



HAL
open science

Adaptations métaboliques du caneton de Barbarie (*Cairina moschata*) et du Manchot Royal (*Aptenodytes patagonicus*) en réponse à un stress chronique froid

Loïc Teulier

► **To cite this version:**

Loïc Teulier. Adaptations métaboliques du caneton de Barbarie (*Cairina moschata*) et du Manchot Royal (*Aptenodytes patagonicus*) en réponse à un stress chronique froid. *Biologie animale*. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10295 . tel-00799347

HAL Id: tel-00799347

<https://theses.hal.science/tel-00799347v1>

Submitted on 12 Mar 2013

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.

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1
ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES SANTE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD

Discipline : Physiologie

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2010 par

Loïc Teulier

**Adaptations métaboliques du caneton de Barbarie (*Cairina moschata*)
et du Manchot Royal (*Aptenodytes patagonicus*) en réponse à un
stress chronique froid**



Sous la direction des *Dr. Damien ROUSSEL* et *Dr. Jean-Louis ROUANET*

JURY

M. Claude Duchamp, *PU, Université Claude Bernard – Lyon 1*
M. Yves Handrich, *CR CNRS, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien – Strasbourg*
M. Yves Cherel, *DR CNRS, Centre d'Etudes Biologiques de Chizé – Villiers-en-Bois*
M. Henri Benoit, *PU, Université Joseph Fourier – Grenoble*
Mme. Anne Collin, *CR INRA, Centre de Recherche – Tours*
M. Yann Voituron, *PU, Université Claude Bernard – Lyon 1*
M. Damien Roussel, *MCU, Université Claude Bernard – Lyon 1*
M. Jean-Louis Rouanet *MCU, Université Claude Bernard – Lyon 1*

Président
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur
Directeur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

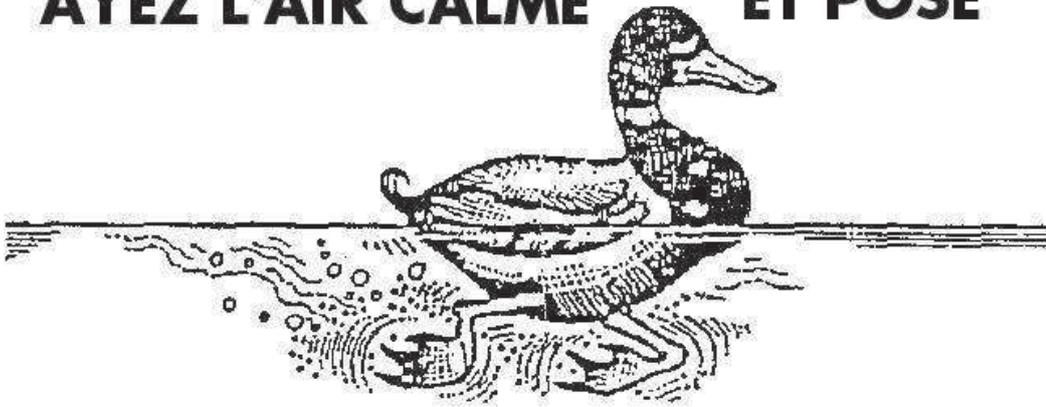
Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

Soyez comme les canards:

En surface

AYEZ L'AIR CALME ET POSÉ



Sous la surface

PÉDALEZ COMME UN FOU

Anonyme. Intemporel.

Remerciements

Ces travaux de thèse réalisés au Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire au sein de l'équipe Thermorégulation, Energétique et Adaptations Métaboliques, n'ont pu se concrétiser sans l'aide et le soutien de nombreux acteurs, que je tiens à remercier sincèrement.

Tout d'abord, je remercie le **Pr. Claude Duchamp** pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. De plus, je tiens à lui témoigner ma gratitude pour m'avoir permis d'effectuer mes différents stages plus ou moins longs (de 2 mois à 3 ans) et plus ou moins loin (jusqu'en Terres Australes) au sein de son équipe. Merci aussi pour vos conseils pédagogiques et votre temps consacré au *coaching* « pré-oraux ».

Ensuite j'aimerais tout particulièrement remercier les **Dr. Yves Cherel** et **Yves Handrich** et le **Pr. Henri Benoit** qui, malgré un emploi du temps extrêmement chargé, ont accepté la lourde tâche de rapporteur. Vos critiques et remarques ont finalement abouti à une longue discussion scientifique permettant de soulever de nouvelles interrogations et ainsi d'élargir le débat de façon particulièrement enrichissante.

Je tiens également à remercier le **Dr. Anne Collin** pour son regard critique vis-à-vis de mon travail.

Merci au **Pr. Yann Voituron** pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse en temps qu'examinateur (ce remerciement sera complété par la suite).

