



HAL
open science

Coûts et bénéfices énergétiques chez les mammifères hibernants : application à l'exemple du grand hamster d'Alsace (*Cricetus cricetus*)

Camille Marie-Jean-Robert Jot

► To cite this version:

Camille Marie-Jean-Robert Jot. Coûts et bénéfices énergétiques chez les mammifères hibernants : application à l'exemple du grand hamster d'Alsace (*Cricetus cricetus*). Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04155372

HAL Id: dumas-04155372

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04155372v1>

Submitted on 7 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

Année 2023

**COÛTS ET BÉNÉFICES ÉNERGÉTIQUES CHEZ LES
MAMMIFÈRES HIBERNANTS : APPLICATION À
L'EXEMPLE DU GRAND HAMSTER D'ALSACE
(*Cricetus cricetus*)**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 13 avril 2023

par

Camille MARIE-JEAN-ROBERT JOT

sous la direction de

Caroline GILBERT

JURY

Présidente du jury :	Mme Fanny PILOT-STORCK	Professeure à l'ENVA
Directrice de thèse :	Mme Caroline GILBERT	Professeure à l'ENVA
Examinatrice :	Mme Guillemette CRÉPEAUX	Maître de Conférences à l'ENVA

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



version janvier 2023

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Amé	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Benckroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Aline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guétin-Poitier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagré	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Maufré	Vincent	Maître de conférences	DPASP
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC

Remerciements

Au Professeur Fanny Pilot-Storck, Présidente du Jury de cette thèse, Professeur à l'EnvA,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,
Hommage respectueux.

Au Professeur Caroline Gilbert, Professeur à l'EnvA,

Pour m'avoir guidée sur ce projet, pour son temps passé et sa pédagogie ainsi que sa patience tout au long de ce travail,
Sincères remerciements.

Au Docteur Guillemette Crépeaux, Maître de conférences à l'EnvA,

Pour avoir accepté d'être mon examinatrice et m'avoir gentiment rassurée dans les moments de doute et de fatigue,
Sincères remerciements.

A l'équipe du DEPE à l'IPHC de Strasbourg,

J'adresse mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de mon stage, en commençant par ma maître de stage **Caroline HABOLD**, Chercheuse à la tête du Département Ecologie, Physiologie et Ethologie (DEPE) de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC). Je la remercie pour son accueil dans son laboratoire, ses conseils et sa patience. Parmi les encadrants, je remercie aussi **Audrey BERGOUIGNAN**, **André ANCEL**, **Sylvain GIROUD** (Université Vétérinaire de Vienne) ainsi que **Laura CHARLANNE** pour sa sympathie, son encadrement et surtout les heures passées devant l'Oroboros ou à faire des statistiques sur R. De plus, je remercie toute l'équipe du DEPE qui a toujours été ouverte et accueillante, notamment **Alexandre ZAHARIEV** et **Astolfo MATA** pour leur aide et leurs connaissances en calorimétrie, **Isabelle CHERY** pour m'avoir aidée avec les substrats de la machine Oroboros, **Hélène GACHOT-NEVEU**, **David BOCK** et **Aurélié HRANITZKY** pour leur aide à l'animalerie avec les hamsters. J'adresse mes remerciements aux doctorants du DEPE qui m'ont aidée pour le mémoire ou en laboratoire : **Théo CONSTANT**, **Nicolas JOLY**, **Hugo CHIGNEC**. Enfin, un grand merci à mes ami.e.s stagiaires de l'aquarium pour leur gentillesse et leurs sourires.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des figures	3
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations	7
Introduction	9
Première partie : étude bibliographique	11
1. La torpeur	11
A. Endothermie et hétérothermie.....	11
B. Définitions de la torpeur journalière et de l'hibernation.....	12
C. La torpeur au sein du règne animal et son évolution	14
D. Contrôle du cycle annuel et déclenchement de la torpeur.....	14
E. Les périodes inter-torpeurs	16
F. Les avantages énergétiques de la torpeur face aux coûts	16
2. Les stratégies d'accumulation de réserves et leurs adaptations métaboliques.....	17
A. Les espèces « fat-storing » et « food-storing »	17
B. Métabolisme des lipides et des glucides en torpeur selon la stratégie de stockage	19
C. Physiologie de la digestion en hibernation	22
3. La mitochondrie	22
A. Généralités	22
B. Mesure de la respiration par l'oxymétrie de flux	26
C. Respiration mitochondriale et stress oxydant en torpeur.....	30
Deuxième partie : étude expérimentale	33
1. Introduction.....	33
2. Matériels et méthodes.....	35
A. Animaux et échantillonnage.....	35
B. Calorimétrie indirecte	38
C. Respiration mitochondriale : oxymétrie de flux et quantité d'ADN mitochondrial .	40
D. Mesure de la longueur des télomères	44
E. Dosages ROM-OXY	44
F. Analyses statistiques	44
3. Résultats.....	46
A. Calorimétrie indirecte	46
B. Masse corporelle et glycémie.....	46
C. Respiration mitochondriale : oxymétrie de flux et quantité d'ADN mitochondrial .	48

D.	Longueur relative des télomères.....	50
E.	Dosages ROM-OXY	51
4.	Discussion	53
A.	Des résultats inattendus	53
B.	Des différences d'état métabolique (masse et glycémie) entre les groupes, cohérentes avec les données sur la torpeur.....	54
C.	Une diminution du stade 3 dans les mitochondries du foie en torpeur sans perte d'efficacité	55
D.	Les mitochondries du muscle squelettique en torpeur sont plus efficaces mais causeraient plus de dommages oxydatifs	57
E.	Perspectives.....	58
	Conclusion.....	61
	Liste des références bibliographiques	63

Liste des figures

Figure 1 : Enregistrement d'un épisode de torpeur d'une marmotte Alpine (<i>Marmota marmota</i>) (Heldmaier <i>et al.</i> , 2004).....	13
Figure 2 : Changements de masse corporelle et physiologie d'utilisation des substrats énergétiques au cours de l'hibernation entre une espèce « fat-storing » (la marmotte à ventre jaune en A) et « food-storing » (le hamster, ici syrien, en B) (Giroud & Habold <i>et al.</i> , 2021).....	20
Figure 3 : Schéma légendé de la chaîne respiratoire dans la membrane de la mitochondrie (thèse de Mélanie Boël, 2020).....	23
Figure 4 : Photographie et schéma en coupe de l'OROBOROS Oxygraph-2k (© Oroboros Instruments GmbH).....	28
Figure 5 : Schéma bilan des données de la bibliographie sur les mécanismes du métabolisme mitochondrial des espèces « fat-storing » et représentation de nos hypothèses de travail chez les espèces « food-storing ».....	34
Figure 6 : Photographie montrant un hamster d'Europe en position de torpeur. Crédit photo : Caroline Habold.....	36
Figure 7 : Frise chronologique des expériences de l'étude avec leurs échantillons respectifs	37
Figure 8 : Photographies de la salle de calorimétrie à ambiance réglable avec les cinq cages vides et les cinq voies de mesures (en haut) et la salle d'acquisition avec ordinateurs et analyseurs à gaz (en bas). Crédit photo : Alexandre Zahariev.....	39
Figure 9 : Exemple de sélection des plateaux du flux d'O ₂ par masse sur le graphique DatLab pour la chambre A, ici pour un échantillon de muscle du hamster 20.576.5 en torpeur.....	42
Figure 10 : Evolution de $\dot{V}O_2$ et $\dot{V}CO_2$ d'un hamster hibernant en cage de calorimétrie en fonction du temps.....	46
Figure 11 : Effet du stade physiologique sur la masse corporelle au moment du prélèvement.....	47
Figure 12 : Effet du stade physiologique sur la glycémie.....	48
Figure 13 : Effet du stade physiologique et de l'organe sur l'indicateur LEAK/ETS des mitochondries.....	49
Figure 14 : Effet du stade physiologique et de l'organe sur l'indicateur RCR des mitochondries.....	50
Figure 15 : Effet du stade physiologique et de l'organe sur la longueur relative des télomères.....	51

Figure 16 : Effet du stade physiologique sur la quantité de déchets ROMS trouvée dans le sérum.....	52
Figure 17 : Effet du stade physiologique sur la quantité de défenses antioxydantes OXY trouvée dans le sérum.....	52
Figure 18 : Schéma bilan des mécanismes observés chez les hamsters d'Europe lors des mesures.....	54

Liste des tableaux

Tableau 1 : Substrats énergétiques et inhibiteurs ajoutés dans chacune des chambres de l'Oroboros dans l'ordre d'injection.....	41
Tableau 2 : Tableau des modèles linéaires pour les facteurs de la densité de mitochondries dans les échantillons de tissus.....	48
Tableau 3 : Tableau des modèles linéaires pour les facteurs de LEAK/ETS.....	49
Tableau 4 : Tableau des modèles linéaires pour les facteurs de RCR.....	50
Tableau 5 : Tableau des modèles linéaires pour les facteurs de la longueur relative des télomères.....	51

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

ATP : adénosine triphosphate

BM ou BW : *body mass* ou *body weight*

CHO : hydrates de carbone aussi appelés glucides (Carbone Hydrogène Oxygène)

Df : degré de liberté (*degree of freedom*)

DM : densité mitochondriale

EPO : érythropoïétine

ETS : *electron transport system*

FADH₂/FADH : flavine adénine dinucléotide réduit/oxydé – aussi appelés : FADH₂ : succinate et FAD⁺ : fumarate

FCCP : p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazine

H⁺ : protons

H₂O : eau

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

KCl : chlorure de potassium

mPTP : *mitochondrial permeability transition pore*

NADH/NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide réduit/oxydé

OXPPOS : *oxydative phosphorylation*

OXY : défenses antioxydantes

POS : *polarographic oxygen sensor*

qPCR : PCR quantitative (*quantitative polymerase chain reaction*)

QR : quotient respiratoire

RCR : *respiratory control ratio*

ROM : *reactive oxygen metabolites*

ROS : *reactive oxygen species*

ROX : *residual oxygen consumption*

SOD : *superoxide dismutase*

UCP : *uncoupling protein*

$\dot{V}O_2$ et $\dot{V}CO_2$: volume d'O₂ ou de CO₂ qu'un organisme consomme/rejette par unité de temps

Introduction

Afin de survivre aux variations de l'environnement selon les saisons, les organismes ont été sélectionnés au cours de l'évolution et présentent trois stratégies principales qui peuvent être combinées : quitter les conditions désavantageuses d'une saison en migrant ou bien rester sur place soit en restant actif et en ayant de quoi subsister (par des réserves de nourriture ou de masse graisseuse) soit en économisant l'énergie, avec des réserves, durant la saison : c'est l'hibernation (lors de l'hiver ; autrement, il s'agit de l'estivation) (pour revue, voir Auteri, 2022). Pour économiser l'énergie, les espèces hibernantes entrent en torpeur, un état où elles abaissent leur température corporelle, leur activité physique et leur métabolisme. Cette capacité à pouvoir maintenir sa température corporelle à une valeur puis une autre beaucoup plus basse suite à une dépression métabolique induite s'appelle l'hétérothermie temporelle. La torpeur peut aussi être journalière (moins de 24 heures) mais c'est la torpeur saisonnière qui nous intéresse avec l'hibernation. En effet, durant tout l'hiver, l'animal alterne entre 1/ l'état de torpeur pendant plusieurs jours (la durée variant selon l'espèce) et 2/ des phases inter-torpeur où la température redevient élevée autour d'une valeur considérée comme « normale » pour l'espèce : c'est l'euthermie (Helmaier, 2004). Ces retours réguliers à l'euthermie sont coûteux en énergie mais permettent de restaurer certaines fonctions vitales n'ayant pas lieu pendant la torpeur (activation du système immunitaire, sommeil, ...) (pour revue, voir Giroud *et al.*, 2021). Malgré ces périodes inter-torpeurs, la stratégie de l'hibernation en vaut la peine puisqu'elle permet une économie d'énergie, comparée au passage de la saison en restant en euthermie, et elle permet une durée de vie plus longue, comparée à des espèces similaires ou proches qui n'hibernent pas. Par exemple, les animaux hibernants ont une survie annuelle supérieure d'environ 15 % à celle des espèces non hibernantes de taille similaire et c'est encore plus parlant chez les petits animaux de moins d'1,5 kg : ils ont une durée de vie maximale plus élevée, se reproduisent plus lentement, arrivent à maturité à un âge plus avancé et ont des durées de génération plus longues que les non-hibernants de même gabarit (Turbill *et al.*, 2011). L'hibernation ne doit pas être confondue avec le repos hivernal où la température ne diminue que de quelques degrés et où l'animal reste actif (c'est le cas des ours ; Cristinelli, 2006).

Pour se préparer à l'hibernation, la majorité des animaux accumule des réserves de tissu adipeux blanc en étant hyperphagique à la belle saison, quelques semaines avant d'entrer en torpeur. Ces réserves sont ensuite mobilisées en hibernation par lipolyse lors des torpeurs. Ces espèces sont dites « fat-storing » et sont les hibernants les plus étudiés, notamment la famille des *Sciuridae* avec les spermophiles (*Spermophilus spp.*, *Urocyon*)

spp.) ou encore des marmottes (*Marmota spp.*). En effet, c'est à partir de ces espèces que la respiration mitochondriale en hibernation a été la plus étudiée. La respiration de la mitochondrie en torpeur diffère de la belle saison, notamment par des cascades de modifications post-transcriptionnelles. Chez ces espèces hibernantes, la consommation d'O₂ peut chuter de plus de 90 %. Enfin, la chaîne respiratoire de la mitochondrie produit en permanence des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS participent au fonctionnement normal de la mitochondrie mais produites en trop grande quantité, elles vont causer des dommages oxydatifs sur d'autres molécules : lipides, protéines et ADN (pour revue, voir Staples, 2022).

Il existe aussi une minorité d'espèces hibernantes, qui elles, emmagasinent des réserves de nourriture qu'elles vont ensuite consommer tout au long de leur hibernation, lors de leurs périodes inter-torpeurs. Ces espèces sont les « food-storing », moins étudiées car moins nombreuses. Elles constituent un sujet de plus en plus étudié car leur capacité à manger et digérer pendant l'hibernation impose une physiologie et une respiration mitochondriale assez différentes des autres hibernants. Le hamster d'Europe ou grand hamster d'Alsace (*Cricetus cricetus*), un rongeur solitaire nocturne protégé, reproducteur saisonnier de jours longs, fait partie de ces espèces. Il hiberne d'octobre-novembre à février-mars et peut présenter des phases de torpeur de plusieurs jours (Tissier et Habold, 2017 ; pour revue voir Giroud *et al.*, 2021).

Cette thèse a pour objectif d'étudier la respiration des mitochondries du hamster d'Europe ainsi que le niveau de stress oxydant associé à cette respiration, et ce, dans un muscle squelettique et le foie.

Dans une première partie bibliographique, je présenterai la torpeur et la respiration mitochondriale en torpeur.

Dans une seconde partie, je présenterai mes travaux sur la torpeur du hamster d'Europe dans le cadre de mon stage de Master 2 Ecophysiologie, écologie, éthologie de l'Université de Strasbourg au Département Ecologie, Physiologie et Ethologie (DEPE) de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), encadré par Caroline Habold, Laura Charlanne, Audrey Bergouignan, André Ancel.

Première partie : étude bibliographique

Cette étude bibliographique s'attachera à présenter, de l'organisme à la cellule :

- Les connaissances actuelles générales sur la torpeur, plus particulièrement en hibernation, de son évolution à sa physiologie en passant par ses déclencheurs ;
- Les deux groupes d'espèces hibernantes selon leur stratégie d'accumulation de réserves ainsi que le métabolisme connu des substrats mobilisés pendant l'hibernation : lipides et glucides ;
- Les mécanismes cellulaires et la respiration mitochondriale en torpeur et les phénomènes oxydatifs qui se produisent au cours de l'hibernation.

1. La torpeur

A. Endothermie et hétérothermie

L'endothermie est la capacité de certains animaux à produire de la chaleur et l'homéothermie désigne la capacité à maintenir leur température corporelle constante, définie comme euthermique dans un environnement changeant. Ces animaux sont dits endothermes homéothermes et ils peuvent maintenir leur température avec un métabolisme basal sur un certain intervalle de température ambiante (la zone de thermoneutralité, variable selon les espèces) ; ils sont donc moins dépendants des conditions environnementales que les animaux dits ectothermes qui, eux, ont besoin de sources extérieures de chaleur pour réguler leur température. On retrouve l'endothermie chez les mammifères et les oiseaux et chez de rares espèces de reptiles, poissons et insectes. L'endothermie consiste à générer de la chaleur grâce au métabolisme (c'est la thermogénèse), elle peut donc être challengée par des conditions environnementales (climat extrême, ressources rares). Pour limiter les pertes d'énergie et faire face à de rudes conditions, les animaux se sont adaptés via une meilleure isolation (fourrure ou plumage épais, graisse sous-cutanée, baisse du rapport surface/volume). Malgré cela 90 % de l'énergie est dissipée sous forme de chaleur (Labocha et Hayes, 2019). L'endothermie est donc coûteuse en énergie (cinq fois plus que l'ectothermie à taille et température corporelle égales) mais elle permet de coloniser des environnements aux climats plus variés où les animaux ectothermes ne peuvent pas vivre comme les pôles par exemple (Cristinelli, 2006).

L'hétérothermie désigne la capacité à faire varier l'endothermie c'est-à-dire la production de chaleur et donc la température corporelle. L'hétérothermie permet à l'animal d'osciller entre deux états : une température corporelle dite « normale » ou euthermique

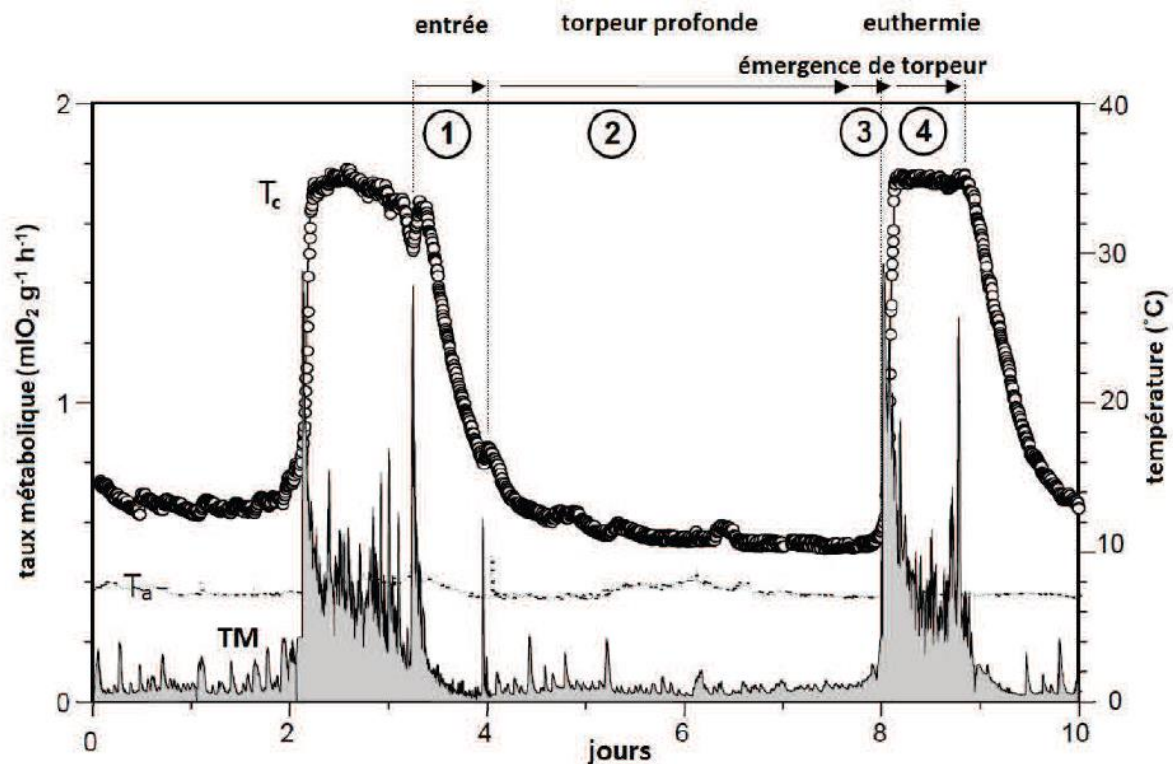
(typiquement entre 37 et 38°C en moyenne chez les mammifères) et une température corporelle basse lors d'état ralenti ou inactif, comme lors de la torpeur que nous allons définir.

B. Définitions de la torpeur journalière et de l'hibernation

Il existe une stratégie permettant à certaines espèces endothermes de réduire leur dépense énergétique durant les mauvaises conditions environnementales telles que la baisse de température, le raccourcissement des jours, les vents et précipitations et donc la raréfaction de ressources alimentaires. C'est la torpeur, qui peut être journalière ou saisonnière (hibernation ou estivation). La torpeur ne consiste pas seulement en la baisse de température corporelle et du taux métabolique mais aussi en la diminution des rythmes cardiaque et respiratoire et la baisse de pression sanguine et de circulation.

Les hibernants ont un cycle annuel marqué. Ils se reproduisent une partie de l'année puis, lorsque l'environnement se dégrade, vient une période de repos sexuel où ils restent cachés dans un terrier et entrent en torpeur. La torpeur ou hétérothermie temporelle est un état temporaire, périodique, facultatif et contrôlé de baisse du métabolisme et de la température corporelle (Heldmaier *et al.*, 2004). Pendant la torpeur journalière, qui dure moins de 24h, la température corporelle diminue de plusieurs degrés mais reste largement supérieure à la température ambiante (jusqu'à 18°C), et le métabolisme peut diminuer jusqu'à 19 % du métabolisme basal (Ruf et Geiser, 2015). La torpeur journalière se distingue ainsi de l'hibernation durant laquelle la température corporelle peut chuter jusqu'à la température ambiante (entre 0 et 10°C) et le métabolisme jusqu'à 4 % en moyenne du métabolisme basal sur toute la période d'hibernation (Ruf et Geiser, 2015). L'hibernation est constituée d'une succession de torpeurs plus longues et profondes que la torpeur journalière, qui sont entrecoupées de retours à l'euthermie, les périodes inter-torpeurs comme le montre la Figure 1.

Figure 1 : Episode de torpeur d'une marmotte Alpine (*Marmota marmota*). Un enregistrement en continu de l'intensité métabolique et de la température corporelle montre l'hypométabolisme et l'hypothermie au cours de l'entrée en torpeur (1), un maintien de l'hypométabolisme [et de l'hypothermie] au cours de la torpeur (2), un réchauffement rapide et une augmentation de l'intensité métabolique au cours de la sortie de torpeur (3), et un retour à l'euthermie et l'eumétabolisme (4). TM : taux métabolique, T_c : température corporelle, T_a : température ambiante. (Traduit et adapté de Heldmaier *et al.*, 2004.)



