi des différences de capacités au niveau de la COX. Ces résultats suggèrent donc que les différences métaboliques interhaplogroupes (la capacité du complexe IV) observées dans cette étude seraient davantage dues à l'influence des interactions mitonucléaires. De plus, une étude récente a mesuré la variation des gènes (mitochondriaux et nucléaires) codant pour les sous unités de la COX dans les différents haplogroupes de *D. simulans* (Melvin *et al*, 2008). Cette étude a noté des mutations d'acide aminé non synonymes chez les groupes *siII* mais non chez *siIII*. De plus, la plupart des mutations présentes chez *siII* se présentaient sur des acides aminés situés près des sites de contact. Il semble donc que ces mutations aient entraîné un accroissement de la capacité de la COX dans la lignée pure *siII* étudiée ici. Bien qu'il existe une importante variabilité intra-groupe au niveau des capacités du complexe IV, ces dernières sont globalement plus élevées dans le groupe *siIII* (Ballard *et al*, 2007). Ces résultats combinés semblent aussi démontrer l'importance des interactions mitonucléaires dans l'établissement des capacités de la COX dans les différentes lignées de *D. simulans*.

La capacité du complexe IV est reconnue comme inversement corrélée à la production de H₂O₂ (Ferguson *et al*, 2005, Katewa et Ballard, 2007b). D'ailleurs, la diminution de l'activité de la cytochrome *c* oxidase généralement observée (Morel *et al*, 1995; Ferguson *et al*, 2005; Dubessay *et al*, 2007) est suivie d'une augmentation de la production de H₂O₂ chez les drosophiles (Sohal *et al*, 1995; Bayne *et al*, 2005). Ici, la diminution des capacités du complexe IV n'a été observée que chez *siIII* à 28 °C alors qu'une augmentation de la production des ROS n'a été notée, préalablement, que dans cet haplotype (Katewa et Ballard, 2007b). Cependant, aucune différence au niveau des dommages oxydants entre les lignées, ou entre les groupes d'âge, n'a été observée dans cette étude. Les différences structurales de l'ADNmt et des capacités de la cytochrome *c* oxydase ne semblent donc pas suffisantes pour occasionner des différences

dans les dommages oxydants au niveau de l'individu (basé sur des homogénats de mouches entières).

Étant donné qu'il existe de légères différences métaboliques entre les lignées d'un même haplogroupe (Ballard *et al*, 2007), il serait important de répéter la procédure d'introgession chez de multiples représentants de chaque haplotype afin de confirmer les conclusions de la présente étude. De même, la mesure des capacités catalytiques de tous les complexes du système de transport des électrons sur des mitochondries isolées pourrait permettre de confirmer les résultats obtenus ici et de mieux comprendre l'impact de la disruption des interactions mitonucléaires, chez les différents haplogroupes de *D. simulans*, sur le métabolisme et la gestion du stress oxydant. D'ailleurs, il serait important de mesurer les dommages oxydants sur des mitochondries isolées afin de vérifier si une production différentielle de ROS au niveau de la mitochondrie se traduit par des différences au niveau des dommages oxydants dans la mitochondrie car elle ne semble pas l'être au niveau de l'individu.

Ce travail a aussi permis d'étudier l'effet du régime thermique sur le métabolisme et la gestion du stress oxydant chez différents haplogroupes de *D. simulans*. On peut supposer que chez les ectothermes, les différentes lignées sont aptes à répondre aux fluctuations thermiques et donc, que la température a peu d'effet sur leur capacités métaboliques. Excepté pour les capacités de la cytochrome *c* oxydase qui variaient en fonction de la température chez la lignée *siII* (mais seulement à l'âge de 10 jours), les différentes enzymes (métaboliques et antioxydante) et biomarqueurs du stress oxydant ne démontraient pas de nette augmentation ou diminution lorsque la température s'éloigne du régime thermique optimal. Ces résultats vont à l'encontre de l'observation générale d'une augmentation de la respiration, des taux métaboliques, des niveaux de stress oxydant (augmentation de la production de ROS, des résidus oxydés) et des capacités