Je voudrais témoigner toute ma gratitude aux deux membres du jury restants : le **Dr. Damien Roussel** et le **Dr. Jean-Louis Rouanet**. C'est en effet sous leurs conseils avisés que j'ai pu mener à bien mon projet de thèse. De par leur exceptionnelle complémentarité, ils ont su me faire partager leurs connaissances scientifiques et leur maîtrise technique sur de nombreux sujets, des arcanes de la calorimétrie indirecte aux mystères de la petite mitochondrie et de son pote « Entiel de Membrane ». Je tiens aussi à vous remercier pour les parties de volley, les parties de tennis et le cassoulet (ah non, pas le cassoulet... ça, c'est fort de café !!!) sans lesquelles ces trois années de thèse auraient été moins « fun ». Enfin je tiens également à souligner votre bonne humeur, sur le terrain ou au labo, qui résiste aux longues (très longues) périodes de manips.

Encore une fois merci pour tout !

Enfin je ne voudrais clore ce chapitre (qui est sans nul doute la partie la plus lue d'une thèse) sans remercier l'ensemble des personnes ayant contribué de près ou de loin à la réussite de cette thèse.

J'aimerais commencer par remercier le **Pr. Jean-Marc Péquignot**, ancien directeur du laboratoire et du Master 2 « *Physiologie Intégrée en Conditions Extrêmes* » pour la confiance qu'il m'a accordée et sa gentillesse sans limite, me permettant ainsi quelque part d'écrire ces remerciements.

Ensuite, je voudrais souligner le soutien et la confiance que m'a accordés le **Dr. Christophe Chouabe** durant ma thèse pour gérer le fameux TP « grenouille » et dès le stage de M1, pour avoir démarché auprès du **Dr. Brigitte Sibille**, que je remercie également sincèrement, une place au sein de l'équipe TEAM. Merci à vous deux pour avoir initié mes premiers pas vers la thermorégulation !

Encore une fois merci aux membres de l'équipe **TEAM**, avec qui j'ai passé trois ans dans une ambiance excellente.

Commençons par le commencement. Un grand MERCI à **Marie-Thérèse Boillon**, secrétaire de son état, plus connue sous le sigle MTB, qui par sa gentillesse et son soutien, a accompagné bon nombre d'étudiants de cette équipe tout au long de leur thèse. Merci pour tous les services rendus quotidiennement, allant de la gestion des tracasseries administratives à la confection de petits plats, jusqu'au repassage de chemise ! Merci beaucoup !

Je souhaite aussi remercier la « Dream Team », composée de trois éminents barbus, **Guy Dallevet**, **Harry Koubi** et bien sûr **Jean-Louis Rouanet** ! Merci pour votre bonne humeur, votre humour et vos anecdotes de l'ancien temps !!! Oui, vous qui avez vu quelques générations de jeunes étudiants passer en ces murs (ou d'autres), vous êtes la mémoire de ce laboratoire !

Ensuite je voudrais remercier le **Dr. Mireille Raccurt** pour ses récits d'aventures polaires et son dévouement pour le bon fonctionnement des recherches en terres lointaines...

Enfin je voudrais remercier celles et ceux qui m'ont ouvert les portes du bureau des étudiants, lorsque je n'étais que petit oisillon dans ce monde de rapaces...

Par ordre chronologique de rencontres :

- Le **Dr. Caroline Romestaing**. Du fameux TP « cathéters », où tu m'as montré la difficulté de ne pas trucider un étudiant après 3 semaines de TP (cette expérience m'a fortement servi !) au soutien sans failles durant ces 4 dernières années, malgré la

Remerciements

distance, lors d'étapes cruciales, telles que l'oral de l'école doctorale, l'organisation du traditionnel BBQ de l'UMR et de tous pots divers et variés (merci au Tonton pour le pâté...). Un grand Merci pour ton dynamisme et ton amitié !

- **Le Dr. Dominique Letexier.** Le seul et unique qui a réussi à me faire « apprécier » la biologie moléculaire. Merci pour cette année de M2, agrémentée de parties de volley quotidiennes. A bientôt en Bretagne !

- **Le Pr. Yann Voituron.** « Grand Professeur » de son état et pseudo ATER au départ. Bien que déjà remercié précédemment pour sa présence dans mon jury de thèse, je me sens obligé (mais non contraint !) de lui témoigner ma reconnaissance de façon moins officielle. Merci pour tes digressions plus ou moins scientifiques qui ont ponctué mon cursus universitaire... Du soda caféiné (pas de marques, svp) bu à outrance, servant notamment à certains TP de DEUG aux multiples références filmographiques, ayant pour point d'orgue un film récent contenant « une tonne de muscles », sans oublier une culture scientifique des petites bêtes bizarroïdes sans faille, je te remercie pour cette vision éclectique de la science !