La différence entre torpeur journalière et saisonnière n'est pas nécessairement claire. On sait aujourd'hui qu'il s'agit plutôt d'un continuum le long duquel les espèces pouvant entrer en torpeur peuvent être placées. Prenons l'exemple du Monito del monte (*Dromiciops gliroides*), un marsupial d'Amérique du Sud. D'un côté, il hiberne l'hiver pour économiser son énergie et se reproduire après. D'un autre côté, il est capable d'entrer en torpeur journalière selon les conditions environnementales durant le printemps et l'été. On peut aussi citer le microcèbe mignon (*Microcebus murinus*), petit primate de Madagascar, qui présente des torpeurs journalières mais les femelles peuvent entrer en hibernation pour économiser de l'énergie en vue de la reproduction. Les torpeurs ne varient donc pas seulement selon l'espèce mais aussi selon l'âge et le sexe de l'individu (voir pour revue Giroud *et al.*, 2021).

C. La torpeur au sein du règne animal et son évolution

On retrouve la torpeur dans plusieurs taxons animaux (monotrèmes, marsupiaux, placentaires et plusieurs ordres d'oiseaux) et sur l'ensemble des continents (sauf Antarctique). L'hibernation concerne des mammifères « de l'Arctique aux tropiques » et une seule espèce d'oiseau, l'engoulevent de Nuttall (*Phalaenoptilus nuttallii*). Plus précisément, chez les mammifères, on peut trouver des hibernants parmi de nombreux ordres et familles : les rongeurs (spermophiles, marmottes, hamsters, loirs, lérots, pour ne citer que les exemples les plus fréquents), les insectivores comme le hérisson européen, les chauve-souris, des petits primates (le plus étudié est le chirogale moyen (*Cheirogaleus medius*)), les Xénarthres (avec le tatou velu de Patagonie (*Zaedyus pichiyi*)), les carnivores (notamment les ours noirs et bruns mais c'est discutable, leur « hibernation » étant particulière et se rapprochant plutôt du repos saisonnier), l'ordre des Monotrèmes avec l'échidné à nez court *Tachyglossus aculeatus* et l'ordre des Marsupiaux (dont le monito del Monte déjà évoqué précédemment ici) (pour revue, voir Geiser, 2020).

Les animaux capables de réaliser des torpeurs sont majoritairement très petits (ils sont petits en masse et volume mais ont une grande surface permettant la perte de chaleur : la torpeur leur permettrait alors de diminuer les fortes dépenses d'énergie métabolique par rapport à leur grand rapport surface/volume). Plus particulièrement les animaux capables de réaliser des torpeurs journalières ont en moyenne une plus petite masse (253 g) que les espèces hibernantes (2384 g) (Geiser et Ruf, 1995 ; Ruf et Geiser, 2015). Les animaux capables d'entrer en torpeur peuvent aussi vivre à de plus hautes latitudes, surtout les hibernants (35° en moyenne contre 25° chez les espèces faisant de la torpeur journalière) et d'affronter les conditions difficiles de ces milieux sans avoir recours à la migration (Ruf et Geiser, 2015). L'hibernation et plus largement l'entrée en torpeur étant vastement répandues chez les Mammifères et les Oiseaux, on suppose fortement aujourd'hui que la torpeur est un caractère plésiomorphe. Autrement dit, c'est un caractère ancestral commun qui a été perdu par certaines espèces : les non-hibernantes. Elles possèdent les gènes permettant d'entrer en torpeur mais, sans les contraintes de l'environnement faisant pression pour économiser l'énergie métabolique, elles ont arrêté de l'exprimer par des jeux de régulations des gènes (Cristinelli, 2006).

D. Contrôle du cycle annuel et déclenchement de la torpeur

L'hibernation peut durer jusqu'à une année (8 % des espèces hibernantes), de la fin de l'été au printemps (14 %) ou de l'automne au printemps (48 %) (pour revue, voir Geiser 2020). Elle est déclenchée essentiellement par une horloge interne, un rythme endogène donc, qui peut

provoquer une hibernation chaque année, quelles que soient les conditions environnementales (chez le spermophile à manteau doré *Callospermophilus lateralis* par exemple ; pour revue, voir Staples, 2016). Cette horloge est sensible à la photopériode : ainsi, chez le hamster syrien, les journées courtes en hiver provoquent une baisse de la production de mélatonine qui engendre une réduction d'expression des gènes *Kiss*, entraînant la mise en quiescence du système reproducteur à l'hibernation (les gènes *Kiss* codent pour la protéine Kisspeptine qui participe à l'initiation de la sécrétion de l'hormone GnRH, importante pour l'axe reproducteur hypothalamus-hypophyse-gonades) (Revel *et al.*, 2006). Elle est modulée secondairement par des facteurs externes : par exemple, l'absence de ressources alimentaires et la baisse de la température ambiante favorisent l'entrée en hibernation (pour revue, voir Carey *et al.* 2003) tandis qu'un stock de réserves pour l'hiver diminuera la fréquence et la durée des épisodes de torpeur chez des espèces comme le tamia rayé (*Tamias striatus*) (pour revue, voir Staples 2016). Notons tout de même que chez les hibernants obligatoires, l'hibernation se déclenche même avec une photopériode et température ambiantes constantes (pour revue, voir Geiser, 2020).

On ne sait pas exactement ce qui déclenche et met fin à la torpeur : une molécule particulière qui induirait la torpeur a été cherchée, en vain pour l'instant. La recherche se tourne récemment vers le sulfure d'hydrogène ou vers un complexe protéique « HP » exprimé dans le foie chez les hibernants (pour revues, voir Staples, 2016 ; Staples, 2022 ; Giroud, Hahold *et al.*, 2021). Il est possible que plusieurs neurotransmetteurs et hormones interagissent au niveau du système nerveux central (pour revue, voir Carey *et al.*, 2003). On a aussi supposé que l'hypoxie et l'hypercapnie étaient des déclencheurs parmi d'autres (Heldmaier *et al.*, 2004). Ce que l'on sait, c'est que l'entrée en torpeur ne dépend pas que de la température et donc ne serait pas passive. En effet, on remarque que dans l'entrée en torpeur, l'intensité métabolique (mesurée par le dioxygène consommé $\dot{V}O_2$) chute avant la température corporelle. Cette baisse régulée du métabolisme fait baisser la $\dot{V}O_2$ de 40 à 70 % en hibernation et de 14 à 30 % en torpeur journalière. L'intensité métabolique est donc activement diminuée pour se retrouver en-dessous du métabolisme basal (Heldmaier *et al.*, 2004, pour revue, voir Staples et Brown, 2008). Une fois le métabolisme et la température corporelle diminués, ils sont activement maintenus pour ne pas descendre sous un certain seuil fatal pour l'animal : par exemple, des petits pics de thermorégulation ont été observés chez la marmotte alpine pour que la température corporelle reste au-dessus de la température ambiante (Heldmaier *et al.*, 2004).

E. Les périodes inter-torpeurs

Les périodes inter-torpeurs se caractérisent par une hausse du métabolisme et de la production de chaleur entraînant un retour à l'eutherme, par une réactivation du système nerveux central, l'assouvissement de fonctions vitales comme manger et dormir (sommeil à ondes lentes), la régulation du pH sanguin (acidifié par l'excès de CO₂), la réactivation du système immunitaire pour faire face à d'éventuels agents pathogènes qui auraient infecté l'organisme pendant la torpeur et l'élimination des déchets métaboliques comme les espèces réactives à l'oxygène (ROS), signes de stress oxydant des cellules. En contrepartie, ces périodes sont coûteuses en énergie (80-85 % de l'énergie dépensée en hibernation, Heldmaier *et al.*, 2004) et provoquent un raccourcissement des télomères (séquences d'ADN répétées aux extrémités des chromosomes pour les protéger), accélérant le vieillissement des cellules (Hoelzl *et al.*, 2016 ; pour revue, voir Staples, 2016).

F. Les avantages énergétiques de la torpeur face aux coûts

Les économies d'énergie pendant les torpeurs s'opèrent par des changements dans l'organisme de l'animal hibernant : une accumulation de graisses en amont, une baisse de l'érythropoïèse, une diminution de la transcription et traduction des protéines, des modifications de compositions membranaires et un ajustement de la zone de neutralité thermique (pour revue, voir Giroud *et al.*, 2021). D'un point de vue énergétique, on peut dire que la torpeur, journalière ou saisonnière, permet d'économiser l'énergie par une baisse de l'activité métabolique de deux manières. Dans un premier temps, par une inhibition métabolique active comme évoqué précédemment (par exemple en inhibant certaines voies métaboliques par la non-expression de gènes, la phosphorylation d'enzymes, etc). Dans un second temps, par la baisse de température corporelle qui diminue l'activité enzymatique et les réactions chimiques selon la loi d'Arrhenius qui établit le lien entre la température et la vitesse d'une réaction (pour revue, voir Staples et Brown, 2008). Toutes ces économies permettent évidemment de faire face au froid et à la nourriture en moindre quantité chez les hibernants mais aussi à la rareté d'eau (en la conservant) ou à des événements imprévus comme une augmentation de la population d'un prédateur ou encore une catastrophe (tempête, incendie, etc). Plus les conditions seront favorables, plus l'énergie économisée permettra de maximiser la croissance ou la reproduction. Ainsi, malgré les périodes inter-torpeurs coûteuses, l'hibernation est avantageuse ; chez les spermophiles elle ne représente que 13 à 17 % des dépenses d'énergie annuelles. Ces avantages viennent contrebalancer les coûts ou risques de la torpeur : l'accumulation de déchets métaboliques, le stress oxydant que

nous détaillerons plus loin, les effets sur les neurones, la baisse d'immunité, le manque de sommeil, la prédation et le risque de geler (pour revue, voir Geiser, 2020).

2. Les stratégies d'accumulation de réserves et leurs adaptations métaboliques

A. Les espèces « fat-storing » et « food-storing »

a. Généralités

Les espèces hibernantes sont nombreuses et présentent des stratégies différentes. Parmi les différences notables, nous aborderons les stratégies de réserves énergétiques sous forme de tissu adipeux ou de nourriture. Ainsi, parmi les animaux hibernants, on distingue les « fat-storing » des « food-storing ». Les premiers font des réserves de graisse avant l'hibernation et les mobilisent comme source d'énergie pendant l'hibernation. Ils représentent la majorité des hibernants avec les spermophiles (*Spermophilus spp.*, *Urocyon spp.*), les marmottes (*Marmota spp.*), les chauves-souris (famille des *Vespertilionidae* et *Rhinolophus spp.*) et les marsupiaux (*Burramys spp.*, *Cercartetus spp.*, *Tachyglossus*). Les seconds (les « food-storing ») font des réserves de nourriture avant l'hibernation et consomment ces stocks pendant les phases d'inter-torpeur. Leurs torpeurs sont plus courtes et leur perte de masse moindre que les « fat-storing ». Les « food-storing » sont en majorité granivores : ils stockent des graines, aliments riches en graisses et peu périssables, dans leur terrier. Ils font aussi des réserves de graisse (dans leur tissu adipeux blanc) avant l'hibernation mais moins que les « fat-storing » et ont ainsi une moindre perte de masse durant l'hiver (pour revue, voir Giroud *et al.*, 2021). Ils regroupent des espèces de hamsters (hamster d'Europe, doré, nain), les tamias aussi appelés *chipmunks* (*Tamias spp.*) et les souris *Perognathus parvus*. Leurs torpeurs sont plus courtes (de quelques heures à 7-8 jours) car ils se réchauffent plus fréquemment pour pouvoir s'alimenter. Pour comparaison, les épisodes de torpeur durent de 2-3 à 15 jours chez les animaux « fat-storing ». Le stockage de graines évite les désavantages liés à la forte hausse d'adiposité comme la diminution de la mobilité entraînant des dépenses énergétiques supplémentaires et un risque accru de prédation. Les graines se conservent bien, sont riches en énergie et digestibles mais elles peuvent cependant être pillées ou se dégrader et demandent de maintenir le système digestif pendant l'hibernation, ce que nous détaillerons plus loin (Weitten, 2015 ; Geiser, 1998 ; revue de Geiser, 2020).

Notons que des espèces peuvent emprunter une autre stratégie que la leur : par exemple le monito del Monte est une espèce « fat-storing », qui accumule de la graisse avant l'hibernation mais s'il a de la nourriture à proximité pendant la mauvaise saison, il peut se

réveiller de torpeur pour se nourrir comme un « food-storing » (pour revue, voir Giroud *et al.*, 2021).

On peut observer une variation annuelle du métabolisme et de la masse corporelle, en parallèle du cycle reproducteur chez les hibernants. Plusieurs semaines voire mois avant l'entrée en hibernation, les animaux « fat-storing » connaissent une phase d'hyperphagie pour prendre de la masse corporelle et constituer des réserves de tissu adipeux blanc. On peut citer l'exemple de la marmotte à ventre fauve (*Marmota flaviventris*) qui augmente sa masse de 150 % (de 3 à 4,5 kg) durant l'été. A noter que le pic d'hyperphagie et le maximum de masse corporelle n'ont pas lieu en même temps. La dépense énergétique diminue l'été pour mieux constituer des réserves puis la prise alimentaire commence à diminuer avant que la masse maximale ne soit atteinte. La prise alimentaire et les réserves ont lieu en parallèle du cycle de la reproduction : après la période d'accouplement pour les mâles et dès la fin de la période d'allaitement pour les femelles (que ce soit chez les spermophiles ou les marmottes) (Weitten, 2015 ; pour revues, voir Geiser, 2020 et Giroud, Habold *et al.*, 2021). Ces grandes réserves ainsi constituées permettent aux animaux « fat-storing » de jeûner l'hiver. Plus elles sont grandes, plus l'animal perdra de la masse selon la fréquence et la profondeur des torpeurs.

b. Le grand hamster d'Alsace, une espèce « food-storing »

Parmi les espèces « food-storing », nous nous sommes intéressés au hamster d'Europe ou grand hamster (*Cricetus cricetus*). Il constitue notre sujet d'étude car on ne connaît pas encore les caractéristiques de ses épisodes de torpeur et comment évolue son métabolisme en hibernation. En effet, les espèces « food-storing » sont peu nombreuses et la plupart des études citées dans cette partie bibliographique s'appuient sur des espèces hibernantes « fat-storing » comme la marmotte ou le spermophile.

Le hamster d'Europe est un mammifère rongeur omnivore nocturne et hibernant obligatoire. Sa période d'hibernation s'étend d'octobre à mars-avril (les mâles hibernent un peu plus que les femelles). Ses torpeurs sont de 2-3 jours et peuvent aller jusqu'à 5 jours (contre 10-15 jours chez d'autres rongeurs hibernants) (pour revue, voir Geiser, 2020).

Il est passé au statut « d'espèce en danger critique d'extinction » sur la liste rouge établie par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) en juillet 2020 à l'échelle internationale, il est inscrit dans la convention de Berne et la Directive Habitat à l'échelle de l'Union Européenne et il est sur la liste rouge de la faune menacée en France à l'échelle nationale (Museum National d'Histoire Naturelle). Il est donc protégé par le Code de

l'Environnement et on trouve en Alsace des programmes d'élevage et de relâcher. L'IPHC – Institut pluridisciplinaire Hubert Curien <https://iphc.cnrs.fr/> – participe à un de ces programmes et assure le suivi de la population dans les zones de relâcher, en collaboration avec la région Alsace et l'Allemagne, pays limitrophe.

B. Métabolisme des lipides et des glucides en torpeur selon la stratégie de stockage

a. Chez les espèces « fat-storing »

Les animaux « fat-storing » ont une glycémie élevée avant l'hibernation quand ils accumulent des réserves de graisse. La glycémie est maintenue constante à des valeurs normales par néoglucogenèse en torpeur et pendant les retours à l'eutherme inter-torpeur (pour revue, voir Carey *et al.*, 2003 ; Tissier et Habold, 2017). Ils utilisent majoritairement leurs triglycérides en réserve dans le tissu adipeux blanc car les réserves de glycogène et les capacités de glycolyse sont diminuées dans le foie et les muscles (pour revue, voir Staples et Brown, 2008).

Le QR (quotient respiratoire) est le rapport entre la quantité de CO₂ produit par l'oxydation totale d'un substrat sur la quantité d'O₂ nécessaire à cette oxydation complète et il se calcule par calorimétrie indirecte. La consommation de dioxygène et la production de dioxyde de carbone diffèrent selon le substrat car glucides et acides gras ont des catabolismes différents : le QR varie donc en fonction du substrat, de 0,7 pour les lipides à 1 pour les glucides. Il est de 0,7 chez les animaux « fat-storing », signe que les substrats sont des lipides et non des glucides (Giroud *et al.*, 2021).

Les triglycérides circulants diminuent tandis que les acides gras libres et les corps cétoniques augmentent dans le sang comme le montre la Figure 2A (pour revues, voir Staples et Brown, 2008 et Giroud *et al.*, 2021). Chez le Spermophile arctique (*Urocitellus parryii*), des acides gras libres circulent cinq fois plus chez les individus en torpeur que chez les animaux au cours de l'eutherme. Par ailleurs, ce taux élevé en acides gras dans le sang peut augmenter la thermogenèse dans les tissus autres que le tissu adipeux brun (pour revue, voir Staples et Brown, 2008).

D'un point de vue endocrinien, avant l'hibernation, la ghréline, hormone orexigène sécrétée par l'estomac, augmente pour soutenir l'hyperphagie et constituer des réserves. Le tissu adipeux blanc sécrète beaucoup de leptine et peu d'adiponectine. Le haut niveau de leptine devrait augmenter les dépenses d'énergie et retarder l'entrée en torpeur mais il n'en est rien grâce à un découplage, selon les espèces, entre la leptine et l'hypothalamus ou entre la quantité de tissu adipeux et la sécrétion de leptine. Le niveau d'adiponectine est faible en

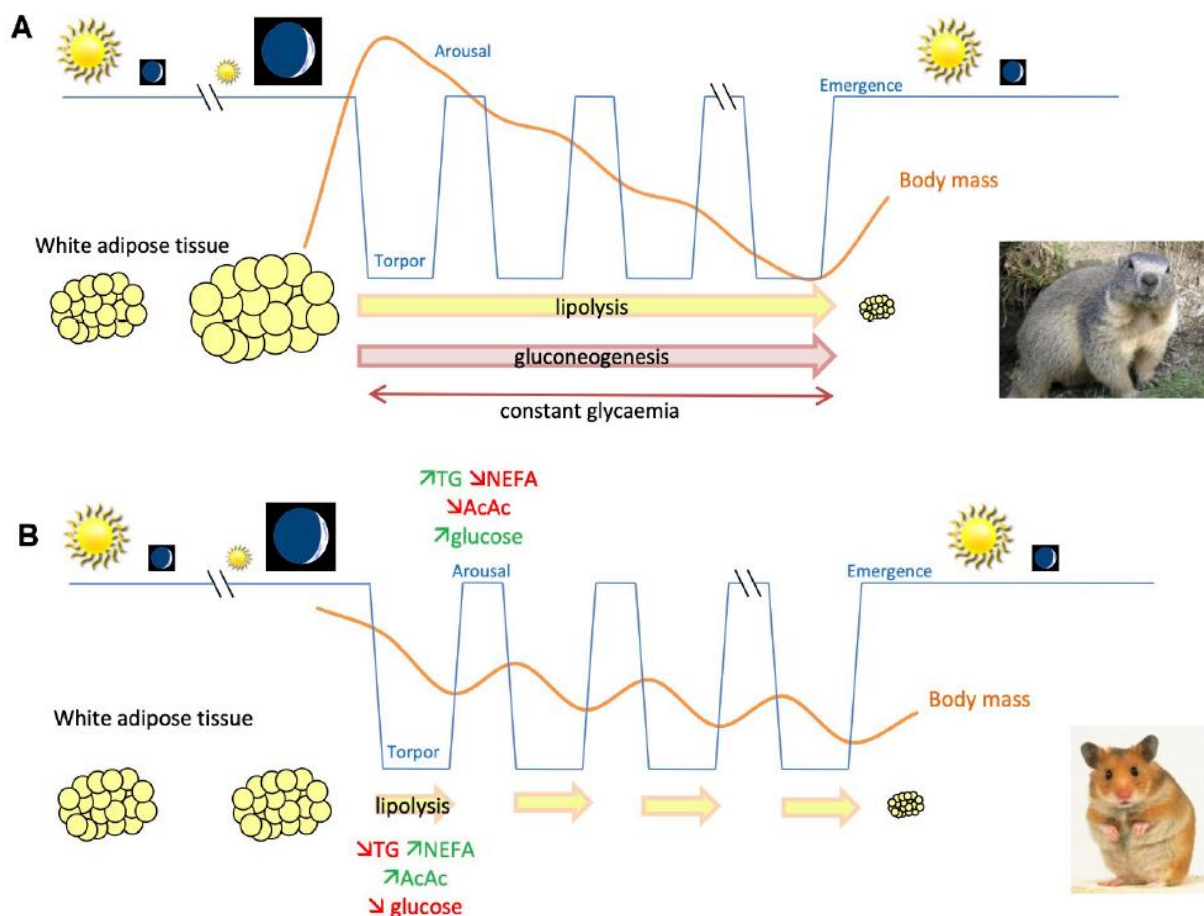
début d'hibernation quand les réserves de tissu adipeux blanc sont importantes, puis il augmente au fur et à mesure que ces réserves s'amenuisent, augmentant ainsi l'oxydation des acides gras (Figure 2A). Les hormones pancréatiques sont maintenues à un faible niveau pendant les torpeurs, puis, pendant les périodes inter-torpeurs, le glucagon augmente et l'insuline diminue pour maintenir la glycémie pendant l'eutherme. Le cortisol est peu produit durant l'hibernation pour éviter l'induction des voies cataboliques qui provoquerait la surdégradation des protéines par exemple (pour revue, voir Giroud *et al.*, 2021).

b. Chez les espèces « food-storing »

Chez les animaux « food-storing », ce sont les triglycérides et les glucides qui couvrent les besoins énergétiques pendant la torpeur ; le QR est proche de 0,7 (mais moins proche que le QR des espèces « fat-storing »). Contrairement aux espèces stockant des graisses, la glycémie diminue au cours de la torpeur et on peut penser qu'en-deçà d'un certain seuil, cette diminution pourrait constituer un signal endogène pour que les hibernants stockant de la nourriture se réchauffent et surgissent de torpeur pour se nourrir pendant l'eutherme (Weitten *et al.*, 2013). Comme pour les animaux « fat-storing », ce sont les glucides qui sont utilisés comme source d'énergie pour le réchauffement en sortie de torpeur (pour revue, voir Staples, 2016). Enfin, lors de la phase d'eutherme, on voit sur la Figure 2B que la réalimentation permet un retour de la glycémie aux valeurs normales (pour revue, voir Giroud *et al.*, 2021).

Parmi les changements endocriniens, on peut noter les hormones pancréatiques qui sont faiblement sécrétées, non seulement en torpeur comme les espèces « fat-storing », mais aussi avant l'entrée en hibernation et pendant les périodes inter-torpeurs, ce qui est étonnant car les animaux mangent pendant ces phases d'eutherme et leur glycémie augmente. Les hormones gastro-intestinales (comme les incrétones GLP-1 et GIP) sont peu sécrétées pendant les torpeurs et augmentent à l'ingestion pendant l'eutherme pour renforcer les voies anaboliques. Cela nous amène à nous pencher sur la physiologie de la digestion en torpeur.