antioxydantes (pour répondre au stress oxydant plus élevé) lorsqu'on s'éloigne de l'optimum thermique (Parihar et Dubey, 1995; Bagnyukova *et al*, 2005; Sollid *et al*, 2005; Heise *et al*, 2006). Toutefois, les propriétés catalytiques sont habituellement fortement conservées lorsqu'on les mesure à la température physiologique optimale (ici, toutes les mesures ont été effectuées à 24°C) de l'ectotherme même si celles-ci peuvent présenter d'importants changements lorsqu'exposées à des changements thermiques *in vitro*. Nos résultats semblent donc suggérer que les différentes lignées étudiées, même si elles possèdent différents haplotypes mitochondriaux, possèdent les mêmes sensibilités thermiques. Il serait important de mesurer les capacités catalytiques des enzymes mitochondriales et la gestion du stress oxydant sur des mitochondries isolées et des homogénats de mouches entières exposés à des changements de température *in vitro* afin de confirmer les sensibilités thermiques de chaque haplotype. De plus, étant donné que les deux lignées originales étudiées ici proviennent toutes deux de la même région (*ie* le Kenya), il serait essentiel de comparer les sensibilités thermiques entre des lignées de différentes régions et, ensuite, advenant une confirmation de l'absence de différence des sensibilités thermiques entre les haplogroupes, on ne pourrait que conclure que la distribution non aléatoire des haplogroupes de *D. simulans* est peu expliquée par les capacités métaboliques mais plutôt par certains traits d'histoire de vie (tels que, par exemple, la capacité de jeûne et la vitesse de développement des œufs) qui diffèrent entre les haplogroupes (Ballard *et al*, 2007).

En conclusion, les résultats démontrent que les différences au niveau de l'ADNmt entre les lignées originales *siII* et *siIII* utilisées n'occasionnent que des différences au niveau des capacités du complexe IV (cytochrome *c* oxydase) de la chaîne de transport des électrons et n'engendrent pas de différence au niveau de la gestion du stress oxydant (plus spécialement, au niveau des résidus oxydés des protéines et des lipides) entre les lignées étudiées. Étant donné que

l'importante activité du complexe IV, présente dans la lignée originale *siII*, ne se retrouve pas chez les lignées introgressées, les propriétés catalytiques de celle-ci semblent donc dues aux interactions entre le génome mitochondrial et le génome nucléaire; leur combinaison semblant davantage optimale (pour cette enzyme) dans la lignée *siII* étudiée. De récents résultats de notre laboratoire démontrent une absence d'excès de capacité enzymatique du complexe IV (Pichaud *et al*, manuscrit en préparation), à l'inverse de plusieurs autres espèces (Rossignol *et al*, 1999; Blier et Lemieux, 2001). Ainsi, les capacités de la cytochrome *c* oxydase, généralement considérée comme l'étape limitante du système de transport des électrons (Ferguson *et al*, 2005), pourraient être responsables des différences observées au niveau de la respiration mitochondriale entre les haplogroupes de *D. simulans* (Katewa et Ballard, 2007a; Katewa et Ballard, 2007b; Ballard et al, 2007). Les présents résultats devront être confirmés par une étude utilisant davantage de lignées en comparant non seulement les haplogroupes, mais aussi les différentes lignées d'un même haplogroupe et leur équivalent introgressé, dans le but d'améliorer notre compréhension de la gestion du métabolisme mitochondrial et du stress oxydant chez *D. simulans*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abele, D., K. Heise, H. O. Pörtner et S. Puntarulo (2002). Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. **J. Exp. Biol.**, 205, 1831-1841.
- Agarwal, S. et R. S. Sohal. (1994). DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies. **PNAS**, 91, 12332-12335.
- Bagnyukova, T. V., K. B. Storey et V. I. Lushchak (2005). Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. **Comp. Biochem. Physiol. Part B**, 142, 335-341.
- Balaban, R. S., S. Nemoto et T. Finkel (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. **Cell**, vol., 120, 483-495.
- Ballard, J. W. O. (2000). Comparative genomics of mitochondrial DNA in members of the *Drosophila melanogaster* subgroup. **J. Mol. Evol.**, 51, 48-63.
- Ballard, J. W. O. (2004). Sequential Evolution of a Symbiont Inferred From the Host: *Wolbachia* and *Drosophila simulans*. **Mol. Biol. Evol.**, 21, 428-442.
- Ballard, J. W. O. (2005). *Drosophila simulans* as a novel model for studying mitochondrial metabolism and aging. **Exp. Geront.**, 40, 763-773.
- Ballard, J. W. O. et M. Kreitman (1994). Unraveling selection in the mitochondrial genome of *Drosophila*. **Genetics**, 138, 757-772.
- Ballard, J. W. O., R. G. Melvin, S. D. Katewa et K. Maas (2007). Mitochondrial DNA variation is associated with measurable differences in life-history traits and mitochondrial metabolism in *Drosophila simulans*. **Evolution**, 61, 1735-1747.
- Barata, C., J. C. Navarro, I. Varob, M. C. Rivaa, S. Arunc et C. Porte (2005). Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in *Daphnia magna* during the aging process. **Comp. Biochem. Physiol. Part B**, 140, 81-90.
- Barja, G. (1998). Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. **Ann. New York Acad. Sc.**, 854, 224-231.
- Barja, G. et A. Herrero (2000). Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. **FASEB J.**, 14, 312-318.
- Bayne, A.-C., R. J. Mockett, W. C. Orr et R. S. Sohal (2005). Enhanced catabolism of mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide and aging in transgenic *Drosophila*. **Biochem. J.**, 391, 277-284.