Figure 2 : Changements de masse corporelle et physiologie d'utilisation des substrats énergétiques au cours de l'hibernation entre une espèce « fat-storing » (la marmotte à ventre jaune en A) et « food-storing » (le hamster, ici syrien, en B). La traduction de la légende est la suivante : (A) Chez les hibernants stockant les graisses, par exemple les marmottes, les animaux subissent un jeûne à long terme pendant l'hiver en mobilisant principalement les lipides, accumulés avant l'hiver dans le tissu adipeux blanc, pour soutenir leurs besoins énergétiques. Cela conduit à une réduction substantielle de la masse corporelle (graisseuse) des individus au cours de leur jeûne hivernal. L'énergie peut également provenir de la néoglucogenèse, c'est-à-dire de la synthèse de glucose à partir de substrats non glucidiques pendant l'hibernation. (B) En revanche, les hibernants qui stockent de la nourriture, par exemple les hamsters syriens, connaissent un état de jeûne intermittent pendant l'hibernation hivernale. Les animaux mobilisent leurs réserves de lipides pendant les phases de torpeur, mais se nourrissent pendant les périodes inter-torpeur, en utilisant le glucose comme principale source d'énergie, et restaurent partiellement leurs réserves corporelles de lipides/glycogène. Contrairement aux espèces stockant des graisses, la glycémie diminue pendant la torpeur, ce qui pourrait constituer un signal endogène pour que les hibernants stockant de la nourriture surgissent de torpeur et se nourrissent pendant l'euthermie. (Légende traduite de Giroud, Habol *et al.*, 2021.)



C. Physiologie de la digestion en hibernation

En plus des adaptations à la torpeur journalière ou à l'hibernation décrites précédemment, les espèces « food-storing » disposent de quelques particularités afin de s'alimenter pendant l'euthermie inter-torpeur. Se nourrir pendant les phases d'euthermie implique de garder un tractus digestif fonctionnel : la longueur des villosités intestinales et l'activité des enzymes sont conservées (voire même augmentées dans le jéjunum) chez le hamster commun en torpeur (Weitten *et al.*, 2016). Les enzymes intestinales sont toujours exprimées pour hydrolyser les triglycérides, l'amidon, les protéines et permettre une bonne assimilation. L'absorption du glucose et des acides gras est d'ailleurs maintenue voire augmentée pendant les torpeurs (pour revue, voir Giroud *et al.*, 2021). Chez les animaux « fat-storing », la masse intestinale diminue, la prolifération des cellules dans les épithélia comme l'intestin est stoppée pour économiser l'énergie et les enzymes et transporteurs de l'épithélium intestinal sont inhibés lors des épisodes de torpeur et hibernation mais sont préservés et reprennent à la fin de l'hibernation (pour revue, voir Carey *et al.*, 2003).

Si à l'heure actuelle on connaît plutôt bien les mécanismes physiologiques de l'hibernation, évoqués ci-dessus, beaucoup de questions subsistent au niveau cellulaire et plus précisément au niveau mitochondrial.

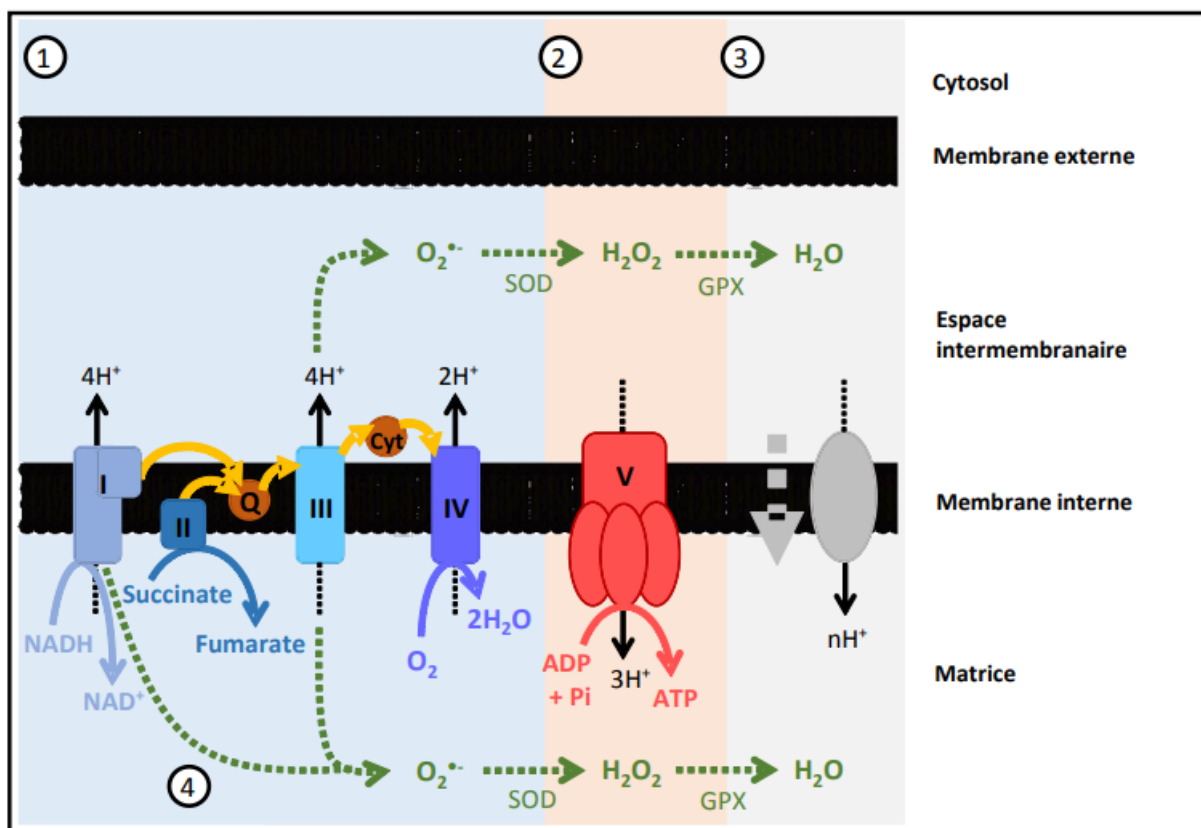
3. La mitochondrie

A. Généralités

a. *Fonctionnement général de la mitochondrie et de sa chaîne respiratoire*

La mitochondrie est un organe des cellules eucaryotes, présente en plus ou moins grande quantité selon la cellule (espèce animale, organe, etc). Elle est constituée d'une matrice entourée par deux membranes en bicouche phospholipidiques et possède de l'ADN, l'ADNmt. Parmi ses différents rôles, nous nous intéressons à sa faculté à synthétiser l'ATP, monnaie énergétique de l'organisme, et des ROS (*Reactive Oxygen Species*), espèces réactives de l'oxygène, via sa chaîne respiratoire située dans sa membrane interne. Ainsi, la mitochondrie se situe au cœur du métabolisme énergétique par la respiration mitochondriale qui consiste à synthétiser de l'ATP en oxydant des coenzymes réduits à partir d'O₂, le tout sur une chaîne membranaire constituée de complexes protéiques faisant migrer des électrons et des protons (Boël, 2020). La chaîne respiratoire avec ATP-synthase est présentée sur la Figure 3.

Figure 3 : Schéma légendé de la chaîne respiratoire dans la membrane de la mitochondrie (source : Boël, 2020). La légende est la suivante : I : NADH-ubiquinone oxydoréductase ; II : succinate-ubiquinone oxydoréductase ; III : cytochrome bc1 ; IV : cytochrome c oxydase ; V : F0-F1 ATP synthétase ; Q : ubiquinone ; Cyt : cytochrome C. (1) Bloc de réactions d'oxydation-réduction responsable de la consommation d'oxygène mitochondriale, associée à la création du gradient électrochimique de protons (H^+) dans l'espace intermembranaire. (2) Bloc de synthèse d'ATP via la phosphorylation de l'ADP à l'aide du gradient électrochimique de protons. (3) Bloc de pertes énergétiques qui consistent au passage de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice, par diffusion ou par des protéines découplantes. (4) Synthèse d'espèces réactives de l'oxygène dans l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. (Boël, 2020).



On observe que la membrane interne, qui à l'échelle de la mitochondrie fait des invaginations augmentant sa surface, possède au sein de sa bicouche (sur la Figure 3, un simple trait noir épais) des transporteurs, des enzymes pour la chaîne respiratoire et des ATP-synthases. Les enzymes font circuler des électrons et des protons et l'ATP-synthase phosphoryle l'ADP en ATP : c'est la phosphorylation oxydative. Les coenzymes réduits - venant du catabolisme des glucides, acides gras et acides aminés, via le cycle de Krebs et la β oxydation - sont oxydés par les complexes protéiques de la chaîne. Ces coenzymes sont le NADH et le $FADH_2$. Le NADH est oxydé par le complexe I et le $FADH_2$ est oxydé par complexe

II (Farhat, 2019). Les deux électrons issus de ces oxydations transitent ensuite vers la coenzyme Q (ubiquinone), puis le complexe III, le cytochrome C et enfin le complexe IV qui réduit l'oxygène venant de l'extérieur en eau. Les complexes I, III et IV ont la particularité de faire passer des protons vers l'espace intermembranaire. Ces protons vont donc contre le gradient de concentration. Combinés au potentiel transmembranaire, ils forment un gradient électrochimique entre la matrice et l'espace intermembranaire qui sert de force motrice à l'ATP-synthase pour la phosphorylation (Boël, 2020).

Lorsque la respiration crée de l'ATP, on parle d'état phosphorylant de la mitochondrie (ou stade 3) (bloc (2) en orange sur la Figure 3).

La fuite de protons est le retour de protons vers la matrice sans passer par l'ATP-synthase. Ce retour (bloc (3) en gris sur la Figure 3) peut se faire par diffusion passive à travers la membrane (phénomène normalement très faible en raison de l'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale aux protons) mais surtout via les protéines membranaires découplantes UCP (*uncoupling protein*) qui participent à la thermogénèse (par exemple : UCP1 dans le tissu adipeux brun et UCP2 dans plusieurs tissus dont le foie ; Vimala et al., 2015 ; Farhat, 2015). Une forte fuite de protons constitue un découplage entre la production d'ATP, qui chute, et la consommation d'oxygène, qui est maintenue, voire augmentée. Le découplage est donc une « dissipation du gradient électrochimique sous forme de chaleur » (Boël, 2020). Physiologiquement, la respiration n'est jamais parfaitement couplée à la synthèse d'ATP car il existe toujours une légère fuite de protons.

Selon la disponibilité en ADP et les besoins en ATP pour couvrir les activités de l'animal, la mitochondrie oscille entre deux états : une respiration phosphorylante (ou stade 3) et une respiration non-phosphorylante. Cette dernière est normalement faible mais peut augmenter en cas de découplage (hausse de la consommation basale d'O₂ par fonctionnement augmenté de la chaîne respiratoire qui produit de la chaleur) (Dolfi-Donagan *et al.*, 2020).

b. ROS (espèces réactives à l'oxygène) et stress oxydant

Les ROS regroupent les radicaux avec un électron non apparié comme l'anion superoxyde et le radical hydroxyle mais aussi le peroxyde d'oxygène qui n'est pas un radical mais est très réactif car il peut former l'oxygène singulet. 90 % des ROS viennent de la mitochondrie et 0,15 % de l'oxygène est convertie en ROS au niveau de la mitochondrie (Brand, 2010). Les ROS sont produites par les complexes I et III de la chaîne respiratoire ((4) dans la Figure 3). Un découplage mitochondrial fait le plus souvent diminuer la production de ROS (Monteiro *et al.*, 2021).

En conditions physiologiques homéostasiques, les ROS sont produites en permanence en petites quantités et ont une grande importance dans la survie cellulaire, notamment car elles tiennent plusieurs rôles physiologiques : différenciation des cellules, autophagie, adaptation métabolique et enfin un rôle immunitaire avec l'activation de cellules immunitaires (Sena & Chandel, 2012). Face à un stress, notamment hypoxique mais on peut aussi citer un choc thermique ou inflammatoire, la production de ROS augmente et sert d'induction à une cascade de réponses à ce stress. Les ROS activent les facteurs de transcription liés au système immunitaire NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*), AP-1 (*Activator Protein 1*) ou elles activent des protéines kinases qui activent des facteurs de transcription. Les facteurs permettent ensuite la transcription de gènes cibles. Par exemple, lors d'une hypoxie, les ROS conduisent à l'activation de la production d'EPO (érythropoïétine) et du facteur de croissance endothélial vasculaire qui vont réduire l'hypoxie par leurs effets sur la production de globules rouges et de vaisseaux sanguins (Sena & Chandel, 2012).

À plus forte concentration et malgré leur courte durée de vie de moins d'une microseconde, les ROS causent des dommages à différentes molécules (ADN, protéines et lipides) majoritairement dans la mitochondrie mais aussi dans la cellule jusqu'à réduire sa durée de vie. L'oxydation de l'ADN nucléaire ou mitochondrial peut donner lieu à des mutations comme des transversions G-T (Farhat, 2019). Plus particulièrement, les ROS contribuent au raccourcissement des télomères et donc à la sénescence des cellules et aux maladies dégénératives (on peut citer les maladies neurodégénératives, les diabètes, les cancers, le vieillissement ; Sena & Chandel, 2012 ; Barnes *et al.*, 2019). Face au stress oxydant causé par les ROS, la cellule relargue des métabolites, déchets de l'oxydation nommés ROM. Elle dispose aussi de défenses antioxydantes (OXY) : enzymatiques (superoxyde dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxydase) ou non (ascorbate, flavonoïdes, tocophérols, caroténoïdes, glutathion, albumine). Les ROM et OXY sont facilement dosables, comme nous le verrons dans la partie Matériels et Méthodes de ce travail.

Les défenses non-enzymatiques piègent l'électron célibataire et stabilisent ainsi les molécules, limitant les dégâts des ROS. Certaines viennent de l'alimentation d'autres sont déjà présentes dans l'organisme. On peut citer les tocophérols (vitamine E) qui s'insèrent dans les membranes cellulaires et stoppent l'oxydation lipidique qui va d'acide gras en acide gras. Les défenses enzymatiques sont synthétisées par l'organisme et catalysent la transformation de ROS en eau et oxygène (Farhat, 2019). L'enzyme la plus importante est la glutathion peroxydase (Cater & Bombek, 2022).

Notons que dans la mitochondrie, la production d'anion superoxyde serait modulée par les protéines découplantes comme UCP 2 et 3. Quand l'anion superoxyde augmente, les UCP

répondent en transportant plus de H⁺ et la diminution du gradient fait à son tour baisser la production de ROS (Brand *et al.*, 2004). Il existe aussi UCP4 et UCP5 qui diminuent le stress oxydant (notamment dans le cerveau où elles auraient un effet neuroprotecteur) et UCP6 qui régule la concentration d'H₂S, qui à faible concentration inhibe la production de ROS dans les mitochondries (Monteiro *et al.*, 2021).

B. Mesure de la respiration par l'oxymétrie de flux

Un oxymètre mesure la concentration d'oxygène dans un gaz ou un liquide. Afin de mesurer la respiration cellulaire, un oxymètre est utilisé. L'oxymètre OROBOROS Oxygraph-2k (O2k) (© Oroboros Instruments GmbH) a vu son utilisation augmenter ces deux dernières décennies afin de mieux comprendre la mitochondrie et sa respiration. Toutes les publications récentes avec Oroboros sur la base de données PubMed datent d'après 2002, on en trouve 102 dont 32 publiées en 2021-2022. Voici quelques exemples récents : l'O2k a notamment été utilisé pour évaluer la respiration mitochondriale (consommation d'O₂) pour étudier les maladies mitochondriales dans le foie (Zhang *et al.*, 2021), les dysfonctions métaboliques des cellules β du pancréas (Crowder *et al.*, 2022) ou encore mesurer la production de ROS et le potentiel de membrane de la mitochondrie pour mieux comprendre le stress des mitochondries cardiaques pouvant causer des pathologies cardiaques (Abdel-Rahman *et al.*, 2021).

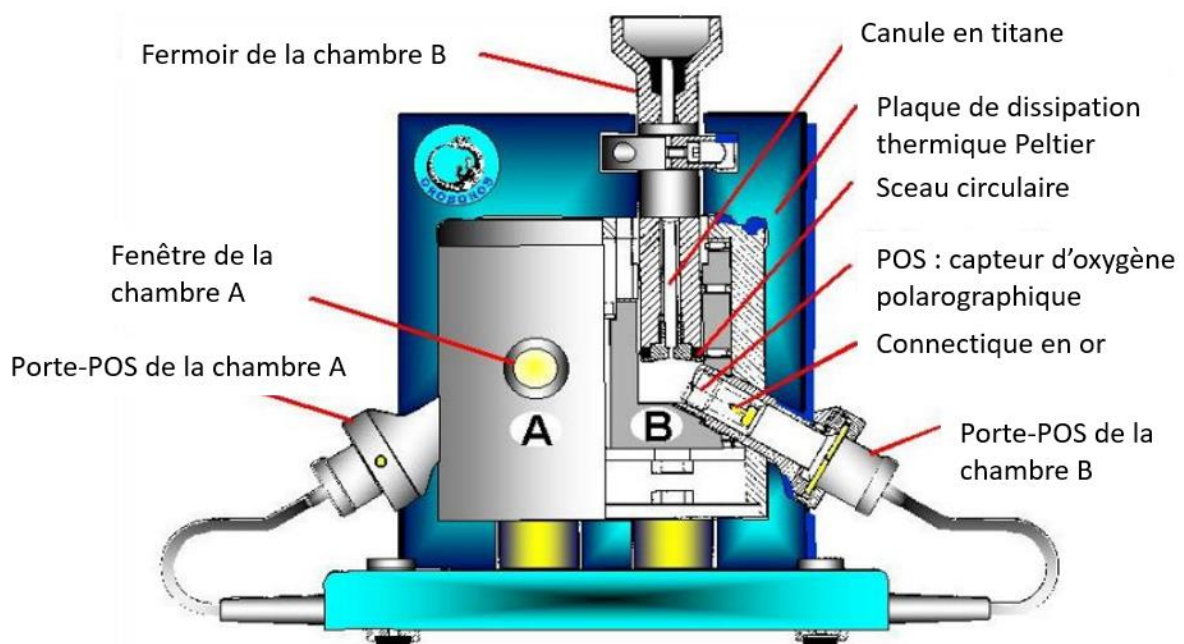
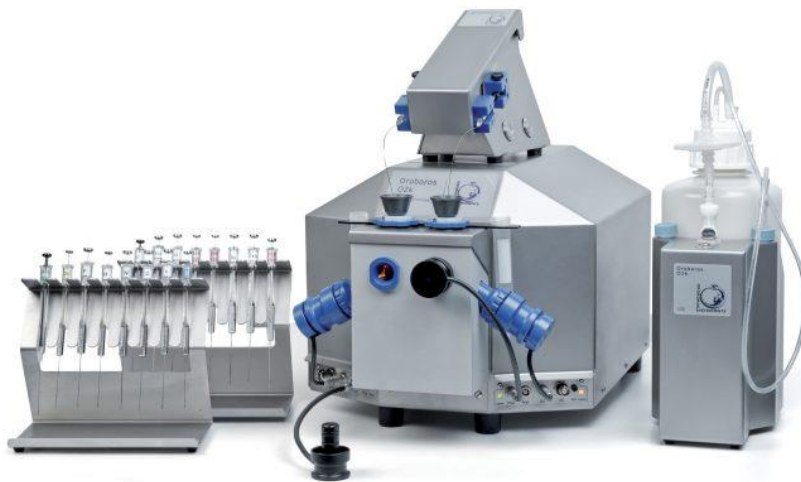
Plus globalement, la résolution de l'O2k permet de mesurer la respiration mitochondriale même quand celle-ci est faible ou qu'il y a peu d'échantillon (mitochondries, cellules, tissus) pour faire la mesure, rendant ainsi l'O2k utile pour de nombreuses applications d'après la documentation technique de l'O2k fournie par l'entreprise :

- « - Effets pathologiques entraînant une diminution de la respiration (apoptose ; maladies mitochondriales et métaboliques, vieillissement, lésion d'ischémie-reperfusion ; stress oxydant) ;
- Biopsies avec une quantité limitée d'échantillons (en particulier dans le diagnostic de défauts mitochondriaux génétiques et acquis chez les patients pédiatriques) ;
- Cultures cellulaires avec un nombre limité de cellules ;
- Mutants à capacité respiratoire diminuée ;
- Taux d'oxydation chimique et capacités antioxydantes (contrôle qualité) ;
- Mesures respiratoires à de faibles niveaux physiologiques d'oxygène intracellulaire et cinétique d'oxygène. » (Gnaiger, 2011).

Concrètement, l'Oxygraph-2k contient deux chambres avec température réglable pouvant accueillir du tissu ou des cellules dans un milieu liquide biocompatible, avec des agitateurs aimantés pour homogénéiser le milieu et mettre en suspension les tissus/cellules

et enfin, bien sûr, des capteurs détectant l'oxygène. Ces chambres en verre sont « fermées » (pour les couper de l'oxygène ambiant) par des cylindres de titane laissant un petit espace pour le milieu et les cellules au fond, à proximité du capteur. Ces fermetures cylindriques possèdent en leur centre une colonne permettant l'injection de substrats. Par exemple, il est possible d'injecter des glucides ou des acides gras pour la respiration mitochondriale (cf. Matériel et Méthodes). La Figure 4 est issue de la communication technique de l'entreprise Oroboros et montre l'aspect extérieur et intérieur en coupe de l'O2k : on peut y voir les chambres A et B où sont injectés les substrats. Comme évoqué précédemment avec les exemples de publications, l'Oxygraph-2k peut s'utiliser sur des mitochondries isolées ou sur des cellules, comme dans notre étude.

Figure 4 : Photographie et schéma en coupe de l'OROBOROS Oxygraph-2k (© Oroboros Instruments GmbH). De gauche à droite, sur la photographie issue du site de l'entreprise (<https://www.orooboros.at/index.php/o2k-concept/>), on voit le portoir à seringues pour injecter les substrats, l'O2k et l'aspirateur pour faire les lavages et vider les chambres une fois l'expérience finie. Sur le schéma, tiré et traduit de la documentation de l'entreprise (Gnaiger, 2011), on voit l'oxygraphe O2k OROBOROS® en coupe. La légende est la suivante : A : chambre A ; B : chambre B en coupe ; les deux chambres sont logées dans un bloc de cuivre (thermorégulé et isolé). Les thermopiles Peltier (appareils électroniques convertissant l'énergie thermique en énergie électrique) sont en contact thermique entre le bloc de cuivre et la plaque de dissipation thermique Peltier.



Le capteur POS est constitué d'une anode et d'une cathode. L'oxygène produit diffuse depuis l'échantillon (mitochondries isolées ou cellules ou tissu) déposé dans la chambre jusqu'à la cathode où la pression d'O₂ est constamment égale à 0. Pour cela, l'oxygène passe la membrane du capteur POS, une couche d'électrolytes KCl, l'anode puis la cathode en or (Figure 4). Les agitateurs permettent de minimiser la couche de cellules/mitochondries à la surface de la membrane. D'après la fiche technique de l'O2k : « Dans des conditions d'équilibre, le flux d'oxygène vers la cathode dépend de la pression d'oxygène externe, et la réduction électrochimique de l'oxygène donne une consommation d'oxygène par le POS qui est convertie en un signal électrique. ». C'est ce signal électrique que le logiciel DatLab – O2k connect traduit en deux courbes en fonction du temps : la concentration d'O₂ dans la chambre et le flux d'O₂ par masse d'échantillon (pmol/(s*mg)).

Ces courbes permettent de calculer différents états de la respiration, dont les notations sont utilisées dans la majorité des publications sur la respiration mitochondriale utilisant un oxymètre O2k. Ces états sont (d'après Boël, 2020 ; Gnaiger, 2020 ; De Jong *et al.*, 2022) :

- LEAK correspond au taux basal de consommation de l'oxygène lorsqu'il n'y a pas de phosphorylation. Autrement dit, c'est la consommation d'O₂ lorsque l'ATP-synthase n'a pas d'ADP à phosphoryler car il n'a pas encore été injecté dans les chambres, il y a seulement des produits de dégradation des glucides ou des acides gras pour initier la respiration basale.
- OXPHOS correspond la phosphorylation oxydative. C'est la mesure après avoir injecté de l'ADP en excès dans la chambre. On prend la mesure à l'injection d'ADP, puis avec cytochrome C et enfin après injection de différents produits de dégradation des glucides servant de substrats à la mitochondrie : c'est le stade 3 couplé. Le cytochrome C permet de vérifier l'intégrité de la membrane mitochondriale externe, gage de qualité de la manipulation. Si la respiration augmente, cela signifie que les fibres perméabilisées sont endommagées.
- ETS signifie *Electron Transport System* et désigne la respiration découplée la plus haute dont la mitochondrie est capable (stade 3 découplé). Il s'obtient après ajout de FCCP (p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazine).
- ROX signifie *Residual OXygen consumption* et se mesure après injection de roténone, de malonate et d'antimycine A, qui inhibent respectivement les complexes I, II et III de la chaîne mitochondriale. Le transport d'électrons est bloqué, il ne reste que la consommation résiduelle d'oxygène. C'est le ROX, un facteur de correction qui est retranché pour tous les taux respiratoires mitochondriaux mesurés.

Le protocole avec tous les produits injectés, leur ordre et leurs quantités ainsi qu'un exemple de courbe obtenue et sa lecture, sont donnés dans la partie Matériel et Méthodes.

C. Respiration mitochondriale et stress oxydant en torpeur

Chez les animaux « fat-storing », on sait, d'une part, que le stade 3 phosphorylant diminue dans les mitochondries du foie en phase profonde de la torpeur sans que l'efficacité mitochondriale (qui se note ATP/O : l'ATP produit par molécule d'oxygène consommée) ne change (pour revue, voir Staples et Brown, 2008) notamment en réprimant les transporteurs d'électrons de la chaîne : le complexe IV d'après Staples & Brown (2008), les complexes I et II d'après Mathers *et al.* (2017). Cette inhibition du stade 3 n'est pas à l'origine de l'induction de la torpeur ou du retour à l'eutherme car elle a bien lieu en torpeur et non pendant l'entrée ou la sortie (pour revue, voir Carey *et al.*, 2003). La respiration phosphorylante reprend au réchauffement (à un niveau 7 fois plus élevé qu'en torpeur chez le Spermophile rayé, Staples, 2016). D'autre part, en isolant des mitochondries en hibernation, on sait que le stade non-phosphorylant (ou stade 4) est lui aussi réduit, comme dans le foie de spermophiles *S. richardsonii* comparés aux animaux de la même espèce à l'eutherme (pour revue, voir Staples et Brown, 2008). Dans le muscle squelettique, la respiration diminue aussi mais moins que dans le foie (-30 % contre -65 % dans le foie d'après la revue de Staples, 2016). Chez d'autres espèces de spermophiles, l'hibernation n'a pas d'effet sur le stade de respiration des muscles squelettiques (pour revue, voir Staples et Brown, 2008). La suppression du métabolisme mitochondrial, que ce soit au stade phosphorylant ou non, se trouve surtout dans le foie et d'une manière plus ou moins prononcée selon l'espèce (pour revue, voir Staples et Brown, 2008). Chez le hamster russe (*Phodopus sungorus*) – un hétérotherme journalier, le stade phosphorylant diminue jusqu'à 30 % en torpeur selon la température dans les mitochondries du foie tandis que le stade 4 ne change pas (Brown *et al.*, 2007 ; Brown & Staples, 2011).

Cette réduction métabolique peut s'expliquer par trois phénomènes non exclusifs : moins d'oxydation des substrats, moins de phosphorylation de l'ADP en ATP et/ou plus de fuite de protons. Par exemple, il y a moins d'oxydation des substrats dans les mitochondries du foie en torpeur car il y a une diminution des besoins en énergie : moins d'activité des hépatocytes, moins de transcription, de traduction et une baisse de l'activité des enzymes oxydantes comme le complexe IV. On peut aussi noter que la baisse active du métabolisme mitochondrial serait liée à la température corporelle car elle est d'autant plus forte que la température est haute. Elle a donc surtout lieu pendant l'induction de la torpeur ou au réchauffement (pour revue, voir Staples et Brown, 2008).

On constate aussi que la fuite de protons augmente ou ne varie pas en hibernation et augmente pendant la torpeur journalière. Cette hausse fait chuter la production d'ATP et le gradient électrochimique génère de la chaleur (pour revues, voir Staples, 2008 & 2016). Quant à la production de ROS, elle n'augmente pas aux basses températures corporelles de la torpeur (Orr *et al.*, 2009 et Brown & Staples, 2011). C'est pendant le réchauffement qu'on

observe une forte hausse de ROS et un raccourcissement des télomères (Hoelzl *et al.*, 2016). On trouve des signes d'oxydation des lipides et protéines dans le tissu adipeux brun en euthermie et fin de période inter-torpeur, mais pas en torpeur (Orr *et al.*, 2009). D'autres études montrent que dans certains tissus, des signes de stress oxydant s'accumulent en fin de torpeur puis diminuent en euthermie inter-torpeur parallèlement à une augmentation d'enzymes antioxydantes (Wei *et al.*, 2018). Plus récemment, il a été démontré que des cellules rénales du hamster Syrien, un hibernant « food-storing », soumises à 48 h d'hypothermie n'accumulaient pas de ROS et ne faisaient pas d'apoptose contrairement aux cellules rénales humaines soumises à la même hypothermie (Hendriks *et al.*, 2020). Enfin, la revue de Staples de 2022 indique que chez le spermophile rayé, il y a deux fois plus d'oxydation des lipides en euthermie inter-torpeur dans le tissu adipeux brun, le cœur et l'intestin grêle qu'en torpeur ou qu'en été. La capacité antioxydante totale dans plusieurs tissus dont le foie ne change pas entre la torpeur, l'inter-torpeur et l'été : ce serait plutôt le changement de métabolisme mitochondrial qui modulerait la production de ROS. Par exemple, la production de ROS est deux fois plus forte dans le foie du Spermophile en été, comparé à la torpeur ou l'inter-torpeur.

Ainsi, face au stress oxydant, l'organisme des animaux hibernants possède toute une gamme d'adaptations à l'hypométabolisme. Par exemple, les organes vitaux doivent se protéger de la hausse de dommages oxydatifs et de déchets métaboliques non évacués. On trouve ainsi dans le cœur, le foie et surtout le cerveau des microARN qui limitent les dommages oxydatifs ou qui inhibent les voies métaboliques cellulaires trop coûteuses. Dans les muscles, ces microARN limitent l'atrophie musculaire et régulent la consommation d'énergie en torpeur. On a aussi remarqué qu'il y a plus de protéines « cryoprotectrices » ou « de choc thermique » (utiles contre le stress dû aux passages ischémie-reperfusion lors des réveils) chez les hibernants que les animaux faisant des torpeurs journalières qui en ont eux-mêmes plus que les non-hibernants (pour revue, voir Giroud *et al.*, 2021). Par exemple, on peut citer la protéine GRP75 pour maintenir l'intégrité des mitochondries et diminuer le stress oxydant. Elle est plus présente dans le foie, l'intestin et les muscles des Spermophiles en hibernation comparés aux Spermophiles actifs. Dans la même famille de protéines on trouve les GRP94 et GRP78 qui augmentent dans le cerveau des chauve-souris 30 minutes avant un réveil de torpeur (pour revue, voir Carey *et al.*, 2003). Enfin, les réactions coûteuses en énergie pour les cellules sont arrêtées ou très diminuées comme les transcriptions, traductions, synthèses de protéines (causant jusqu'à 20-30 % d'économies d'énergie, Heldmaier *et al.*, 2004). Ainsi, dans le cerveau les traductions sont largement diminuées (jusqu'à 0,04 % de traduction chez le Spermophile rayé hibernant) pour économiser l'énergie. On constate aussi que des facteurs de transcription sont phosphorylés pour réguler positivement des gènes anti-apoptotiques et recruter des médiateurs de l'inflammation. L'intervention de ces facteurs

permet de réguler l'inflammation et l'apoptose et donc diminuer les dommages cérébraux en torpeur malgré l'absence d'activité électrique du cerveau (pour revues, voir Giroud *et al.*, 2021 et Carey *et al.*, 2003).

Toutes ces données viennent en très grande majorité d'espèces « fat-storing » comme les Spermophiles. Après cette revue bibliographique, de nombreuses interrogations subsistent donc quant au métabolisme en torpeur d'espèces « food-storing » comme le hamster : nous tenterons d'y répondre dans la partie expérimentale.

Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction

Nous avons vu dans la première partie les différentes contraintes des animaux « food-storing » pendant l'hibernation (consommation de nourriture et activation de la fonction digestive, torpeur plus courte) et leurs répercussions potentielles sur la cellule et la mitochondrie notamment l'implication de différentes voies métaboliques. Dans ce contexte, l'objectif premier de mon stage était d'évaluer le métabolisme énergétique de la torpeur chez un mammifère « food-storing ». Au vu des différences métaboliques majeures entre « fat- » et « food-storing », nous avons émis l'hypothèse que l'activité mitochondriale du foie, carrefour du métabolisme et glande digestive, d'un animal « food-storing » est plus élevée que celle d'un « fat-storing » durant la torpeur (hypothèse 1). En outre, en comparant les états de torpeur et de retour à l'eutherme, nous avons fait l'hypothèse que les mécanismes sont proches de ceux des hibernants « fat-storing » à savoir que les mitochondries du foie en torpeur produisent moins d'ATP et oxydent moins d'oxygène (diminution du stade 3 sans baisse d'efficacité) en torpeur qu'en eutherme (hypothèse 2).

Notre deuxième objectif était de comparer les activités des mitochondries du foie avec celles du muscle squelettique. Chez un animal « fat-storing », nous avons vu dans la première partie qu'il existe une plus forte diminution de la respiration stade 3 dans le foie en torpeur que dans le muscle. On peut penser que c'est le contraire chez un animal « food-storing » qui s'alimente pendant l'hibernation (hypothèse 3 : en torpeur, plus de respiration dans le foie que dans le muscle). A l'inverse, comme les « food-storing » se réchauffent plus souvent, grâce notamment à la thermogénèse avec frisson musculaire, une hypothèse alternative est que l'activité mitochondriale serait supérieure ou similaire dans le muscle squelettique par rapport au foie (hypothèse 4 : en torpeur, plus de respiration dans le muscle que dans le foie). Une hypothèse supplémentaire serait enfin une différence d'activité selon le substrat énergétique (hypothèse 5). En effet, d'après Heim *et al.*, 2017, chez le spermophile (espèce « fat-storing »), l'oxydation phosphorylante diminue dans des mitochondries isolées du muscle en période d'hibernation avec des acides gras en guise de substrat. Elle ne diminue pas avec des glucides et elle ne diminue pas dans le foie non plus. De façon similaire, nous pourrions observer des différences d'activité mitochondriale entre les tissus en fonction des substrats utilisés.

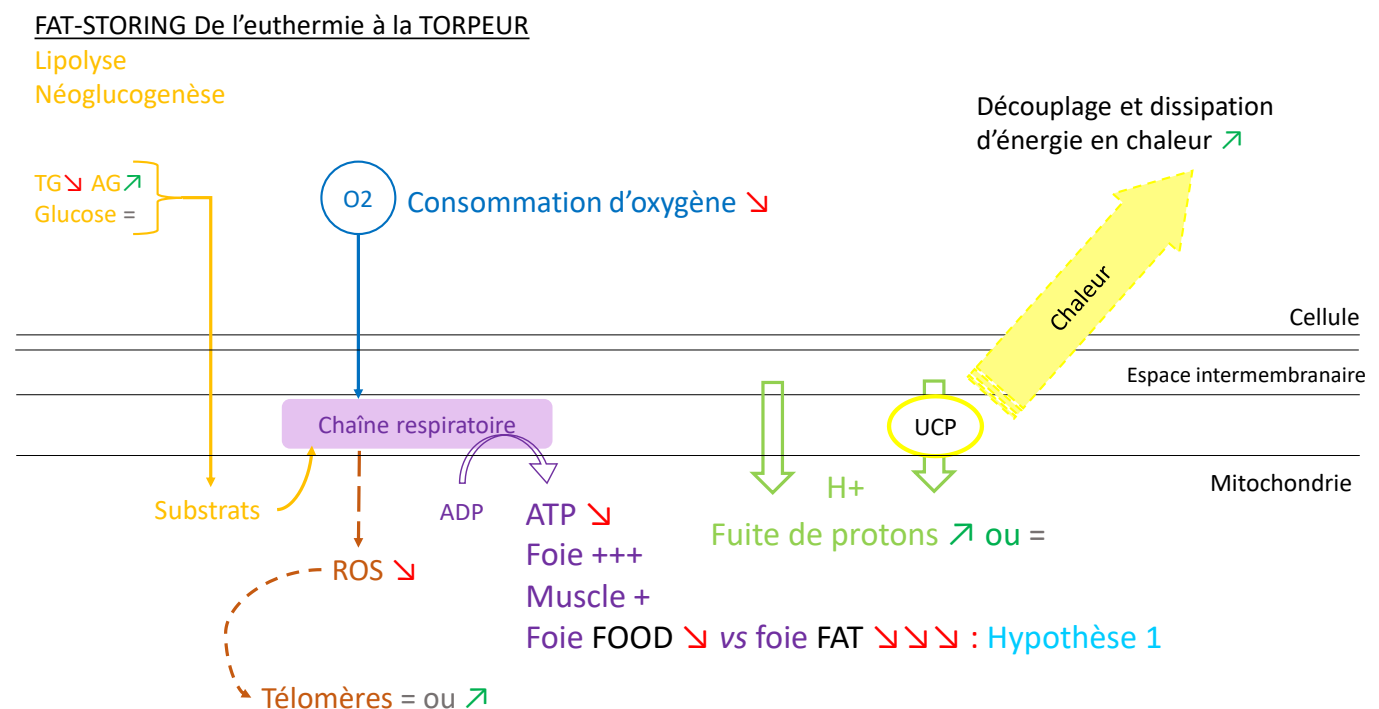
Enfin, nous nous sommes intéressés aux coûts oxydatifs de la torpeur. Nous nous attendions, en accord avec la littérature sur les espèces « fat-storing », à une absence d'augmentation des ROS et de dommages oxydatifs chez le hamster, grâce à la hausse de

fuite de protons pendant la torpeur. Les défenses antioxydantes et la longueur des télomères dans le foie (et peut-être le muscle) entre la torpeur et l'eutherme resteraient alors identiques ou non significativement altérées (hypothèse 6).

Pour répondre à ces objectifs, nous avons effectué sur des hamsters d'Europe de la calorimétrie indirecte (respirométrie), de l'oxymétrie de flux, une quantification de l'ADN mitochondrial, une mesure de la longueur relative des télomères et des dosages ROM-OXY. Les données de cette partie bibliographique sur les espèces « fat-storing » ainsi que nos hypothèses sur le hamster sont résumées sur la Figure 5.

Figure 5 : Schéma bilan des données de la bibliographie sur les mécanismes du métabolisme mitochondrial des espèces « fat-storing » et représentation de nos hypothèses de travail chez les espèces « food-storing ».

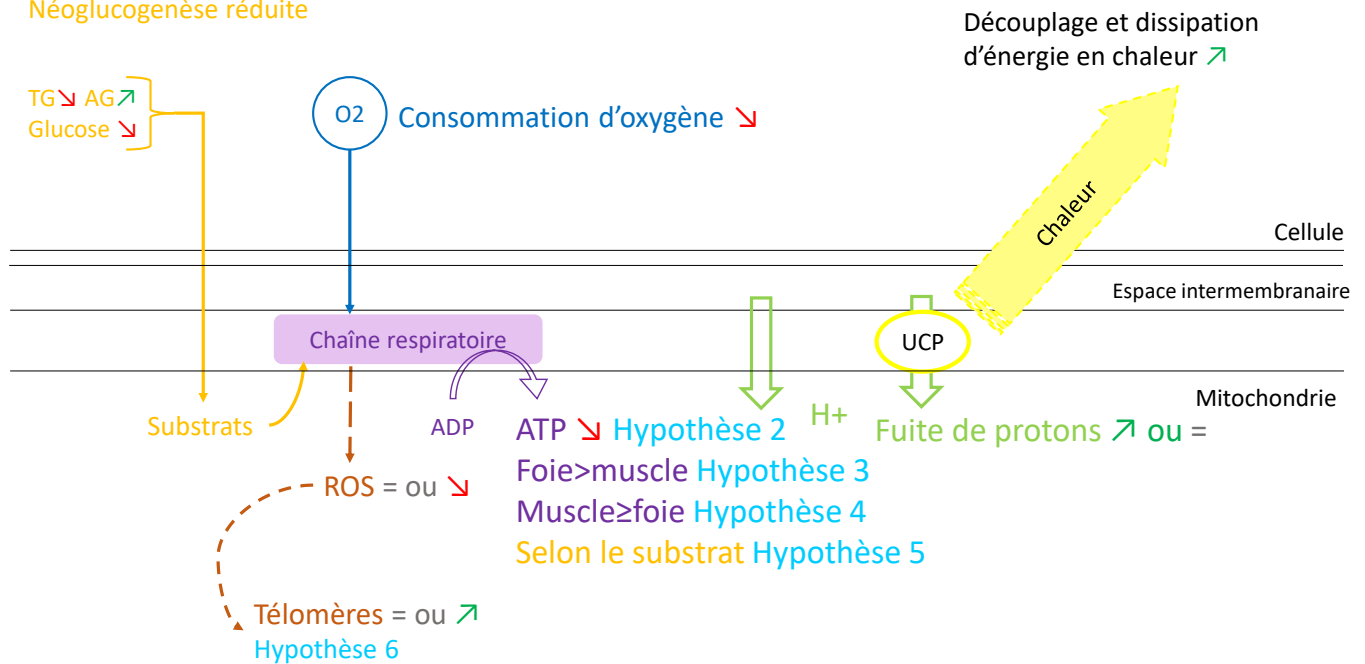
En orange : les substrats et leur métabolisme. En bleu : le dioxygène et sa consommation. En violet : la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP. En marron : la production de ROS et leurs effets sur la longueur relative des télomères. En vert : la fuite de protons par diffusion ou par une protéine UCP. En jaune : la thermogénèse découplée. En cyan : nos hypothèses.



FOOD-STORING De l'eutherme à la TORPEUR

Lipolyse

Néogluco-genèse réduite



2. Matériels et méthodes

A. Animaux et échantillonnage

L'étude a respecté la directive européenne 2010/63/UE sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, et a été approuvée par le Comité d'Ethique (CREMEAS) et le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) sous le numéro 00624-01 le 29 novembre 2013 et renouvelée le 2 avril 2019, sous le numéro APAFIS# 17484-2018103016124862 v3.

Des hamsters d'Europe (*Cricetus cricetus*) ont été élevés à l'animalerie du DEPE de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien. Seize mâles nés en 2020 ont été installés dans la salle de calorimétrie dans des conditions hivernales (température de 10°C et photopériode courte, lumière de 8 à 18 h) pour stimuler l'entrée en torpeur. Pour l'acquisition de calorimétrie, ils étaient placés dans quatre cages métaboliques dans cette même pièce tandis que les autres attendaient dans des cages de gabarit et contenu identiques. Les entrées dans la pièce ne se faisaient que pour remettre de l'eau ou de la nourriture ou en début et fin d'acquisition (lors du changement de groupe d'une cage à l'autre) pour perturber le moins possible les hamsters. Ces 16 individus étaient donc répartis aléatoirement en quatre groupes avec masses moyennes et écarts-types similaires. Dans la pièce, les hamsters avaient de la

nourriture à volonté mais lorsqu'ils étaient dans les cages d'acquisition, ils étaient restreints à 100g de granulés par semaine. L'eau était toujours disponible par biberon.

La calorimétrie (indirecte et non directe, car ce sont les échanges gazeux qui sont mesurés et non la production de chaleur) devait servir à suivre l'évolution de leur intensité métabolique et nous permettre grâce à cette mesure, de les euthanasier soit en torpeur (intensité métabolique très basse), soit en euthermie (intensité métabolique élevée) pour réaliser nos mesures d'oxymétrie de flux. Cependant, la majorité des hamsters n'a pas fait de torpeur ou a mis du temps à entrer en torpeur. La fin de la période d'hibernation se rapprochait et les hamsters avaient un comportement d'hibernation perturbé dans les cages d'acquisition à cause du flux d'air, du bruit des pompes et de la forte humidité. Pour ces raisons, les groupes sont restés deux semaines en acquisition au lieu d'une prévue initialement. Le 4^{ème} groupe n'est donc pas passé dans les cages d'acquisition faute de temps. Une autre conséquence est qu'il n'a pas été possible de détecter les hamsters en torpeur en cages d'acquisition pour l'euthanasie. Les hamsters en torpeur, utilisés pour l'oxymétrie, ont donc été choisis indépendamment des acquisitions de calorimétrie par observation de leur activité, de leur positionnement en boule (cf. Figure 6) et mouvements respiratoires dans les cages normales selon le protocole décrit par Tissier *et al.*, 2021. L'oxymétrie à l'Oroboros demandant 3 à 4 h par tissu, un hamster était euthanasié par jour. Nous avons ainsi constitué un groupe « Torpeur » et un groupe « Euthermie » de respectivement 5 et 6 individus, soit 11 animaux au total pour 11 expériences d'oxymétrie.