- Baynes, J. W. (2002). The Maillard Hypothesis on Aging: Time to Focus on DNA. **Ann. New York Acad. Sci.**, 959, 360-367.
- Beckman, K. B. et B. N. Ames. (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. **Physiol. Rev.**, 78, 548-571.
- Bell, C., P. P. Jones et D. R. Seals (2003). Oxidative stress does not modulate metabolic rate with primary aging humans. **J. Clin. End. Met.**, 88, 4950–4954.
- Benedicitiis, G., G. Rose, G. Carrieri, M. de Luca, E. Falcone, G. Passarino, M. Bonafe, D. Mont, G. Baggio, S. Bertolini, D. Mari, R. Mattace et C. Franchesi (1999). Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. **FASEB J.**, 13, 1532-1536
- Berrigan, D. (1997). Acclimation of metabolic rate in response to developmental temperature in *Drosophila melanogaster*. **J. Therm. Biol.**, 22, 213-218.
- Berrigan, D. et L. Partridge. (1997). Influence of temperature and activity on the metabolic rate of adult *Drosophila melanogaster*. **Comp. Biochem. Physiol. Part A.**, 118, 1301-1307.
- Best-Belpomme, M. et M. Ropp. (1982). Catalase is induced by edysterone and ethanol in drosophila cells. **Eur. J. Biochem.**, 121, 349-355.
- Blier, P. U., F. Dufresne et R. S. Burton. (2001). Natural selection and the evolution of mtDNA encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. **Trends Gen.**, 17, 400-407.
- Blier, P. U. et H. E. Guderley (1993). Mitochondrial activity in rainbow trout red muscle: the effect of temperature on the ADP dependence of ATP synthesis. **J. Exp. Biol.**, 176, 145-157.
- Blier, P. U., S. Breton, V. Desrosiers et H. Lemieux (2006). Fonctionnal conservatism in mitochondrial evolution : Insight from hybridization of Artic and Brook charrs. **J. Exp. Zool.**, 306B, 1-8.
- Blier, P. U. et H. Lemieux (2001). The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Artic charr red muscle mitochondria. **J. Comp. Physiol. Part B.**, 171, 247-253
- Bogenhagen, D. F. (1999). Repair of mtDNA in vertebrates. **Amer. J. Hum. Gen.**, 64, 1276-1281.
- Bokov, A., A. Chaudhurib et A. Richardson (2004). The role of oxidative damage and stress in aging. **Mech. Ageing Devel.**, 125, 811-826.
- Boveris, A. et E. Cadenas. (2000). Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. **IUBMB Life**, 50, 245-250.