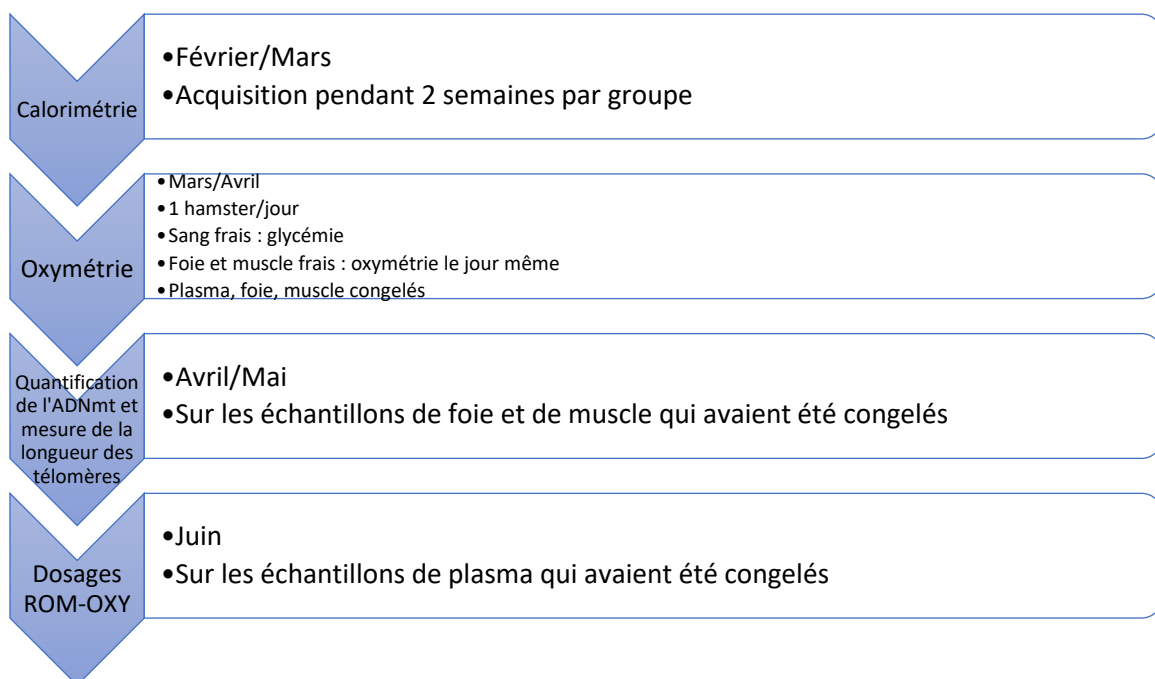
Figure 6 : Photographie montrant un hamster d'Europe en position de torpeur.

Crédit photo : Caroline Habold.



Une fois l'animal endormi sous anesthésie gazeuse (isoflurane 4 % dans l'air à un débit de 2,5 ml/min), la température rectale a été relevée et une prise de sang a été effectuée. Ce sang a permis de mesurer la glycémie. Trois mesures ont été faites sur sang total à l'aide d'un lecteur de glycémie Contour Plus (Ascensia Diabetes Care). Après mise à mort par exsanguination, nous avons immédiatement prélevé des échantillons de foie et de muscle gastrocnémien. Le sang a permis d'obtenir du plasma après centrifugation à 4°C, 4000rpm pendant 15 min. Enfin, des échantillons supplémentaires des tissus (musculaire et hépatique) et plasmas ont été conservés à -80°C pour quantifier l'ADN mitochondrial par qPCR. En effet, pour pouvoir interpréter la respiration mitochondriale par oxymétrie, il faut ramener les résultats à la même quantité de mitochondries. On mesure leur abondance via l'ADNmt. Cela permet de voir si un échantillon a plus de mitochondries qu'un autre puis de ramener les mesures d'oxymétrie à la même quantité d'ADNmt. Des mesures de longueur de télomères ont été réalisées sur les mêmes échantillons de muscle et de foie. Enfin, nous avons fait des dosages de ROM-OXY dans le plasma de nos 11 hamsters. Le but était de mesurer les OXY représentatifs des défenses totales d'une cellule face à l'oxydation (défenses internes comme des enzymes ou exogènes comme des vitamines) et les ROM, déchets rejetés par la cellule après un processus d'oxydation. La chronologie de toutes ces expériences avec les échantillons utilisés est résumée sur la Figure 7 ci-dessous.

Figure 7 : Frise chronologique des expériences de l'étude avec leurs échantillons respectifs



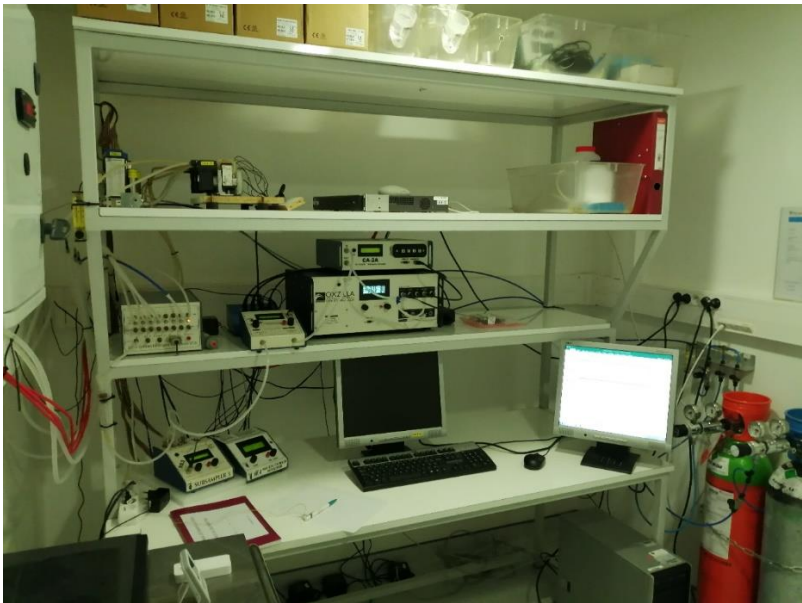
B. Calorimétrie indirecte

L'intensité métabolique est reflétée par la consommation d'O₂ et la production de CO₂. Ces gaz ont été mesurés par une chaîne de respirométrie en circuit ouvert « open flow » et avec aspiration de l'air (Sable Systems International, Las Vegas, USA). Un dispositif de multiplexage permettait les mesures successives sur cinq voies de mesures. Puis, seule une partie du flux était analysée à l'aide d'un dispositif de sous échantillonnage. Les concentrations d'O₂, de CO₂ et d'H₂O ont été mesurées successivement dans les cinq cages (38 × 22 × 15 cm) : quatre avec hamsters et une sans animal, servant ainsi de ligne de base pour la concentration des gaz ambiants. Ces cages de calorimétrie sont visibles, vides, sur la Figure 8. Le débit d'air au sein des cinq voies du circuit était maintenu à 1 l/min et les mesures étaient en continu sur le schéma de 4 minutes par cage toutes les 20 minutes (4 minutes × 5 cages), pendant 10 ou 14 jours selon le groupe de hamsters.

L'ensemble des analyseurs (Oxzilla : O₂, CA 2A : CO₂ et RH300 : H₂O) a été calibré en 2 points de concentration connue. Le point de concentration zéro était fait avec un flux sec d'azote à 300 ml/min pour les trois appareils durant 30 minutes à minima. Concernant le second point de calibration, pour l'oxygène, on utilisait de l'air sec et sans CO₂ pour une valeur à 20,94 % (Tohjima *et al.*, 2005), et pour le CO₂ une bouteille étalon de 1 % de CO₂ dans l'azote (Air Liquide, France). Pour l'humidimètre, on utilisait la technique de la dilution à l'oxygène. Ces calibrations ont été refaites tous les 15 jours.

Les mesures de composition de l'air ambiant ont été effectuées toutes les 20 minutes, par les analyseurs d'H₂O, d'O₂ et de CO₂, qui analysaient à grande vitesse les proportions en O₂ (entre 19 et 21,5 %) et en CO₂ (entre 0 et 2 %). Les seuls arrêts de l'acquisition avaient lieu pour vider les filtres à eau ou remplacer la litière des hamsters quand la cage devenait trop humide au bout d'une semaine.

Figure 8 : Photographies de la salle de calorimétrie à ambiance réglable avec les cinq cages vides et les cinq voies de mesures (en haut) et la salle d'acquisition avec ordinateurs et analyseurs à gaz (en bas). Crédit photo : Alexandre Zahariev



Les données ont été traitées avec une macro à l'aide du logiciel Expedata. Cette macro prend en compte les 9 points de correction à appliquer pour ce type de données (déphasage des signaux, correction barométrique, de température et d'humidité, dérive machine, etc...).

Ces résultats nous ont permis ensuite, sur Excel, de représenter la consommation d'O₂ en l/min ($\dot{V}O_2$) et la production de CO₂ en l/min ($\dot{V}CO_2$) en fonction du temps et de calculer le QR égal à $\dot{V}CO_2 / \dot{V}O_2$.

C. Respiration mitochondriale : oxymétrie de flux et quantité d'ADN mitochondrial

a. Oxymétrie de flux à l'Oroboros

Immédiatement après prélèvement, l'échantillon de muscle et l'échantillon de foie étaient déposés dans un tube de BIOPS (10 mM tampon Ca-EGTA, 0,1 M *free calcium*, 20 mM imidazole, 20 mM taurine, 50 mM potassium 2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, 0,5 mM dithiothreitol, 6,56 mM MgCl₂, 5,77 mM ATP, 15 mM phosphocreatine [PCr], pH 7,1 ; Carvalho *et al.*, 2020) sur glace.

Les mesures ont été faites sur un OROBOROS Oxygraph-2k (© Oroboros Instruments GmbH) contrôlé annuellement. Les chambres de respirométrie étaient lavées avant chaque expérience à l'eau pure, puis à l'alcool 100 % et 70 % et enfin remplies avec une solution de MIR05 maintenue à 37°C (0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂·6H₂O, 60 mM K-lactobionate, 20 mM taurine, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 110 mM sucrose et 1 g/l BSA, pH 7,1 ; Carvalho *et al.*, 2020). L'étalonnage de l'appareil était fait à chaque acquisition en prenant d'une part la concentration d'O₂ dans la chambre fermée avant l'ajout du tissu et des substrats et d'autre part la concentration d'O₂ dans la chambre devenue nulle en fin d'expérience.

Un échantillon était séparé en deux, un morceau dans chaque chambre. Comme expliqué dans la partie bibliographique, les glucides et les graisses interviennent dans le métabolisme de la torpeur. Par conséquent, une chambre a été utilisée en ajoutant des produits de dégradation des glucides comme substrats, l'autre en ajoutant des acides gras. Le muscle était dilacéré de manière à séparer les fibres, avant d'être immergé dans plusieurs bains ; un bain de BIOPS (10 minutes), avec ajout de saponine (1%) pour perméabiliser les myocytes (30 minutes) puis de MIR05 (10 minutes) comme décrit dans De Jong *et al.*, 2022. Environ 4 mg d'échantillon ont été déposés dans chaque chambre pour l'expérience pour rester dans des valeurs exploitables de respiration. Le foie était coupé en fines tranches dans du BIOPS (environ 20 mg), puis placé dans différents bains ; BIOPS avec saponine (1%) (20 minutes) puis MIR05 (10 minutes). Entre 4 et 5 mg de foie ont été déposés dans chaque

chambre (comme décrit par Carvalho *et al*, 2020). Les substrats injectés dans chaque chambre – à l'aide de micro-seringues Hamilton – sont donnés dans le Tableau 1. Il fallait compter une quarantaine de minutes pour injecter tous les substrats et faire les mesures.

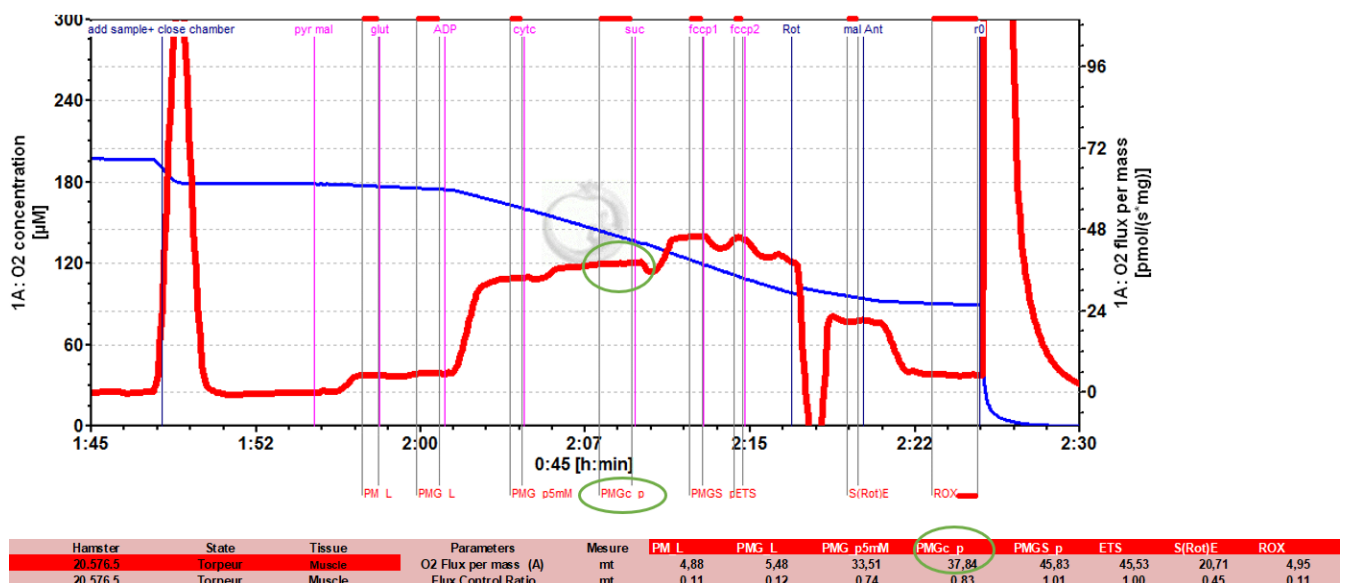
Tableau 1 : Substrats énergétiques et inhibiteurs ajoutés dans chacune des chambres de l'Oroboros dans l'ordre d'injection. Quand il y a plusieurs produits dans une case, c'est qu'ils sont injectés en même temps dans la chambre.

Chambre A (glucides)		Chambre B (acides gras)	
Substrat injecté	Quantité dans la chambre (mM)	Substrat injecté	Quantité dans la chambre (mM)
Pyruvate	5	Palmitoyl-carnitine	0,04
Malate	5	Malate	5
Glutamate	10	Octanoyl-carnitine	0,2
Mesure de LEAK			
ADP	8,5	ADP	5
Cytochrome c	0,01	Cytochrome c	0,01
Succinate	10	Pyruvate	5
		Glutamate	10
		Succinate	10
Mesure de l'OXPPOS			
FCCP (titration)	0,001	FCCP (titration)	0,001
Mesure de l'ETS			
Rotenone	0,005	Rotenone	0,005
Malonate	5	Malonate	5
Antimycine A	0,0025	Antimycine A	0,0025
Mesure du facteur correctif ROX			

Le logiciel « DatLab – O2k connect » d'Oroboros Instruments a permis de suivre la concentration d'O₂ dans les chambres et le flux d'O₂ par masse en fonction du temps, ce sont

les courbes bleue et rouge, respectivement, que l'on voit sur la Figure 9. Les traits verticaux roses correspondent aux injections dans la chambre A – les substrats dérivés des glucides, dans l'ordre donné dans le Tableau 1. Les traits verticaux bleus correspondent aux actions ou injections qui ont été faites dans les chambres A et B (actions communes comme l'ajout des échantillons ou inhibiteurs communs comme la roténone, que ce soit pour le protocole avec dérivés de glucides ou avec acides gras). Pour chaque substrat ajouté, la valeur du flux d'O₂ par masse correspondant a été relevée graphiquement en sélectionnant le plateau correspondant (valeur moyenne sur cette période). Un exemple de lecture de la courbe est présenté en vert : après ajout de l'échantillon et fermeture de la chambre (en bleu) puis ajout de pyruvate, malate, glutamate, ADP et cytochrome c (en rose), le flux de dioxygène par masse d'échantillon se stabilisait autour de la valeur moyenne de 37,84 pmol/(s*mg) ; il est noté PMGc_p et correspond à la phosphorylation oxydative (souvent notée OXPHOS dans la littérature). Avec la même méthode de lecture on obtenait les valeurs de LEAK (noté PMG_L en rouge), d'ETS et de ROX.

Figure 9 : Exemple de sélection des plateaux du flux d'O₂ par masse sur le graphique DatLab pour la chambre A, ici pour un échantillon de muscle du hamster 20.576.5 en torpeur.



Les données ont ensuite été exportées et les calculs faits sur Excel. Pour nos résultats, nous avons choisi de calculer et nous concentrer uniquement sur trois indicateurs :

- Le rapport LEAK/ETS c'est-à-dire la part de respiration non couplée par rapport à la respiration maximale.
- Le rapport RCR (*Respiratory Control Ratio*) c'est-à-dire le rapport entre la respiration couplée (en présence d'ADP pour la synthèse d'ATP) et la respiration non couplée (soit

OXPHOS_{ADP}/LEAK ou Stade3/LEAK). Autrement dit d'après Salin *et al.*, 2018 : « Un RCR élevé indique que les mitochondries ont une capacité élevée de phosphorylation de la respiration par rapport à la respiration nécessaire pour compenser la fuite de protons. ».

Nous avons préféré travailler en rapports plutôt qu'en valeurs absolues afin de mieux approcher ce que représente la part de respiration découplée par rapport à la respiration maximale et ainsi normaliser les valeurs (la respiration maximale pourrait être très différente entre des individus ce qui changerait l'interprétation du LEAK seul) comme dans la publication de De Jong *et al.* (2022), par exemple.

- CytC : pour s'assurer de la bonne exécution du protocole, notamment la préparation des tissus. En effet, il permet de vérifier l'intégrité de la membrane mitochondriale externe, gage de qualité de la manipulation. L'augmentation de la respiration à l'ajout du cytochrome C par rapport à la respiration maximale à l'ajout d'ADP ne doit pas dépasser 10 % (De Jong *et al.*, 2022).

Nous avons ensuite fait nos analyses statistiques à partir de ces indicateurs (cf. ci-dessous « Analyse statistique »).

b. Quantification de l'ADN mitochondrial (ADNmt)

L'ADNmt a été extrait à partir des tissus des 11 individus étudiés (5 en torpeur, 6 en euthermie inter-torpeur) avec les kits Nucleospin tissue (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant mais avec l'ajout d'une digestion à la RNase A pour éliminer les ARN. Après dénaturation, le nombre relatif de copies d'ADNmt a été mesuré par une réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR) avec le kit Sybr green de Promega, GoTaq® qPCR master mix : on mesurait l'intensité de la fluorescence émise par l'intercalage du sybr green dans l'ADN double brin. La mesure était corrigée par une mesure simultanée de l'ADN nucléaire (protocole de Lee *et al.* (2010), adapté au hamster). Enfin, la valeur relative en ADN mitochondrial était faite par rapport au pool de 11 individus, qui servait de contrôle. Le gène nucléaire utilisé était c-Myc. Les séquences de *primers* pour c-Myc sont 5'-GAG GGC CAA GTT GGA CAG TG-3' en amorce sens et 5'-TTG CGG TTG TTG CTG ATC TG-3' en amorce anti-sens.

Nous avons ainsi obtenu la quantité d'ADNmt, ramenée à la masse de l'échantillon préalablement pesé (c'est ce protocole qui a été choisi à l'IPHC mais elle aurait aussi pu être ramenée à la quantité d'ADN nucléaire). Elle est notée DM (densité mitochondriale) dans nos analyses statistiques.

D. Mesure de la longueur des télomères

Des mesures de télomères ont été effectuées à partir d'ADN extraits des échantillons de tissus (foie et muscle). L'extraction a été réalisée en utilisant le kit NucleoSpin tissue (Macherey Nagel) en accord avec le protocole du fabricant. L'ADN obtenu après détermination de sa concentration au nanodrop a été dilué à la même concentration (2,5 ng/μl). La longueur relative des télomères a été mesurée dans les différents tissus par PCR quantitative en adaptant le protocole de Cawthon (2002) au hamster d'Europe. Le principe était de déterminer le nombre d'amplifications nécessaires avant de dépasser un seuil de fluorescence détectable par la machine. On obtenait la quantité de télomères répétés par rapport à un gène de référence (c-Myc), invariable en nombre de copies donc donnant toujours le même signal fluorescent.

Les séquences des amorces de c-Myc étaient les mêmes que précédemment. Les séquences de *primers* utilisées pour les télomères étaient 5'- CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT-3' en amorce sens et 5'- GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT-3' en amorce anti-sens. Les échantillons individuels étaient comparés au pool de la population pour chaque organe (la longueur relative du pool valait donc 1).

E. Dosages ROM-OXY

Les ROM ont été dosés par un kit d-ROMs Test et les OXY par un kit OXY-Adsorbent Test, tous deux de la marque Diacron, Italie. Ce sont des tests colorimétriques. Pour le kit ROM, plus le puits est coloré en rose et plus il contient de ROM. Pour le kit OXY, plus le puits est coloré en rose et moins il contient d'OXY. Nous avons suivi le protocole donné par les notices respectives avec les sérums de hamsters dilués au 1/200^{ème}. Nous avons travaillé en ½ plaque de 96 puits, sur glace. Les dépôts ont tous été faits en duplicata, y compris le blanc (eau) et le calibrateur fourni dans le kit. Les temps d'incubation des sérums avec le mix de réactif ont été respectés. Enfin, la lecture a été faite à 510 nm à 37°C avec un spectrophotomètre Tecan.

F. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (Version 3.5.1 ; R Core Team 2018). L'inspection de la normalité des données et des résidus a été réalisée par l'intermédiaire des quantile-quantile plots et histogrammes de distribution. Les mesures ayant été réalisées plusieurs fois sur les mêmes individus, l'interdépendance entre les données a été prise en compte en intégrant un facteur *random* dans les modèles statistiques (ID pour identité des individus).

a. Masse corporelle et glycémie

Il s'agissait de comparer la masse lors de l'euthanasie et la glycémie (en faisant la moyenne des trois mesures au glucomètre pour chaque individu) entre les hamsters en torpeur et ceux en eutherme. Les données étant peu nombreuses et non distribuées selon une loi normale, nous avons effectué des tests de Mann Whitney de comparaison de moyennes.

b. Oxymétrie de flux

Les mesures présentant une hausse de la respiration mesurée après ajout de Cytochrome C supérieure à 30 % ont été supprimées, car traduisant une altération de la membrane mitochondriale. Usuellement les valeurs supérieures à 10 % sont retirées. Cependant, dans la mesure où les manipulations ont été standardisées, réalisées par les mêmes manipulateurs, et sur un même fragment de muscle séparé en fin de préparation dans les deux cuves de l'Oroboros, nous avons conservé les valeurs lorsque celles d'au moins une des deux chambres A ou B étaient correctes.

Nous avons utilisé des modèles linéaires mixtes pour tester l'effet du substrat (« CHO » pour les dérivés de glucides et « FAT » pour les acides gras), de l'organe (« muscle » et « foie ») et du groupe (« torpeur » ou « eutherme ») sur la respiration mitochondriale (LEAK et RCR). La quantité d'ADN mitochondrial (« DM ») a été déterminée dans chaque échantillon, et intégrée comme facteur fixe dans chaque modèle. Nous avons sélectionné le meilleur modèle en comparant les AICc (*Akaike Information Criterion corrected for small sample size*, Barton, 2018).

c. Mesure de la longueur relative des télomères

Nous avons utilisé des modèles linéaires mixtes pour tester l'effet de l'organe (« muscle » ou « foie »), du groupe (« torpeur » ou « eutherme »), leur interaction, et la masse corporelle (« BM » pour *body mass*) sur la longueur des télomères. La répartition de la masse des animaux présentant une répartition bimodale (en raison de patterns d'hibernations différents pour les animaux), nous avons créé une variable « size » avec deux facteurs, pour séparer les individus en deux groupes (BM inférieure ou supérieure à 380 g, la valeur médiane), et l'avons incluse dans le modèle à la place de BM. Nous avons sélectionné le meilleur modèle en comparant les AICc (Barton, 2018).

d. Dosages ROM-OXY

Sur Excel, pour chaque individu, la moyenne des deux duplicatas a permis d'avoir la quantité moyenne de ROM ou OXY. Après avoir établi la quantité moyenne par groupe, nous avons

enlevé les valeurs de certains duplicatas trop éloignées de la moyenne du groupe pour les individus où la différence entre les duplicatas était supérieure à 10 %. Les valeurs restantes sont les valeurs finales que nous avons utilisées pour comparer les groupes torpeur et euthermie en faisant un test de Mann Whitney.