- Brand, M. D., C. Affourtit, T. C. Esteves, K. Green, A. J. Lambert, S. Miwa, J. L. Pakay et N. Parker (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects and activation of uncoupling proteins. **Free Rad. Biol. & Med.**, 37, 755-767.
- Cadet, J., T. Douki, D. Gasparutto et J. L. Ravanat (2003). Oxidative damage to DNA : formation, measurement and biochemical features. **Mut. Res.**, 531, 5-23.
- Campbell, D. R. et N. M. Waser (2001). Genotype-by-environment interaction and the fitness of plant hybrids in the wild. **Evolution**, 55, 669–676.
- Chavous, D. A., R. Jackson et C. M. O'Connor (2001). Extension of the *Drosophila* lifespan by overexpression of a protein repair methyltransferase. **PNAS**, 98, 14814-14818.
- Chang, R. et L. Papillon (1998) **Chimie fondamentale**. Chenelière-McGraw Hill, Canada, 693 p.
- Chen, Q., E. J. Vazquez, S. Moghaddas, C. L. Hoppel et E. J. Lesnefsky (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. **J. Biol. Chem.**, 278, 36027–36031.
- Clark, A. G. et C. D. Fucito (1998). Stress tolerance and metabolic response to stress in *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, 81, 514-527.
- Criscuolo, F., M. Gonzalez-Barroso, F. Bouillaud, D. Ricquier, et B. M. Sorci (2005) Mitochondrial uncoupling proteins: new perspectives for evolutionary ecologists. **Am. Nat.**, 166, 686-699.
- Das, N., R. L. Levine, W. C. Orr et R. S. Sohal (2001). Selectivity of protein oxidative damage during aging in *Drosophila melanogaster*. **Biochem. J.**, 2001, 209-216.
- David, J. R. (1988). Temperature. Dans: Lints FH, Soliman MH (eds) **Drosophila as a model organism for ageing studies**, Blackie: London, pp. 33–45.
- Dean, M.D., K. J. Ballard, A. Glass et J. W. O. Ballard (2003). Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of east African *Drosophila simulans*. **Genetics**, 65, 1959–1969.
- Dermitzakis, E.T., J. P. Masly, H. M. Waldrip et A. G. Clark (2000). Non-Mendelian segregation of sex chromosomes in heterospecific *Drosophila* males. **Genetics**, 154, 687–694.
- de Stordeur, E., M. Solignac, M. Monnerot et J. C. Mounolou (1989). The generation of transplasmic *Drosophila simulans* by cytoplasmic injection: effects of segregation and selection on the perpetuation of mitochondrial DNA heteroplasmy. **Mol. Gen. Genet.**, 220, 127–132.
- Dowling, D. K., K. C. Abiega et G. Arnqvist (2007). Temperature-specific outcomes of cytoplasmic-nuclear interactions on egg-to-adult development time in seed beetles. **Evolution**, 61, 194-201.

- Drew, B. et C. Leeuwenburgh (2002). Aging and the role of reactive nitrogen species. **An. New York Acad. Sci.**, 959, 66-81.
- Dubessay, P., I. Garreau-Balandier, A.-S. Jarrousse, A. Fleuriet, B. Sion, R. Debise et S. Alziari (2007). Aging impact on biochemical activities and gene expression of *Drosophila melanogaster* mitochondria. **Biochimie**, 89, 988-1001.
- Dufour, E. et N.-G. Larsson. (2004). Understanding aging: revealing order out of chaos. **Biochem. Biophys. Acta**, 1658, 122-132.
- Ellisson, C. K. et R. S. Burton (2006). Disruption of mitochondrial function in interpopulation hybrids of *Tigriopus californicus*. **Evolution**, 7, 1382-1391.
- Ershler W. B. et D. L. Longo (1997). The biology of aging: the current research area. **Cancer**, 80, 1284-1293.
- Ferguson, M., R. J. Mockett, Y. Shen, W. C. Orr et R. S. Sohal (2005). Age-associated decline in mitochondrial respiration and electron transport in *Drosophila melanogaster*. **Biochem. J.**, 390, 501-511.
- Finkel, T. et N. J. Holbrook (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, 408, 239-247.
- Fontanillas, P., A. Dipraz, M. S. Giorgi et N. Perrin (2005). Nonshivering thermogenesis capacity associated to mitochondrial DNA haplotypes and gender in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, **Mol. Ecol.**, 14, 661-670.
- Galloway, L. F. et C. B. Fenster (1999). The effect of nuclear and cytoplasmic genes on fitness and local adaptation in an annual legume, *Chamaecrista fasciculata*. **Evolution**, 53, 1734-1743.
- Halliwell, B. et M. Whiteman (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Brit. J. Pharm.**, 142, 231-255.
- Heise, K., S. Puntarulo, M. Nikinmaa, D. Abele et H.-O. Pörtner (2006). Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. **J. Exp. Biol.**, 209, 353-363.
- Hercus, M. J. et A. A. Hoffmann (2000). Maternal and grandmaternal age influence offspring fitness in *Drosophila*. **Proc. R. Soc. London B**, 267, 2105-2110.
- Hochachka, P. W. et G. N. Somero (1984). **Biochemical adaptation**. Princeton University Press, USA, 458 p.
- Hodges, T. K. et R. T. Leonard (1974). Purification of a plasma membrane bound adenosine triphosphate from plant roots. **Meth. Enzym.**, 32, 392-406.