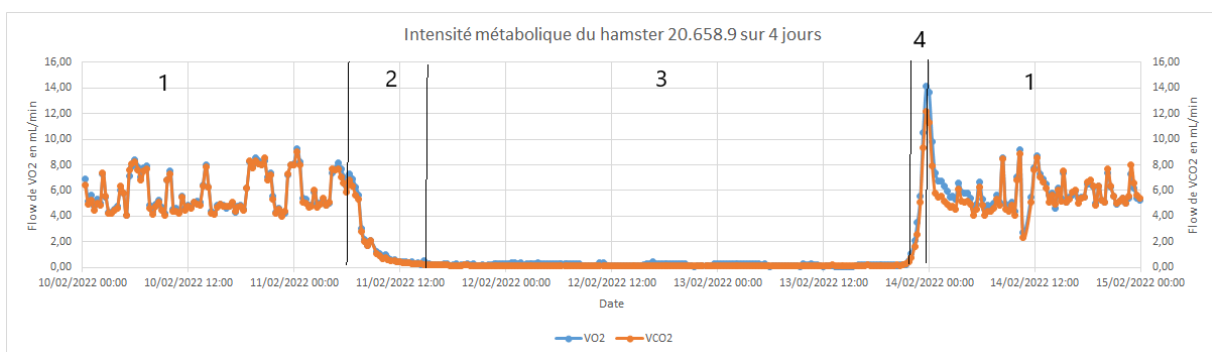
3. Résultats

A. Calorimétrie indirecte

Sur nos 16 hamsters sélectionnés, seulement 12 (trois groupes de quatre hamsters) sont passés dans les cages de respirométrie pour qu'on puisse enregistrer leurs $\dot{V}O_2$ et $\dot{V}CO_2$ comme expliqué précédemment. Sur ces 12 hamsters, un seul est entré en torpeur, donnant la Figure 10. On voit que $\dot{V}O_2$ et $\dot{V}CO_2$ variaient conjointement et reflétaient les variations de la respiration et donc du métabolisme. Du 11 février 05h17 au 13 février 23h40, la $\dot{V}O_2$ et la $\dot{V}CO_2$ ont diminué jusqu'à des valeurs quasi-nulles puis, ont augmenté de nouveau. Cela correspond à la forte baisse de métabolisme qui a lieu lors d'une torpeur, celle-ci ayant duré 67 h.

On peut voir une phase d'euthermie, puis une entrée en torpeur, la maintenance en torpeur et enfin le réchauffement avec un pic métabolique avant une nouvelle phase d'euthermie (Figure 10).

Figure 10 : Évolution de $\dot{V}O_2$ et $\dot{V}CO_2$ d'un hamster hibernant en cage de calorimétrie en fonction du temps où l'on distingue plusieurs stades physiologiques : 1 – euthermie, 2 – induction de la torpeur, 3 – torpeur, 4 – réchauffement.

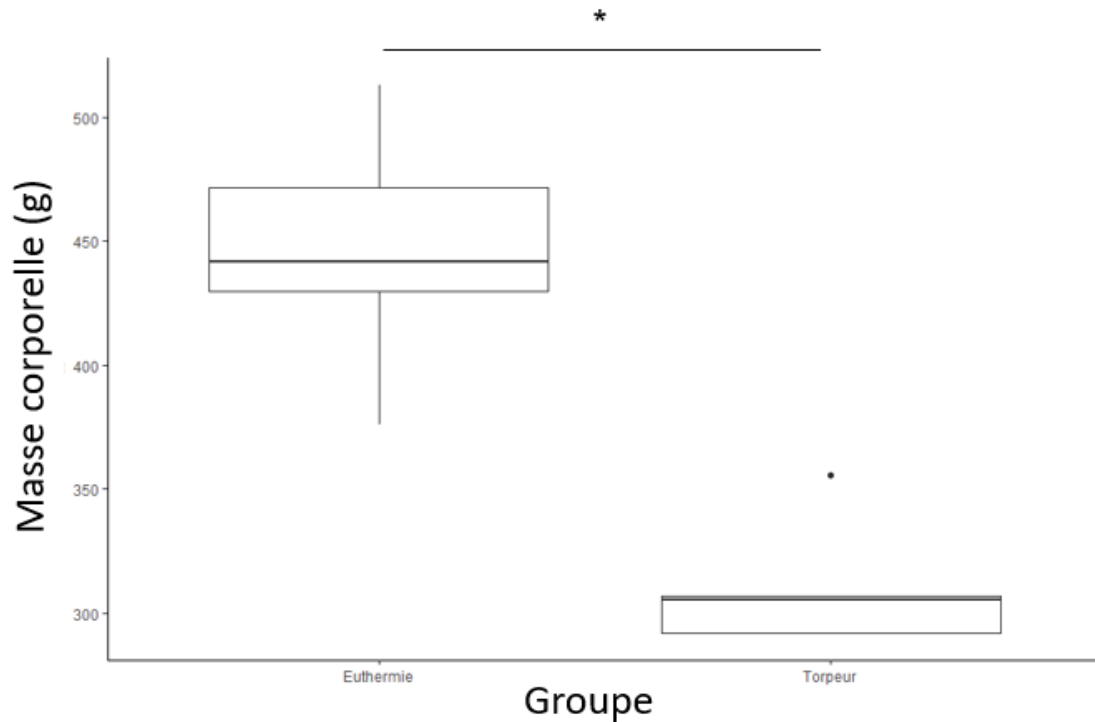


B. Masse corporelle et glycémie

On constate sur la Figure 11 une différence de masse entre les hamsters éveillés (moyenne = 446,7 g ; écart-type SD = 46,8 g ; max = 513,0 g ; min = 376,1 g) et les hamsters en torpeur (moyenne = 310,3 g ; écart-type SD = 26,2 g ; max = 355,4 g ; min = 292,0 g). Les hamsters en torpeur étaient significativement plus maigres ($W = 30$; p value = 0,004329 ; $n = 11$).

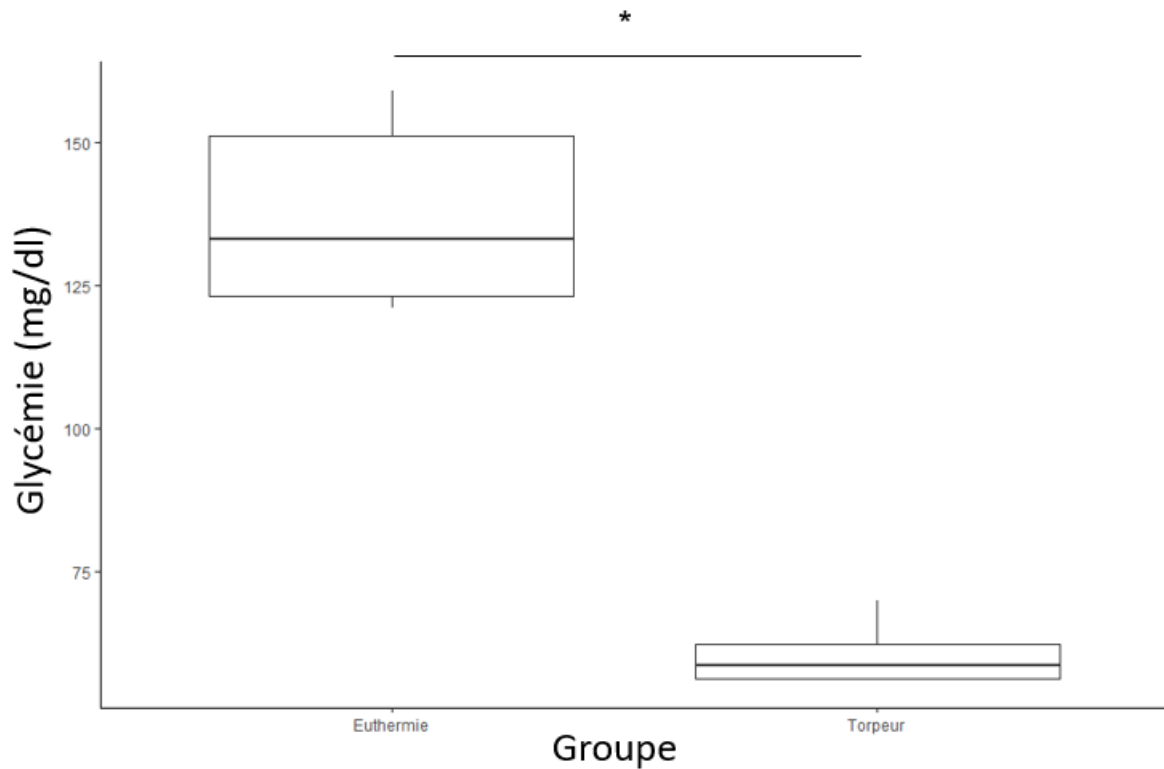
Dans la Figure 11 et les suivantes, une étoile ou une différence de lettre montre une différence significative.

Figure 11 : Effet du stade physiologique sur la masse corporelle au moment du prélèvement (*p value < 0,01) (n = 11).



Nous avons aussi observé que la glycémie des hamsters en euthermie était de $137,17 \pm 16,96$ mg/dl tandis qu'elle était de $60,72 \pm 5,74$ mg/dl chez les hamsters en torpeur (Figure 12). Les hamsters en torpeur avaient donc une glycémie moyenne significativement plus basse (test de Mann-Whitney, $W = 30$; p value = 0,007969 ; n =11).

Figure 12 : Effet du stade physiologique sur la glycémie (mg/dl) (*p value < 0,01) (n = 11).



C. Respiration mitochondriale : oxymétrie de flux et quantité d'ADN mitochondrial

Nous avons analysé les indicateurs LEAK/ETS et RCR à l'aide de modèles linéaires. Avant cela, il fallait savoir si la densité mitochondriale DM avait une influence (plus de mitochondries signifiant plus de respiration). Nous avons utilisé le modèle linéaire présenté dans le Tableau 2. Ce tableau et les suivants ont été obtenus avec la fonction *summary()* sur R, Df désigne le degré de liberté. Nous avons constaté qu'il n'y avait aucune différence significative. La quantité de mitochondries ne dépendait pas de l'organe ou de l'état de l'animal. Elle est donc une variable fixe dans les modèles suivants.

Tableau 2 : Tableau des modèles linéaires pour les facteurs de la densité de mitochondries dans les échantillons de tissus (n = 11 pour chaque organe et chaque stade).

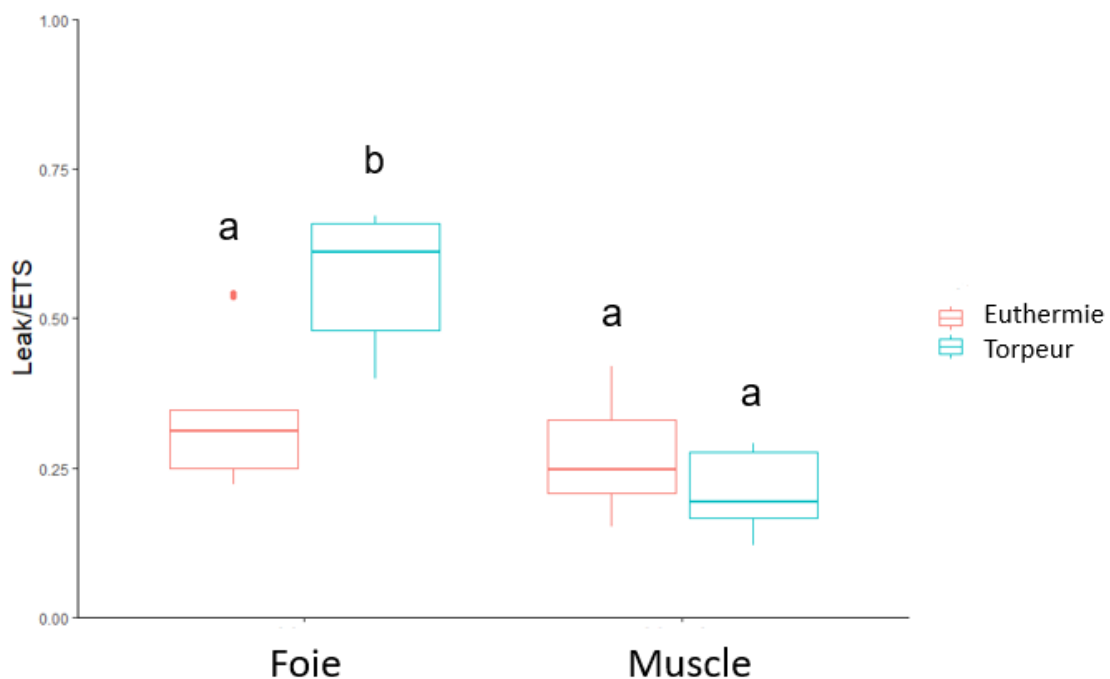
	Df	P value
Organe (foie/muscle)	30,17	0,25
Groupe (torpeur/euthermie)	8,63	0,48

Ensuite, nous avons réalisé un modèle linéaire prenant en compte tous les facteurs : DM (fixe), le groupe (hamsters en euthermie ou en torpeur), le substrat (dérivés de glucides ou acides gras) et l'organe (foie ou muscle gastrocnémien). Le foie d'un hamster (le n°20.167.4) qui n'avait pas subi l'oxymétrie aux mêmes horaires que les autres présentaient des valeurs aberrantes et a donc été écarté pour la suite. Nous avons aussi constaté que le substrat n'a pas d'effet significatif, il a donc été enlevé du modèle par la suite. Pour LEAK/ETS, après sélection du meilleur modèle, nous avons obtenu le modèle linéaire du Tableau 3. Nous avons alors observé que LEAK/ETS - c'est-à-dire la respiration non couplée (les protons ne passent pas par l'ATP-synthase) par rapport à la respiration maximale des mitochondries - dépendait significativement du groupe et de l'organe selon le groupe : la part de respiration découplée était plus élevée en torpeur dans le foie (Figure 13).

Tableau 3 : Tableau des modèles linéaires pour les facteurs de LEAK/ETS (n = 11 pour chaque organe et chaque stade).

	Df	P value
DM (fixe)	20,32	0,65
Organe	27,91	0,33
Groupe	26,72	0,0002
Organe*Groupe	26,02	0,0005

Figure 13 : Effet du stade physiologique et de l'organe sur l'indicateur LEAK/ETS des mitochondries (n = 11 pour chaque organe et chaque stade).

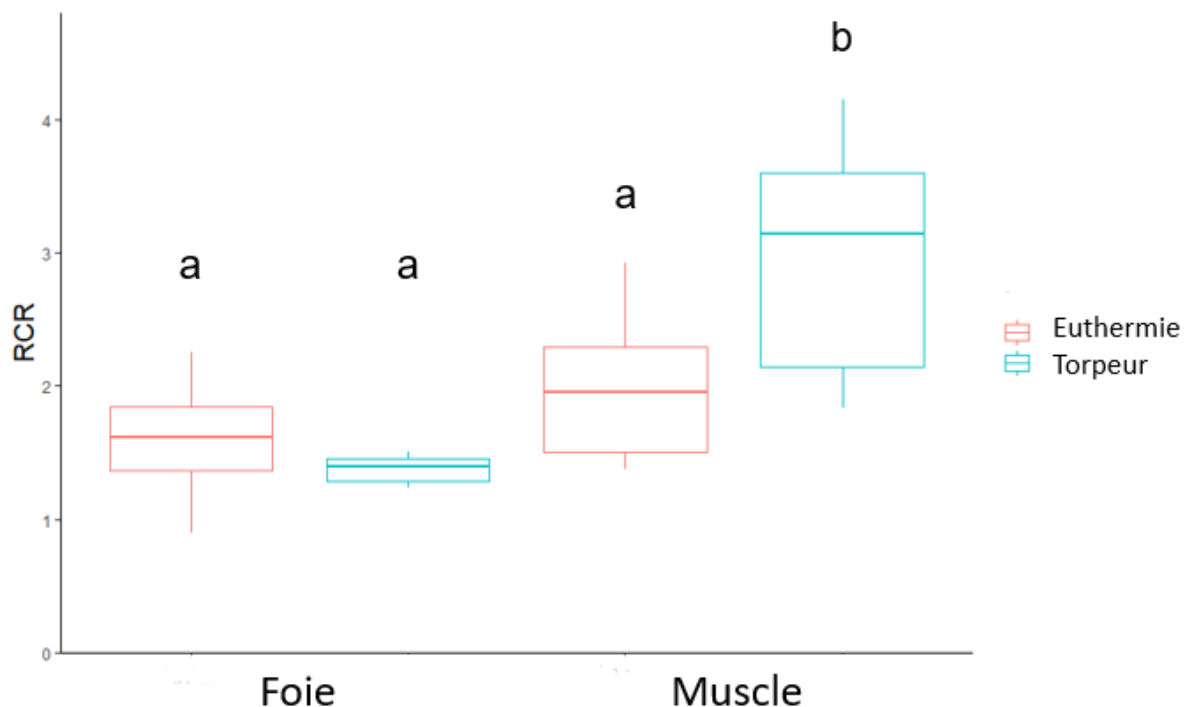


Avec la même démarche pour RCR, nous avons obtenu le modèle présenté dans le Tableau 4. On voit sur la Figure 14 que seule l'interaction entre le groupe et l'organe avait une influence significative sur le RCR. Le rapport en respiration couplée sur découplée était le plus élevé dans le muscle en torpeur : la mitochondrie était donc plus efficace dans le muscle en torpeur car moins d'O₂ et de substrats partaient dans la fuite de protons.

Tableau 4 : Tableau des modèles linéaires pour les facteurs de RCR (n = 11 pour chaque organe et chaque stade).

	Df	P value
DM (fixe)	28,00	0,56
Organe	28,00	0,27
Groupe	28,00	0,35
Organe*Groupe	28,00	0,01

Figure 14 : Effet du stade physiologique et de l'organe sur l'indicateur RCR des mitochondries (n = 11 pour chaque organe et chaque stade).



D. Longueur relative des télomères

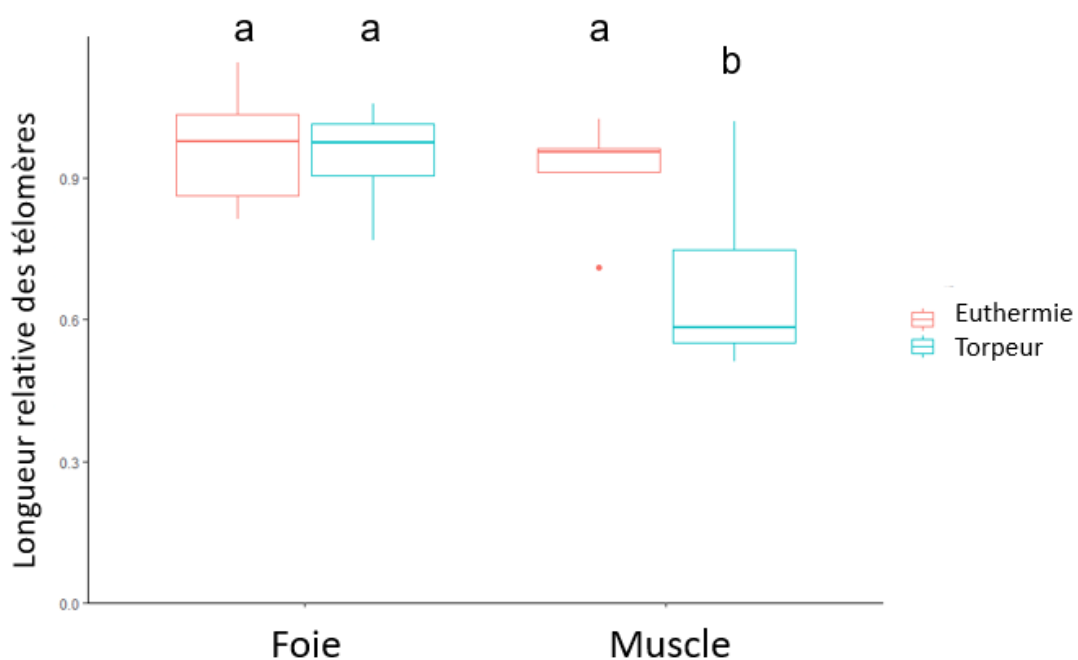
Après avoir adapté notre modèle aux deux groupes de masses différentes (cf. Matériel & Méthodes), nous avons obtenu le modèle linéaire du Tableau 5. Seuls l'organe et l'interaction

entre l'organe et le groupe avaient une corrélation significative avec la longueur des télomères (Tableau 5). Plus précisément, les télomères des cellules du muscle en torpeur étaient environ plus courts d'un tiers, avec une longueur relative moyenne autour de 0,6 contre plus de 0,9 chez les autres cellules (Figure 15).

Tableau 5 : Tableau des modèles linéaires pour les facteurs de la longueur relative des télomères (n = 11 pour chaque organe et chaque stade).

	Df	P value
Masse	7,61	0,48
Organe	28,83	0,03
Groupe	8,49	0,24
Organe*Groupe	29,56	0,03

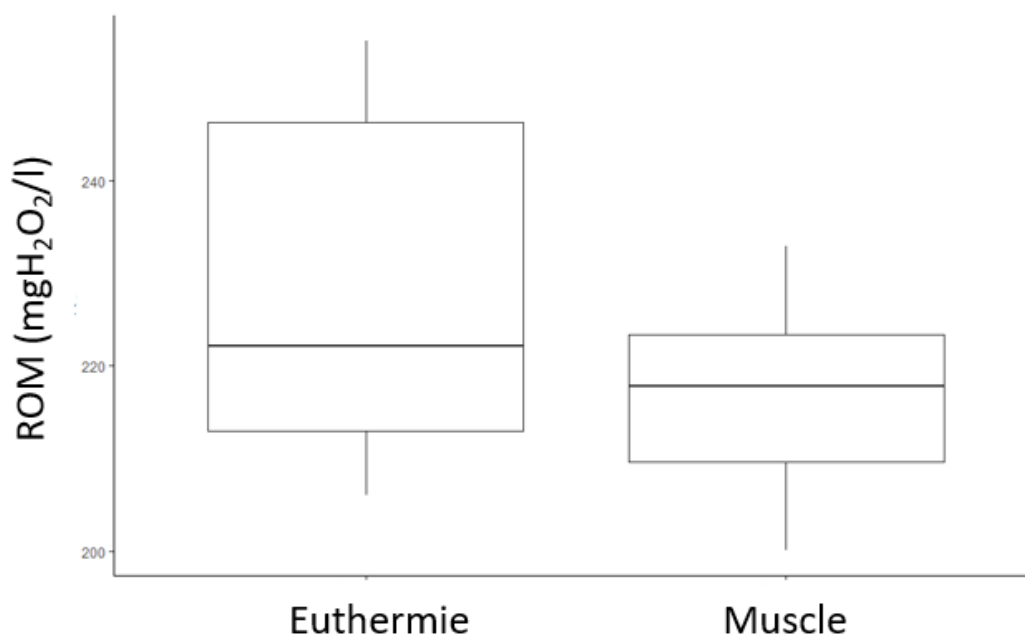
Figure 15 : Effet du stade physiologique et de l'organe sur la longueur relative des télomères (n = 11 pour chaque organe et chaque stade).