- James, A. C. et J. W. O. Ballard (2003). Mitochondrial genotype affects fitness in *Drosophila simulans* **Genetics**, 164, 187-194.
- James, A. C. et J. W. O. Ballard (2000). Expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and its impact on infection frequencies and distribution of *Wolbachia pipientis*. **Evolution**, 54, 1661–1672.
- Johnston, I. A., H. Guderley, C. E. Franklin, T. Crockford et C. Kamunde (1994). Are mitochondria subject to evolutionary temperature adaptation? **J. Exp. Biol.**, 195, 293-306.
- Katewa, S. D. et J. W. O. Ballard (2007a). Sympatric *Drosophila simulans* flies with distinct mtDNA show difference in mitochondrial respiration and electron transport. **Ins. Bioch. Mol. Biol.** 37, 213–222.
- Katewa, S. D. et J. W. O. Ballard (2007b). Sympatric *Drosophila simulans* flies with distinct mtDNA show age-related differences in mitochondrial metabolism. **Ins. Bioch. Mol. Biol.**, 37, 923-932.
- Kliman, R. M., P. Andolfatto, J. A. Coyne, F. Depaulis, M. Kreitman, A. J. Berry, J. McCarter, J. Wakeley et J. Hey (2000). The population genetics of the origin and divergence of the *Drosophila simulans* complex species. **Genetics**, 156, 1913-1931.
- Kudin, A. P., N. Y. Bimpong-Buta, S. Vielhaber, C. E. Elger et W. S. Kunz (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. **J. Biol. Chem.**, 279, 4127–4135.
- Kwong, L. K., R. J. Mockett, A.-C. V. Bayne, W. C. Orr et R. S. Sohal (2000). Decreased mitochondrial hydrogen peroxide release in transgenic *Drosophila melanogaster* expressing intramitochondrial catalase. **Arch. Bioch. Biophys.**, 383, 303-308.
- Lachaise, D., J. R. David, F. Lemeunier, L. Tsacas et M. Ashburner (1986). The reproductive relationships of *Drosophila sechellia* with *D. mauritiana*, *D. simulans*, and *D. melanogaster* from the Afrotropical region. **Evolution**, 40, 262-271.
- Landis, G. N. et J. Tower. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. **Mech. Ageing Dev.**, 126, 365-379.
- Lannig, G., L.G. Eckerle, I. Serendero, F.-J. Sartoris, T. Fischer, R. Knust, T. Johansen et H.-O. Pörtner (2003). Temperature adaptation in eurythermal cod (*Gadus morhua*): a comparison of mitochondrial enzyme capacities in boreal and Arctic populations. **Mar. Biol.**, 142, 589–599.
- Lambert, A. J. et M. D. Brand (2007). Research on mitochondria and aging, 2006-2007. **Ageing Cell**, 6, 417-420.
- Le Bourg, É. (2001). Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. **FEBS Letters**, 498, 183-186.