E. Dosages ROM-OXY

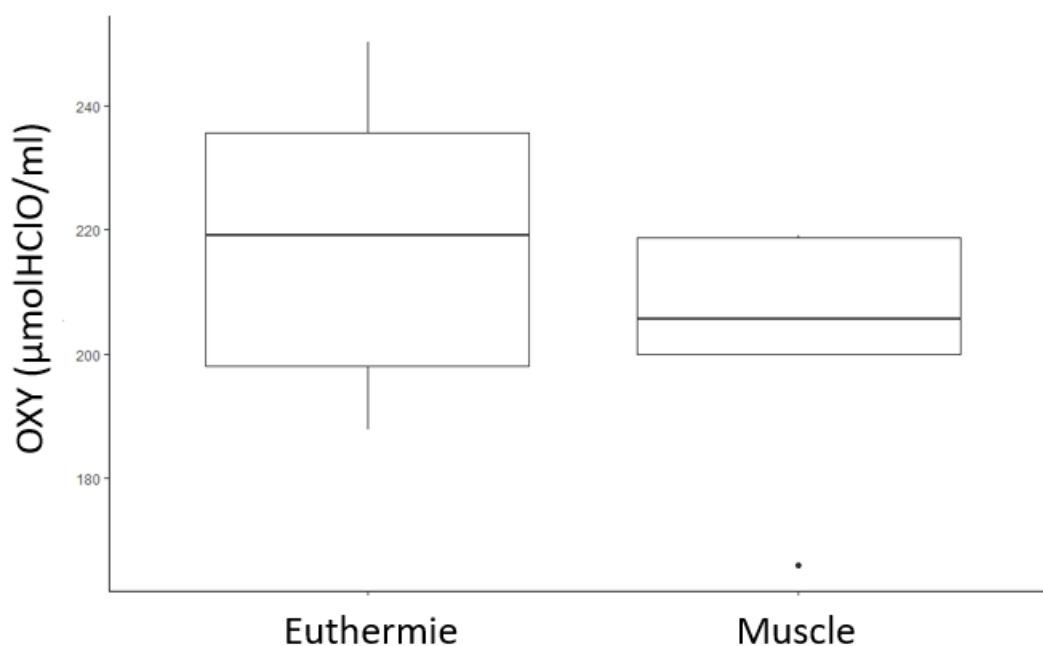
La moyenne des d-ROMs \pm SD des hamsters en euthermie était de $228,25 \pm 21,04$ mgH₂O₂/l et n'était pas significativement différente de celle des hamsters en torpeur de $216,75 \pm 12,58$ mgH₂O₂/l (test de Mann-Whitney, W = 19 ; p value = 0,5368 ; n = 11) (Figure 16).

Figure 16 : Effet du stade physiologique sur la quantité trouvée de déchets ROMS dans le sérum (n = 11).



Le même constat est fait concernant les défenses antioxydantes (Figure 17) : la moyenne des OXY \pm SD des hamsters en euthermie était de $218,09 \pm 24,98 \mu\text{molHClO/ml}$ et n'était pas significativement différente de celle des hamsters en torpeur de $201,91 \pm 21,70 \mu\text{molHClO/ml}$ (test de Mann-Whitney, $W = 20$; $p \text{ value} = 0,4286$; $n = 11$).

Figure 17 : Effet du stade physiologique sur la quantité trouvée de défenses antioxydantes OXY dans le sérum (n = 11).



4. Discussion

A. Des résultats inattendus

Nos différentes mesures sont certes préliminaires mais montrent cependant pour la première fois chez une espèce « food-storing » le fonctionnement mitochondrial pendant l'hibernation. Nous avons également pu distinguer des différences entre organes et entre espèces « fat » et « food-storing ». Voici les résultats principaux. Ils ne sont pas toujours en accord avec nos hypothèses, comme le montrent les schémas-bilans des Figures 5 et 18, et/ou avec la littérature. Ils feront l'objet d'une discussion en suivant la logique ci-dessous :

- Dans le foie en torpeur, la part de respiration découplée augmente (LEAK/ETS plus élevé) mais sans changement d'efficacité mitochondriale (RCR inchangé entre la torpeur et l'euthermie). Ce résultat confirme l'hypothèse 2 selon laquelle il y aurait moins de production d'ATP et moins d'utilisation d'oxygène sans changement d'efficacité en torpeur, comme vu dans la bibliographie chez les hibernants « fat-storing » ;
- Dans le muscle en torpeur, le LEAK/ETS n'est pas différent de l'euthermie, en revanche le RCR y est significativement plus élevé. Le muscle est ainsi plus efficace que le foie. Cela confirme l'hypothèse 4 selon laquelle, malgré la diminution du stade 3 en torpeur, les mitochondries du muscle ont une capacité de production d'ATP supérieure au foie par rapport à la quantité de mitochondries. En revanche, nous n'avons pas vu de différence significative selon le substrat, l'hypothèse 5 est donc réfutée.
- Les télomères étaient plus courts dans le muscle en torpeur, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse 6 selon laquelle il n'y aurait pas de différence ou alors que les télomères raccourciraient pendant le réchauffement et non en torpeur. Nos dosages du plasma n'ont pas montré de différence entre les groupes concernant les déchets de l'oxydation et les défenses antioxydantes.

Enfin, après avoir discuté ces résultats nous évoquerons les critiques sur nos expériences et les perspectives afin de mieux appréhender le métabolisme des hibernants « food-storing ».

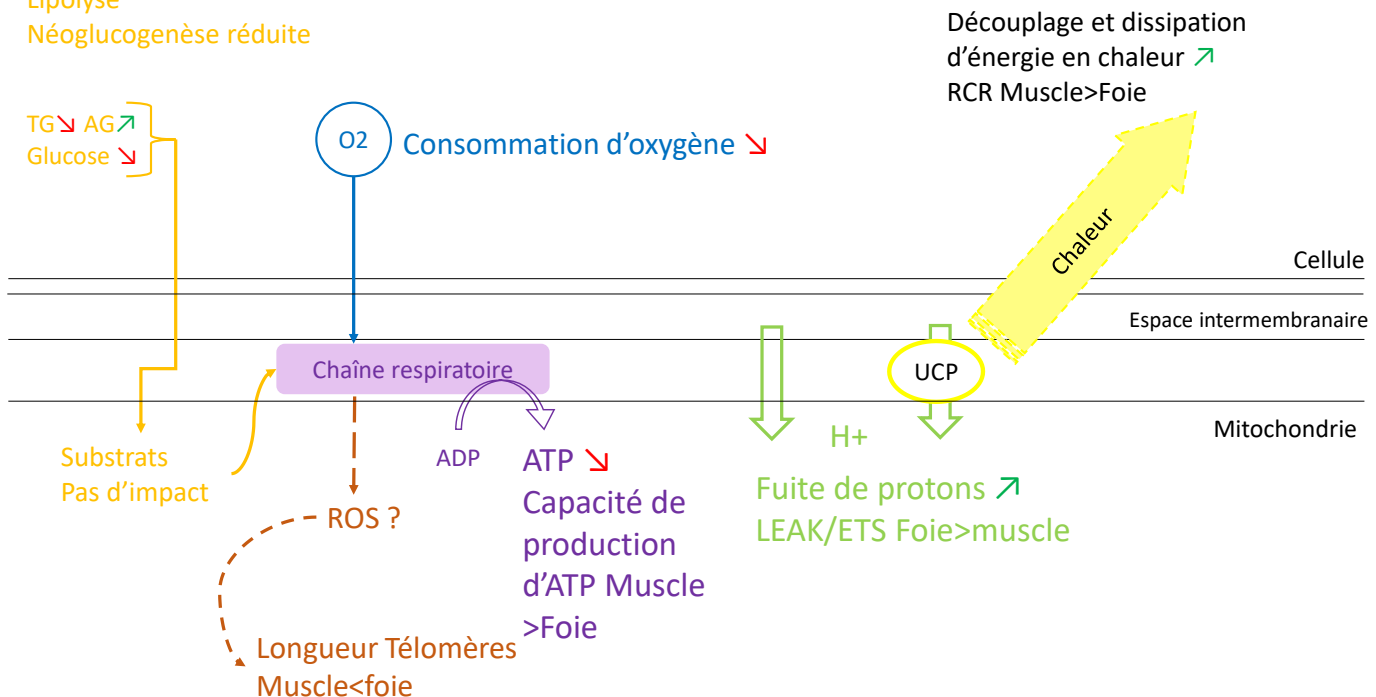
Figure 18 : Schéma bilan des mécanismes observés de l'euthermie à torpeur chez les hamsters d'Europe lors des mesures.

En orange : les substrats et leur métabolisme. En bleu : le dioxygène et sa consommation. En violet : la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP. En marron : la production de ROS et leurs effets sur la longueur relative des télomères. En vert : la fuite de protons par diffusion ou par une protéine UCP. En jaune : la thermogénèse découplée.

FOOD-STORING De l'euthermie à la TORPEUR : Résultats

Lipolyse

Néoglucogénèse réduite



B. Des différences d'état métabolique (masse et glycémie) entre les groupes, cohérentes avec les données sur la torpeur

Avant d'évoquer nos résultats d'oxymétrie, il est important de noter les différentes caractéristiques entre les deux groupes d'animaux. Elles sont cohérentes avec les données actuelles. Tout d'abord, nous avons déjà remarqué que le seul hamster étant entré en torpeur dans les cages d'acquisition de calorimétrie était le plus maigre. Les pesées au moment de l'euthanasie ont montré que les animaux du groupe en torpeur avaient une masse significativement plus faible que les hamsters en euthermie, en accord avec la bibliographie (Siutz et Millesi, 2017 ; Siutz *et al.*, 2017 ; Weitten *et al.*, 2018). Celle-ci montrait que les animaux avec moins de ressources (moins de réserves de graisse et moins de nourriture à disposition dans la cachette) étaient plus susceptibles d'entrer en torpeur et d'effectuer une hibernation plus longue. En réalisant les expériences fin mars, nous avons donc sélectionné les derniers individus les plus maigres encore en hibernation.

Les mesures de glycémie sont aussi en accord avec les connaissances actuelles. Les animaux en euthermie avaient une glycémie deux fois plus élevée. Cela rejoint les résultats de l'étude de Weitten *et al* (2013) : chez les espèces « food-storing », la glycémie diminue en torpeur à cause de l'épuisement du glycogène et de changements hormonaux (baisse de glucagon, d'insuline, de leptine et hausse d'adiponectine en torpeur) et ré-augmente au retour à l'euthermie après réalimentation.

C. Une diminution du stade 3 dans les mitochondries du foie en torpeur sans perte d'efficacité

Les deux groupes ont permis de faire des mesures à l'oxymétrie de flux sur Oroboros afin de répondre à nos deux premiers objectifs : évaluer le métabolisme en torpeur en comparaison à l'euthermie chez une espèce « food-storing », puis comparer différents organes, le muscle et le foie.

Nos résultats d'oxymétrie ont d'abord montré que le foie en torpeur avait le rapport LEAK/ETS significativement plus élevé, ce qui signifie qu'il a la plus grande part de respiration non couplée sur la respiration maximale de la mitochondrie. On peut en déduire que dans le foie en torpeur, quel que soit le substrat, il y a du découplage : la synthèse d'ATP diminue et la production de chaleur augmente. Brown *et al.*, en 2012, ont trouvé que les mitochondries du foie en torpeur du spermophile rayé réduisaient leur respiration de 88 % à 10°C et aussi car d'après Staples, le stade 3 diminue de 70 % en torpeur (notamment avec du succinate, Brown *et al.*, 2012). S'ajoutant à ces informations, nos résultats montrent un RCR dans le foie non significativement différent entre euthermie et torpeur. Pour rappel, le RCR est un indicateur d'efficacité car il représente la respiration produisant de l'ATP sur la respiration compensant la fuite de protons : il reflète l'efficacité du couplage entre consommation d'O₂ et synthèse de l'ATP. D'une part, cela valide notre hypothèse 2. D'autre part, on peut supposer que notre augmentation du LEAK/ETS dans le foie en torpeur serait liée à une production de chaleur, contribuant au mécanisme de thermogénèse afin d'éviter l'abaissement de la température corporelle en-dessous d'un seuil critique s'avérant être létal pour l'animal. En effet, la protéine UCP2 est exprimée dans le foie. Elle intervient dans le découplage (et donc la thermogénèse) et a un effet anti-oxydant (Horimoto *et al.*, 2004). Plus récemment, il a été trouvé que UCP2 et UCP3 sont exprimées dans le foie et sont activées par un haut niveau de ROS. Il n'est pas encore clair qu'elles fassent diminuer le stress oxydant par découplage (Monteiro *et al.*, 2021). On sait aussi que face à l'exposition au froid, même chez un animal non-hibernant comme le rat, la masse, la température et la capacité à faire de la néoglucogénèse du foie augmentent. Le foie participe donc à la thermogénèse, notamment

en générant de la chaleur mais aussi en fournissant du glucose, des acides gras et des acides gras oxydés en acyl-carnitines au tissu adipeux brun (ce dernier générant de la chaleur par la protéine UCP1) (Simcox *et al.*, 2017 ; pour revue, voir Abumrad, 2017).

La hausse du rapport LEAK/ETS et non celle du RCR en torpeur nous ont permis de valider l'hypothèse 2, comme quoi les mitochondries du foie en torpeur produisent moins d'ATP et oxydent moins d'oxygène (diminution du stade 3) sans baisse d'efficacité (le RCR) comparé à l'eutherme, conformément à la revue de Staples et Brown (2008). Or ces observations ont été faites chez des spermophiles (espèces « fat-storing ») et l'indice d'efficacité était le rapport ATP/O et non le RCR. On peut peut-être alors critiquer nos résultats et même notre hypothèse car un article de Salin *et al.*, en 2018, a montré chez la truite *Salmo trutta* que RCR et ATP/O évoluaient de manière opposée face à une privation alimentaire. Même au sein des individus ayant les mêmes conditions d'environnement, on observait une corrélation négative entre ces deux indices d'efficacité. Cela signifie d'une part qu'aucun de ces indices n'est parfait (pour citer Salin *et al.* : « [le rapport RCR] ne contient aucune évaluation de la production d'ATP, [le rapport ATP/O] ne contient aucune évaluation de la respiration pour compenser la fuite de protons »). D'autre part cela signifie qu'il faudrait idéalement mesurer les deux.

Dans la grande majorité des cas, un découplage s'accompagne d'une diminution de la production de ROS. Or, nous avons vu dans la première partie que la production de ROS est moindre chez un hibernant en hypothermie contrairement à un non-hibernant (Hendriks *et al.*, 2020). Hendriks l'explique, en comparaison aux cellules humaines dans les conditions hivernales, par une augmentation de la consommation d'oxygène et de la production d'ATP, une absence d'ouverture du pore mPTP (il s'ouvre normalement à l'apoptose) et des mécanismes antioxydants bloquant les radicaux libres. Brown *et al.* (2012) ont trouvé qu'il y avait plus de radicaux libres (qui sont des ROS) dans le foie en torpeur comparé au retour à l'eutherme et au muscle squelettique. Dans leur étude, il n'y avait pas de différence de production basale de ROS à basse température entre la torpeur et l'eutherme. D'autres études récentes dans le foie de spermophile semblent confirmer cela. Il n'y a pas plus de H₂O₂ en torpeur qu'au retour à l'eutherme donc pas de différence significative de la quantité de ROS (Wei *et al.*, 2018). Enfin, s'il y a plus de découplage dans le foie avec les protéines UCP, cela peut éviter la production de ROS comme nous l'avons évoqué en première partie (Brand *et al.*, 2004 ; Monteiro *et al.*, 2021). Nos résultats ne permettent pas de savoir s'il y a plus ou moins de ROS dans le foie en torpeur car les dosages ROM-OXY dosent les déchets de l'oxydation et les défenses antioxydantes dans la circulation générale, pas le foie. Il y a peut-être des défenses antioxydantes locales qui stoppent l'effet des ROS dans le foie mais pour

cela il faudrait les doser dans le foie, non dans le plasma, où nous n'avons pas trouvé de différence significative. Des études récentes ont trouvé une hausse d'antioxydants dans le foie en torpeur : par exemple l'enzyme antioxydante SOD1 s'exprime davantage en torpeur dans le foie de spermophile (Wei *et al.*, 2018). Cependant, d'autres études n'ont pas trouvé de différence entre la torpeur et l'euthermie (revue de Staples, 2022). Ceci étant, nous avons montré que la longueur des télomères du foie était similaire entre nos deux groupes (torpeur et euthermie). Cela laisse penser que les ROS n'augmenteraient pas dans le foie en torpeur et/ou s'accompagneraient d'une augmentation des défenses antioxydantes ou de l'activation des mécanismes d'élongation des télomères (enzyme télomérase et/ou mécanisme d'allongement alternatif) (selon le même principe que les travaux de Hoelzl (2016) qui montraient un allongement en été chez le loir gris).

D. Les mitochondries du muscle squelettique en torpeur sont plus efficaces mais causeraient plus de dommages oxydatifs

Nous avons aussi observé dans nos résultats que les mitochondries du muscle en torpeur présentent un rapport RCR plus élevé. Cela veut dire que malgré le fait que les mitochondries produisent moins d'ATP (c'est-à-dire moins de respiration au stade 3) (Brown, 2012 ; pour revue, voir Staples, 2016) elles sont plus efficaces. Avec un RCR plus élevé en torpeur, on s'attend donc à ce qu'il y ait moins de fuite de protons et de ROS produits. Pourtant les muscles en torpeur de nos expériences ont un LEAK/ETS inchangé et ont dû subir plus de stress oxydant car la longueur relative des télomères était significativement plus courte par rapport à l'euthermie et par rapport au foie. Ce phénomène contredit ce qui a déjà été observé en utilisant la qPCR chez des spermophiles arctiques qui sont des animaux « fat-storing » (Wilbur *et al.*, 2019). Il est déjà connu que la longueur et la régénération des télomères sont différentes selon l'organe, sans même rentrer dans des considérations d'hibernation. Dans l'étude de Wilbur *et al.* (2019), chez des mâles juvéniles, qu'ils soient en milieu ou fin de période d'hibernation, les télomères des muscles étaient toujours significativement plus longs que ceux du foie. C'était aussi le cas chez des femelles en milieu d'hibernation. Dans le foie, la longueur des télomères ne changeait pas significativement, quels que soient le sexe et le stade d'hibernation. Nos mesures portaient sur des hamsters mâles et ici aussi la longueur des télomères des cellules du foie ne changeait pas selon le stade physiologique. En revanche, les télomères dans le muscle n'étaient jamais plus longs. Avec nos résultats, on peut supposer qu'il existe là une réelle différence entre animaux « food-storing » et « fat-storing ». Nous avons supposé, dans l'hypothèse 6, que les télomères des hibernants « food-storing » présenteraient la même dynamique de protection voire d'élongation des télomères en torpeur que ceux des « fat-storing » (conservation en torpeur, raccourcissement selon la fréquence

des réchauffements durant l'hibernation et élongation en euthermie à la belle saison). Or, cette hypothèse se basait surtout sur les travaux de Hoelzl *et al.* (2016) sur le loir commun (*Glis glis*), un hibernant « fat-storing ». A la vue des différences de physiologie entre les deux types d'hibernants, l'hypothèse inverse aurait aussi pu être émise.

On peut expliquer l'augmentation d'efficacité mitochondriale et le raccourcissement des télomères dans le muscle par des réchauffements (thermogenèse avec frisson) plus fréquents chez un animal « food-storing » et générateurs de stress oxydant. Comme pour le foie, il faudrait doser localement les ROS et les défenses antioxydantes dans le muscle. On s'attendrait alors à ce qu'il y ait en torpeur plus de ROS dans le muscle - causant le raccourcissement des télomères - mais pas d'augmentation des défenses. C'est ce qu'affirme Staples dans sa revue la plus récente (2022) : « [à l'échelle du tissu], la capacité antioxydante totale des mitochondries isolées ne différait pas entre les états d'hibernation, ce qui suggère que les différents niveaux de dommages observés sont dus à des différences dans la production de ROS ». Ces ROS influencent en retour le fonctionnement de la mitochondrie et pourraient jouer un rôle de signal (nous avons vu en première partie que les ROS étaient impliquées dans la physiologie homéostatique de la mitochondrie et la cellule). Ainsi une accumulation de ROS en fin de torpeur causerait des dommages oxydants et donc impacterait le fonctionnement mitochondrial, servant de signal pour déclencher le réchauffement et le retour à l'euthermie. A l'inverse leur baisse en fin d'euthermie déclencherait la torpeur. Le dosage de ROS à ces moments-là constitue donc une piste de recherche pour l'avenir (Staples, 2022).

E. Perspectives

Différentes perspectives s'ouvrent ainsi afin de mieux répondre aux problématiques et préciser nos résultats.

Il conviendrait de reconduire la calorimétrie indirecte, l'oxymétrie (Oroboros), la mesure d'ATP/O et le dosage de ROS en utilisant un plus grand nombre d'individus afin d'avoir davantage de profils et d'obtenir des statistiques plus précises et avec plus de puissance. On peut imaginer que c'est par manque de puissance statistique que nous n'avons pas trouvé d'influence des substrats (dérivés de glucides et acides gras) là où Heim *et al.*, 2017 trouvaient des différences d'oxydation phosphorylante et de fuite de protons dans les mitochondries (surtout du muscle), bien que les mitochondries comparées étaient issues d'animaux en été ou en hibernation et non en pause inter-torpeur et torpeur comme dans nos mesures.

Idéalement, il faudrait des hamsters à différents stades de leur période d'hibernation (en février-mars, ils étaient tous en fin d'hibernation ce qui peut expliquer le peu de différences dans la longueur des télomères et les dosages ROM-OXY) et trouver un moyen de mieux suivre la physiologie de l'animal. La respirométrie ne nous a pas permis de le faire pour les raisons évoquées précédemment, nous ne savions donc pas à quel moment de la torpeur ou de l'eutherme la physiologie de l'animal se situait pour les prélèvements. Cet aspect pourrait s'avérer d'une importance majeure car l'état métabolique de l'animal diffère en début ou fin de torpeur (le jeûne est plus ou moins long) et pendant la période à l'eutherme (le hamster peut être en train de se réchauffer ou en état post-prandial). Cela influe sur sa physiologie, ses mitochondries et la production de ROS. On sait par exemple que la respiration au stade 3 augmente progressivement lors du réchauffement (pour revue, voir Staples, 2016) ou encore que les télomères raccourcissent durant le réchauffement de l'animal (Hoelzl *et al.*, 2016). Un suivi longitudinal en continu des animaux serait adéquat soit par calorimétrie – à une période où les animaux sont plus susceptibles d'entrer en torpeur – soit par suivi instantané de la température corporelle (avec un capteur interne biocompatible ibutton® par exemple).

De plus, il serait intéressant d'avoir des duplicatas des mesures d'Oroboros. Ce dernier ne contenant que deux chambres et sachant que nous devons faire deux tissus par jour (chaque tissu demandant 3 à 4 h de préparation et d'acquisition) et tester la respiration mitochondriale avec des dérivés de glucides et avec des graisses, il n'a pas été possible de faire des duplicatas. Nous utilisons une chambre pour les dérivés de glucides et l'autre pour les acides gras.

On pourrait aussi imaginer réaliser l'expérience à des températures plus « physiologiques » tenant compte de l'état de l'animal en hibernation (torpeur vs. eutherme) : les chambres de notre Oroboros – comme beaucoup d'expériences menées dans la littérature citée ici – étaient à 37°C. Or, il a été démontré que c'est à 37°C que l'on voit le plus de contraste entre des mitochondries isolées en torpeur et en eutherme (revues de Staples, 2016 & 2022). La température a par exemple un impact sur la fuite d'électrons libres et donc la production de ROS. A température corporelle basse (10°C), la fuite de protons en torpeur est plus faible et non plus forte (Staples, 2016).

Enfin, pour répondre à nos objectifs, il serait bon de refaire la calorimétrie indirecte et l'oxymétrie non seulement avec des hamsters mais aussi avec des espèces « fat-storing », comme le lérot d'Europe (*Eliomys quercinus*) à l'IPHC ou en collaboration par exemple. Cela permettrait une réelle comparaison, les expériences dans la littérature étant peu nombreuses ou différentes (nous n'avons pas pu conclure sur l'hypothèse 1 par exemple).

Parmi les expériences qui pourraient être ajoutées, on peut évoquer la recherche de ROS, non pas dans la circulation générale avec les dosages ROM-OXY mais au niveau des tissus puisque nous avons discuté du manque d'informations locales sur les ROS dans nos expériences. On peut aussi penser à la recherche de l'expression des protéines UCP, cela nous permettrait de confirmer qu'il y a bien de la thermogénèse dans le foie en torpeur par exemple.

Conclusion

Le métabolisme des animaux « food-storing » présente des différences vis-à-vis des « fat-storing ». Ces différences dépendent de l'état physiologique (euthermie ou torpeur) et varient d'un organe à l'autre. Les mitochondries en torpeur oxydent moins de substrat et produisent moins d'ATP mais peuvent être plus efficaces en privilégiant le stade 3 à la respiration non phosphorylante découplée comme dans le muscle en torpeur par exemple, utile pour faire de la thermogenèse frissonnante. A l'inverse, elles peuvent aussi privilégier la respiration découplée et faire plus de fuite de protons, une partie du gradient électrochimique se dissipant alors en chaleur. Pourtant, contrairement à nos attentes et à la bibliographie, les télomères seraient raccourcis dans le muscle en torpeur et non le foie, démontrant qu'on ne comprend pas tout des mécanismes locaux impliquant les ROS et leurs dommages. Ces premières mesures ouvrent la voie pour de futures recherches sur les coûts physiologiques des espèces « food-storing » comme le hamster d'Europe au cours des cycles de torpeur et de retour à l'euthermie pendant l'hibernation.

Liste des références bibliographiques

- ABDEL-RAHMAN E.A., HOSSEINY S., AALIYA A., *et al.* (2021) Sleep/wake calcium dynamics, respiratory function, and ROS production in cardiac mitochondria. *Journal of Advanced Research* vol. 31, p.35-47. [<https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.01.006>]
- ABUMRAD N.A. (2017) The Liver as a Hub in Thermogenesis. *Cell Metabolism* vol. 26, n°3, p.454-455. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.018>]
- AUTERI G.G. (2022) A conceptual framework to integrate cold-survival strategies: torpor, resistance and seasonal migration. *Biology Letters* vol.18, n°5, p.20220050. [<https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0050>]
- BARNES R.P., FOUQUEREL E., OPRESKO P.L. (2019) The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mechanisms of Ageing and Development* vol. 177, p.37-45. [<https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.03.013>]
- BARTON, K. (2018). MuMIn: Multi-Model Inference R package version 1.42.1 *In* CRAN – Package MuMIn. [<https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>] (consulté le 22/06/2022).
- BOËL, M. (2020). Influence de la masse corporelle au sein du triptyque mitochondrial "oxygène, ATP et radicaux libres. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1.
- BRAND M.D., AFFOURTIT C., ESTEVES T.C., *et al.* (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine* vol. 37, n°6, p.755-767. [<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.034>]
- BRAND M.D. (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology* vol. 45, n°7-8, p.466-472. [<https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>]
- BROWN J.C.L., CHUNG D.J., BELGRAVE K.R., *et al.* (2012) Mitochondrial metabolic suppression and reactive oxygen species production in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* vol. 302, n°1, R15-R28. [<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00230.2011>]
- BROWN J.C.L., GERSON A.R., STAPLES J.F. (2007) Mitochondrial metabolism during daily torpor in the dwarf Siberian hamster: role of active regulated changes and passive thermal effects. *American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology* vol. 293, n°5, R1833-1845. [<https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00310.2007>]
- BROWN J.C.L., STAPLES J.F. (2011) Mitochondrial metabolic suppression in fasting and daily torpor: consequences for reactive oxygen species production. *Physiological and Biochemical Zoology* vol. 84, n°5, p.467-480. [<https://doi.org/10.1086/661639>]
- CAREY H.V., ANDREWS M.T., MARTIN S.L. (2003) Mammalian Hibernation: Cellular and Molecular Responses to Depressed Metabolism and Low Temperature. *Physiological Reviews* vol. 83, n°4, p.1153-1181. [<https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2003>]
- CARVALHO E., ADAMS S., BØRSHEIM E., *et al.* (2020) Neonatal diet impacts liver mitochondrial bioenergetics in piglets fed formula or human milk. *BioMedCentral Nutrition* vol.6. [<https://doi.org/10.1186/s40795-020-00338-7>]

- ČATER M., BOMBEEK L.K. (2022) Protective Role of Mitochondrial Uncoupling Proteins against Age-Related Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Antioxidants* vol. 11, n°8. [https://doi.org/10.3390/antiox11081473]
- CAWTHON R.M. (2002) Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research* vol. 30, n°10, p.e47. [https://doi.org/10.1093/nar/30.10.e47]
- CRISTINELLI A. (2006) Torpeur et hibernation chez les vertébrés homéothermes. Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.
- CROWDER J.J., ZENG Z., NOVAK A.N., *et al.* (2022) Stabilization protects islet integrity during respirometry in the Oroboros Oxygraph-2K analyzer. *Islets* vol.14, n°1, p.128-138. [https://doi.org/10.1080/19382014.2022.2054251]
- DE JONG N.P., RUDOLPH M.C., JACKMAN M.R., *et al.* (2022) Short-Term Adaptations in Skeletal Muscle Mitochondrial Oxidative Capacity and Metabolic Pathways to Breaking up Sedentary Behaviors in Overweight or Obese Adults. *Nutrients* vol.14, n°3, p.454. [https://doi.org/10.3390/n14030454]
- FARHAT F. (2019) Fonction mitochondriale et espèces réactives dérivées de l'oxygène : effets du genre et de l'entraînement en endurance chez le rat Wistar et l'anguille européenne. Thèse de doctorat, Université de Brest.
- GEISER F., RUF T. (1995) Hibernation versus Daily Torpor in Mammals and Birds: Physiological Variables and Classification of Torpor Patterns. *Physiological Zoology* vol.68, p.935–966. [https://doi.org/10.2307/30163788]
- GEISER F. (1998) Evolution of daily torpor and hibernation in birds and mammals: importance of body size. *Clinical and Experimental Pharmacology Physiology* vol.25, n°9, p.736-739. [https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1998.tb02287.x]
- GEISER F. (2020) Seasonal Expression of Avian and Mammalian Daily Torpor and Hibernation: Not a Simple Summer-Winter Affair†. *Frontiers in Physiology* vol.11. [https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00436]
- GIROUD S., HABOLD C., NESPOLO R.F., *et al.* (2021) The Torpid State: Recent Advances in Metabolic Adaptations and Protective Mechanisms†. *Frontiers in Physiology* vol.11. [https://doi.org/10.3389/fphys.2020.623665]
- GNAIGER E. (2011) The Oxygraph for High-Resolution Respirometry (HRR). *Mitochondrial Physiology Network* 06.01. p.1-18. [https://drexel.edu/~media/Files/medicine/drexel-pdfs/labs/orynbayeva/drexel-orynbayeva-lab-protocol-oroboros-instruments-high-resolution-respirometry.ashx?la=en]
- GNAIGER E. (2020) Mitochondrial Pathways and Respiratory Control: An Introduction to OXPHOS Analysis. 5th Edition, Bioenergetics Communications. [https://doi.org/10.26124/BEC%3A2020-0002]
- HEIM A.B., CHUNG D., FLORANT G.L., *et al.* (2017) Tissue-specific seasonal changes in mitochondrial function of a mammalian hibernator. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* vol. 313, R180–R190. [https://doi.org/10.1152/ajpregu.00427.2016]

- HELDMAIER G., ORTMANN S., ELVERT R. (2004) Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respiratory Physiology & Neurobiology, Hypoxic Hypometabolism* vol.141, n°3, p.317-329. [<https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.03.014>]
- HENDRIKS K.D.W., JOSCHKO C.P., HOOGSTRA-BERENDS F., *et al.* (2020) Hibernator-Derived Cells Show Superior Protection and Survival in Hypothermia Compared to Non-Hibernator Cells. *International Journal of Molecular Sciences* vol.21, n°5, E1864. [<https://doi.org/10.3390/ijms21051864>]
- HOELZL F., CORNILS J.S., SMITH S., *et al.* (2016) Telomere dynamics in free-living edible dormice (*Glis glis*): the impact of hibernation and food supply. *Journal of Experimental Biology* vol.219, n°16, p.2469-2474. [<https://doi.org/10.1242/jeb.140871>]
- HORIMOTO M., FÜLÖP P., DERDAK Z., *et al.* (2004) Uncoupling Protein-2 Deficiency Promotes Oxidant Stress and Delays Liver Regeneration in Mice. *Hepatology* vol.39, n°2, p.386-392. [<https://doi.org/10.1002/hep.20047>]
- LABOCHA M.K., HAYES J.P. (2019) Endotherm. In Fath B. (Ed.), *Encyclopedia of Ecology*. 2ème éd., Amsterdam, Elsevier, p.368-374. [<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11221-7>]
- LEE J.-W., PARK K.D., IM J.-A., *et al.* (2010) Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood is associated with cognitive function in apparently healthy elderly women. *Clinica Chimica Acta* vol.411, n°7, p.592-596. [<https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.01.024>]
- MATHERS K.E., MCFARLANE S.V., ZHAO L., *et al.* (2017) Regulation of mitochondrial metabolism during hibernation by reversible suppression of electron transport system enzymes. *Journal of Comparative Physiology B* vol.187, n°1, p.227-234. [<https://doi.org/10.1007/s00360-016-1022-0>]
- MONTEIRO B. S., FREIRE-BRITO L., CARRAGETA D.F., *et al.* (2021) Mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) as Key Modulators of ROS Homeostasis: A Crosstalk between Diabesity and Male Infertility? *Antioxidants* vol. 10, n° 11. [<https://doi.org/10.3390/antiox10111746>]
- MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE (2023) *Cricetus cricetus* (Linnaeus, 1758) - Grand hamster, Hamster commun. In Inventaire National du Patrimoine Naturel. [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/61458] (consulté le 31/01/2023).
- NOLFI-DONEGAN D., BRAGANZA A., SHIVA S. Mitochondrial Electron Transport Chain: Oxidative Phosphorylation, Oxidant Production, and Methods of Measurement. *Redox Biology* vol.37. [<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>]
- OROBOROS INSTRUMENTS (2023) O2k-Concept. In Oroboros Instruments. [<https://www.orooboros.at/index.php/o2k-concept/>] (consulté le 02/12/2022).
- ORR A.L., LOHSE L.A., DREW K.L., *et al.* (2009) Physiological oxidative stress after arousal from hibernation in Arctic ground squirrel. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* vol.153, n°2, p.213-221. [<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.02.016>]
- REVEL F.G., SABOUREAU M., MASSON-PÉVET M., *et al.* (2006) Kisspeptin Mediates the Photoperiodic Control of Reproduction in Hamsters. *Current Biology* vol.16, n°17, p.1730-1735. [<https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.025>]

- RUF T., GEISER F. (2015) Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biological Reviews* vol.90, n°3, p.891-926. [<https://doi.org/10.1111/brv.12137>]
- SALIN K., VILLASEVIL E.M., ANDERSON G.J., *et al.* (2018) The RCR and ATP/O Indices Can Give Contradictory Messages about Mitochondrial Efficiency. *Integrative & Comparative Biology* vol.58, n°3, p.486-494. [<https://doi.org/10.1093/icb/icy085>]
- SENA L.A., CHANDEL N.S. (2012) Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell* vol.48, n°2, p.158-167. [<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>]
- SIMCOX J., GEOGHEGAN G., MASCHEK J.A., *et al.* (2017) Global Analysis of Plasma Lipids Identifies Liver-Derived Acylcarnitines as a Fuel Source for Brown Fat Thermogenesis. *Cell Metabolism* vol.26, n°3, p.509-522.e6. [<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.006>]
- SIUTZ C., NEMETH M., WAGNER K.-H., *et al.* (2017) Effects of food store quality on hibernation performance in common hamsters. *PLoS One* vol.12, n°10, p.e0185913. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185913>]
- SIUTZ C., MILLESI E. (2017) Torpor patterns in common hamsters with and without access to food stores. *Journal of Comparative Physiology B* vol.187, p.881-888. [<https://doi.org/10.1007/s00360-017-1093-6>]
- STAPLES J.F. (2016) Metabolic Flexibility: Hibernation, Torpor, and Estivation. *Comprehensive Physiology* vol.6, n°2, p.737-771. [<https://doi.org/10.1002/cphy.c140064>]
- STAPLES J.F., MATHERS K.E., DUFFY B.M. (2022) Mitochondrial Metabolism in Hibernation: Regulation and Implications. *Physiology* vol.37, n°5, p.260-271. [<https://doi.org/10.1152/physiol.00006.2022>]
- STAPLES J.F., BROWN J.C.L. (2008) Mitochondrial metabolism in hibernation and daily torpor: a review. *Journal of Comparative Physiology B* vol.178, n°7, p.811-827. [<https://doi.org/10.1007/s00360-008-0282-8>]
- TISSIER M., KLETTY F., ROBIN J., *et al.* (2021) Sustainable Agriculture: Nutritional Benefits of Wheat–Soybean and Maize–Sunflower Associations for Hibernation and Reproduction of Endangered Common Hamsters. *Sustainability* vol.13, n°24, p.13521. [<https://doi.org/10.3390/su132413521>]
- TISSIER M.L., HABOLD C. (2017) Adaptations métaboliques et digestives des espèces hibernantes. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* vol.52, n°3, p.150-159. [<https://doi.org/10.1016/j.cnd.2017.03.003>]
- TOHJIMA Y., MACHIDA T., WATAI T., *et al.* (2005) Preparation of gravimetric standards for measurements of atmospheric oxygen and reevaluation of atmospheric oxygen concentration. *Journal of Geophysical Research (Atmospheres)* vol.110, n°D11. [<https://doi.org/10.1029/2004JD005595>]
- TURBILL C., BIEBER C., RUF T. (2011) Hibernation is associated with increased survival and the evolution of slow life histories among mammals. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* vol.278, n°1723, p.3355-3363. [<https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0190>]
- VIMALESWARAN K.S., CAVADINO A., VERWEIJ N., *et al.* (2015) Interactions between uncoupling protein 2 gene polymorphisms, obesity and alcohol intake on liver function: a large meta-analysed population-based study. *European Journal of Endocrinology* vol.173, n°6, p.863-872. [<https://doi.org/10.1530/eje-15-0839>]

- WEI Y., ZHANG J., XU S., *et al.* (2018) Controllable oxidative stress and tissue specificity in major tissues during the torpor–arousal cycle in hibernating Daurian ground squirrels. *Open Biology* vol.8, n°10, p.180068. [<https://doi.org/10.1098/rsob.180068>]
- WEITTEN M., ROBIN J.-P., OUDART H., *et al.* (2013) Hormonal changes and energy substrate availability during the hibernation cycle of Syrian hamsters. *Hormones and Behavior* vol.64, n°4, p.611-617. [<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.08.015>]
- WEITTEN M., OUDART H., HABOLD C. (2016) Maintenance of a fully functional digestive system during hibernation in the European hamster, a food-storing hibernator. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* vol.193, p.45-51. [<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.006>]
- WEITTEN M., TISSIER M.L., ROBIN J.-P., *et al.* (2018) Dietary proteins improve hibernation and subsequent reproduction in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* vol.315, n°4, p.R848-R855. [<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00146.2018>]
- WEITTEN M. (2015) Adaptations métaboliques et influence du régime alimentaire chez un hibernant food-storing. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg.
- WILBUR S.M., BARNES B.M., KITAYSKY A.S., *et al.* (2019) Tissue-specific telomere dynamics in hibernating arctic ground squirrels (*Urocitellus parryii*). *Journal of Experimental Biology* vol.222, n°18, p.jeb204925. [<https://doi.org/10.1242/jeb.204925>]
- ZHANG I.W., LÓPEZ-VICARIO C., DURAN-GÜELL M., *et al.* (2021) Mitochondrial Dysfunction in Advanced Liver Disease: Emerging Concepts. *Frontiers in Molecular Biosciences* vol.8, p.772174. [<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.772174>]

COÛTS ET BÉNÉFICES ÉNERGÉTIQUES CHEZ LES MAMMIFÈRES HIBERNANTS : APPLICATION À L'EXEMPLE DU GRAND HAMSTER D'ALSACE (*Cricetus cricetus*)

AUTEUR : Camille MARIE-JEAN-ROBERT JOT

RÉSUMÉ : Pour faire face à une baisse de ressources alimentaires, l'hibernation est une stratégie efficace qui consiste, pendant l'hiver, à alterner entre deux états physiologiques : 1/ la torpeur durant laquelle la température corporelle et la consommation d'énergie chutent et 2/ des retours à l'euthermie qui permettent de restaurer certaines fonctions vitales. Certaines espèces profitent de ces réchauffements pour se réalimenter avec des graines stockées à la belle saison : ce sont les espèces « food-storing », en opposition à celles « fat-storing », bien plus étudiées dans la littérature, qui consomment leurs réserves de tissu adipeux blanc au cours de l'hibernation. Par ailleurs, des études ont déjà démontré que des espèces réactives de l'oxygène (ROS) s'accumulent au cours de la période d'hibernation. Les objectifs de ce travail étaient d'étudier la respiration des mitochondries d'une espèce « food-storing » – le hamster d'Europe – ainsi que le niveau de stress oxydant associé à cette respiration, et ce, dans un muscle squelettique et le foie. Pour cela nous avons utilisé l'oxymétrie de flux avec des tissus d'animaux en torpeur et d'autres en euthermie, pour étudier l'efficacité des mitochondries et leur part de respiration non couplée. Enfin, pour mesurer l'ampleur du stress oxydant, nous avons aussi mesuré la longueur relative des télomères par qPCR dans ces tissus et nous avons dosé les produits finaux de l'oxydation et les défenses antioxydantes. Nos résultats contrastent avec la littérature sur les espèces « fat-storing » en montrant une augmentation de l'efficacité mitochondriale du muscle en torpeur, associée à une augmentation du stress oxydant causant un raccourcissement des télomères. Au niveau des mitochondries du foie, nous observons une augmentation de la fuite de protons, qui peut servir à générer de la chaleur. Aucune augmentation des métabolites des ROS ni des défenses antioxydantes n'a été observée dans la circulation générale. On ne comprend pas encore tout des mécanismes locaux impliquant les ROS et leurs dommages. Ces premières mesures ouvrent la voie pour de futures recherches sur les coûts physiologiques des espèces « food-storing » comme le hamster d'Europe au cours des cycles de torpeur et de retour à l'euthermie pendant l'hibernation.

MOTS CLÉS :

TORPEUR, METABOLISME, MITOCHONDRIE HIBERNATION, HAMSTER D'EUROPE, GRAND HAMSTER D'ALSACE, RESPIROMETRIE.

JURY :

Présidente : Pr Fanny Pilot-Storck
Directrice de thèse : Pr Caroline Gilbert
Examinatrice : Dr Guillemette Crépeaux

ENERGY COST AND BENEFITS IN HIBERNATING MAMMALS: APPLICATION TO THE EXAMPLE OF THE EUROPEAN HAMSTER (*Cricetus cricetus*)

AUTHOR: Camille MARIE-JEAN-ROBERT JOT

SUMMARY: To cope with a drop in food resources, hibernation is an effective strategy which consists, during the winter, of alternating between two physiological states: 1/ torpor during which body temperature and energy consumption drop and 2/ returns to euthermia that enable the restoration of certain vital functions. Some species take advantage of these re-warmings to feed with seeds stored in the summer: these are the "food-storing" species, as opposed to the "fat-storing" species, which are much more studied in the literature. Fat-storing species consume their reserves of white adipose tissue during hibernation. In addition, studies have already shown that reactive oxygen species (ROS) accumulate during hibernation. The goals of this work were to study mitochondrial respiration of a "food-storing" species – the European hamster – as well as the level of oxidative stress associated with this respiration, in skeletal muscle and the liver. In that aim, we used flow oximetry with tissues from animals in torpor and others in euthermia, to study the efficiency of mitochondria and their part of uncoupled respiration. Finally, to measure the extent of oxidative stress, we also measured the relative length of telomeres by qPCR in these tissues and we assayed the end products of oxidation and antioxidant defenses. We expected a decreasing respiration in torpor but not necessarily a decreasing efficiency, particularly in the liver. It was difficult to predict the evolution of oxidative stress, as it did not necessarily increase in torpor and telomere length is preserved in torpor. Our results contrast with the literature on "fat-storing" species by showing an increased mitochondrial efficiency in the muscle in torpor, associated with an increase in oxidative stress causing telomere shortening. At the level of liver mitochondria, we observe an increased proton leakage, which can generate heat. No increase in ROS metabolites or antioxidant defenses was observed in the general circulation. We do not yet fully understand the local mechanisms involving ROS and their damage. These first measurements pave the way for future research on the physiological costs of food-storing species such as the European hamster during cycles of torpor and return to euthermia during hibernation.

KEYWORDS:

TORPOR, METABOLISM, HIBERNATION MITOCHONDRIA, EUROPEAN HAMSTER, GREATER ALSATIAN HAMSTER, RESPIROMETRY.

JURY:

Chairperson: Pr Fanny Pilot-Storck

Thesis Director: Pr Caroline Gilbert

Reviewer: Dr Guillemette Crépeaux