- Lenz, A. G., U. Costabel, S. Shaltiel et R. L. Levine (1989). Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. **Anal. Biochem.**, 177, 419-425.
- Lemeunier, F. et M. Ashburner (1984). Relationships within the *melanogaster* species subgroup of the genus *Drosophila* (*Sophophora*). **Chromosoma**, 89, 343-351.
- Lin, M. T. et F. Beal (2003). The oxidative damage theory of aging. **Clin. Neurosc. Res.**, 2, 305-315.
- Long, J., X. Wang, H. Gao, Z. Liu, C. Liu, M. Miao et J. Liu (2006). Malonaldehyde acts as a mitochondrial toxin: Inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in isolated rat liver mitochondria. **Life Sciences**, 79, 1466–1472.
- Luckinbill, L. S. et P. Foley (2000). Experimental and empirical approaches in the study of aging. **Biogerontology**, 1, 3-13.
- Mandavilli, B. S., J. H. Santos et B. Van Houten (2002). Mitochondrial DNA repair and aging **Mut. Res.**, 509, 127-151.
- Melvin, R. G., S. D. Katewa et J. W. O. Ballard (2008). A candidate complex approach to study functional mitochondrial DNA changes: sequence variation and quaternary structure modeling of *Drosophila simulans* cytochrome *c* oxydase. **J. Mol. Evol.**, 66, 232-242.
- Miwa, S., J. St-Pierre, L. Partridge et M. D. Brand (2003). Superoxide and hydrogen peroxide production by drosophila mitochondria. **Free Rad. Biol. & Med.**, 35, 938-948.
- Miwa, S. et M. D. Brand. (2003). Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. **Biochem. Soc. Trans.**, 31, 1300-1301.
- Miwa, S. et M. D. Brand. (2005). The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria. **Biochem. Biophys. Act.**, 1709, 214-219.
- Morel, F., F. Mazet, S. Touraille et S. Alziari (1995). Changes in the respiratory chain complexes activities and in the mitochondrial DNA content during ageing in *D. subobscura*, **Mech. Age. Devel.**, 84, 171-181.
- Navarro, A. et A. Boveris (2007). The mitochondrial energy transduction system and the aging process. **Am. J Physiol Cell Physiol.**, 292, 670-686.
- Nicholls, D. G. et S. J. Ferguson (2002). **Bioenergetics 3**. Academic Press, USA, 297 p.
- Nigro, L. (1994). Nuclear background affects frequency dynamics of mitochondrial DNA variants in *Drosophila simulans*. **Heredity**, 72, 582–586.

- Nusetti, O., E. Zapata-Vivenes, M. M. Esclapés et A. Rojas (2005). Antioxidant enzymes and tissue regeneration in *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae) exposed to used vehicle crankcase oil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 48, 509–514.
- Orr, W. C. et R. S. Sohal (1992). The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*. **Arch. Biochem. Biophys.**, 297, 35-41.
- Parihar, M.S. et A. K. Dubey (1995). Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. **Comp. Biochem. Physiol. C**, 112, 309–313.
- Pearl, R. (1928). **The rate of living**. University of London Press, London, 347p.
- Pörtner, H. O. (2001). Climate change and temperature dependent biogeography: Oxygen limitation of thermal tolerance in animals. **Nature**, 88, 137-148.
- Pörtner, H. O. (2002). Physiological basis of temperature dependent biogeography: trade-offs in muscle design and performance in polar ectotherms. **J. Exp. Biol.**, 205, 2217-2230.
- Rawson, P. D. et R. S. Burton (2002). Functional coadaptation between cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase within allopatric populations of a marine copepod. **PNAS**, 99, 12955–12958.
- Robinson, S. J. W. et L. Partridge (2001). Temperature and clinal variation in larval growth efficiency in *Drosophila melanogaster*. **J. Evol. Biol.**, 14, 14-21.
- Rossignol, R., M. Malgat, J.-P. Mazar et T. Letellier (1999). Threshold effect and tissue specificity. **J. Biol. Chem.**, 274, 33426-33432.
- Sackton, T. B., R. A. Haney et D. M. Rand (2003). Cytonuclear coadaptation in *Drosophila*: Disruption of cytochrome *c* oxidase activity in backcross genotypes. **Evolution**, 57, 2315-2325.
- Salganik, R. I., I. G. Shabalina, N. A. Solovyova, N. G. Kolosova, V. N. Solovyov et A. R. Kolpakov (1994). Impairments of respiratory functions in mitochondria of rats with an inherited hyperproduction of free radicals. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 205, 180-185.
- Samokhvalov, V., V. Ignatov et M. Kondrashova (2004). Inhibition of Krebs cycle and activation of glyoxylate cycle in the course of chronological aging of *Saccharomyces cerevisiae*: Compensatory role of succinate oxidation. **Biochimie**, 86, 39–46.
- Sastre, J., F. V. Pallardo et J. Vina (2000). Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. **IUBMB Life**, 49, 427-435.
- Sedensky, M. M. et P. G. Morgan (2006). Mitochondrial respiration and radical oxygen species in *C. elegans*. **Exp. Geront.**, 41, 957-967.

- Sies, H. (1991). Oxidative stress: Introduction. Dans Sies, H. (Ed.), **Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants**. Academic Press, USA, 345p.
- Smeitink, J., L. Van den Heuvel et S. DiMauro (2001). The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. **Nat. Rev. Genet.**, 2, 342–352.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson et M. D. Klenk (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Ann. Biochem.**, 150, 76-85.
- Sohal, R. S., B. H. Sohal et W. C. Orr (1995). Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage and longevity in different species of flies. **Free Rad. Biol. & Med.**, 19, 499-504.
- Sohal, R. S. et W. C. Orr (1992). Relationship between antioxidants, prooxidants and the aging process. **Ann. New York Acad. Sci.**, 663, 74–84.
- Sohal, R. S., K. J. Farmer, R. G. Allen et N. R. Cohen (1984). Effect of age on oxygen consumption, superoxide dismutase, catalase, glutathione, inorganic peroxides and chloroform-soluble antioxidants in the adult male housefly, *Musca domestica*. **Mech. Ageing Dev.**, 16, 159–167.
- Sohal, R. S., L. Arnold et W. C. Orr (1990). Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP/ and NADH/NAD in *Drosophila melanogaster*. **Mech. Ageing Dev.**, 56, 223–235.
- Sohal, R. S., S. Agarwal, A. Dubey et W. C. Orr (1993). Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. **PNAS**, 90, 7255-7259.
- Sollid, J., R. E. Weber et G. Nilsson (2005). Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*. **J. Exp. Biol.**, 208, 1109–1116.
- Solomons, G. et C. Fryhle (2000). **Chimie organique**. Modulo, Canada, 1151 p.
- Speakman, J. R. (2005). Body size, energy metabolism and lifespan. **J. Exp. Biol.**, 208, 1717-1730.
- Sun, J., D. Folk, T. J. Bradley et J. Tower (2002). Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 161, 661-672.
- Thibeault, M., P. U. Blier et H. Guderley (1997). Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physio. Biochem.**, 16, 139-155.
- Van Voorhies, W. A. (2001). Metabolism and lifespan. **Exp. Geront.**, 36, 55-64.

- Van Voorhies, W. A. (2002). Metabolism and aging in the nematode *caenorbitis elegans*. **Free Rad. Biol. & Med.**, 33, 587–596.
- Van Voorhies, W. A., A. A. Khazaeli et J. W. Curtsinger (2003). Selected Contribution: Long-lived *Drosophila melanogaster* lines exhibit normal metabolic rates. **J. Appl. Physiol.**, 95, 2605–2613.
- Van Voorhies, W. A., A. A. Khazaeli et J. W. Curtsinger (2004). Testing the "rate of living" model: further evidence that longevity and metabolic rate are not inversely correlated in *Drosophila melanogaster*. **J. Appl. Physiol.**, 97, 1915–1922.
- Wei, Y.-H., C.-Y. Lu, H.-C. Lee, C.-Y. Pang et Y.-S. Ma (1998). Mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. **Ann. N. Y. Acad. Sc.**, 854, 155-170.
- Turrens, J. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J. Physiol.**, 552, 335-344.
- Weinert, B. T. et P. S. Timiras (2003). Physiology of aging. **J. Appl. Physiol.**, 95, 1706–1716.
- Yan, L.-J., R. Levine et R. S. Sohal (1997). Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. **PNAS**, 94, 11168-11172.
- Yan, L.-J. et Sohal, R. S. (1998). Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. **PNAS**, 95, 12896-12901.
- Yarian, C. S., D. Toroser et R. S. Sohal (2006). Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice. **Mech. Age. Devel.**, 127, 79–84.
- Yui, R., Y. Ohno et E. T. Matsuura (2003). Accumulation of deleted mitochondrial DNA in aging *Drosophila melanogaster*. **Genes Genet. Syst.**, 78, 245-251.