- **Le Dr. Benjamin Rey.** « Pipette pensante » multi taches, véritable Leatherman® de la Science. Des entraînements de volley à ta passion des sports extrêmes (dont le sqwal, planche en bois connue par 3 spécimens en France, dont deux « Rey »), en passant par ta motivation débordante et communicante pour des manips toutes aussi excitantes, je ne saurais qu'être reconnaissant pour tout ! (Ne pas oublier **Jodie** qui a accepté, non sans mal, de laisser Benji discuter science autour de quelques verres...)

- **Le Dr. Delphine Baetz.** Merci pour ta gentillesse, ta spontanéité (qui ne se lit que très difficilement sur ton visage...), ta maîtrise du Western Blot et autres techniques de bio mol qui n'a d'égale que tes bons petits plats (Mention spéciale Sushi et Polenta).

- **Karine Salin.** Future docteur en écomitophysiologie. Ta ténacité dans l'effort des manips n'a pas ou peu de limites. Ultra consciencieuse, voir même à la limite de la pathologie, merci de m'avoir fait manipuler un plein mois de juillet, heureusement avec des pauses dignes de ce nom. Et dire que quand t'es arrivée, tu ne savais pas allumer un ordi... Aux vues de ton parcours, je suis très content de t'avoir montré le bouton « Power ».

- **Jérémy Tornos.** Thermofiotte du prg 131 (VCAT de la 46). A qui je dois pas mal de photos compromettantes, de gros délires sur la base Alfred Faure et au final le bon déroulement tant au niveau scientifique que quotidien de la campagne d'été 2008-2009 !

Remerciements

Sans oublier les autres membres de la TEAM et de feu l'UMR 5123,

Le Pr. **Robert Bonvallet**, le Dr. **Roger Meister**, le Dr. **Anne Morales** et le Dr. **Dominique Desplanches**. Merci pour votre soutien technique et votre disponibilité !

Les Dr. **Julien Tirard**, **Cécile Vouvoyitch** et **Sahra Borgès**. Merci pour votre bonne humeur et les discussions scientifiques ou non, se terminant souvent par des soirées qui finissaient tard, voire même trop tard !

Cyril, **Benjamin**, **Aurélie**, **Hayet** pour qui les choses sont de plus en plus avancées et les petites nouvelles **Gaëlle**, **Sabine**, **Bérengère** et **Anaïs**... A vous désormais de goûter au plaisir de la thèse...

Pax, bien sûr, qui est à l'autre bout du monde en train de jouer à cache-cache avec des éléphants de mer et des manchots. Eclate-toi bien pendant cette année de folies. Passe le bonjour aux pipous...

Enfin un mot aux autres personnes qui ont compté pour moi au cours de ces années.

Les copains de la 46^e mission de **Crozet** (Mention spéciale aux strasbourgeois **Vinc' Lapin Crétin**, **Claire**, **Mary** et **Nicobouc** et aux fiottes **Onésime** (Grosse Enzyme), **Anaëlle** (TamaTouk), **Aurèl**, **Maud** et **Nelly**) sans oublier **Vincent** thermofiotte de la 47^{ème} ...

Les copains du M2 « **Physiologie Intégrée en Conditions Extrêmes** » (**Max le Prez**, **Pavlov** et **Aurélie**) avec un remerciement sincère pour **Marion** qui est venue assister à la soutenance, les autres ayant une cheville en vrac, un sauvetage d'un chien croisé avec un cheval et une session de vol parabolique... Bravo pour les excuses !!!

Un grand merci à mes amis... qui tous, ont supporté ces années de Thèse, et même pour certains, ont subi les 3h et demi de soutenance ! Merci à **Jif**, **Gros Ben**, **Landry**, **Tonio**, **Buji**, **Mel**, **Clo**, **Estelle**, **Matou**, **Yo**, **Guillaume**, **Karen** et leurs conjoints respectifs. Vive le « **Charbo Crew** » et en route vers de nouvelles aventures !!!!!

Je tiens à remercier aussi **Laurent**, **Jess**, **Nathan**, **Manon**, **Mael**, **Hoby** et **Rasta** pour les séjours « reposants » en Bauge et votre amitié sans faille.

Enfin pour conclure je tiens à remercier toute ma famille, sans qui je n'en serais pas là où j'en suis (une pensée spéciale pour mon cousin **Benoit**...).

Bien sûr, ces remerciements ne pourraient être complets sans te remercier, toi qui m'a particulièrement soutenu et épaulé dès le début (Décembre 2006 et premiers pas en stage de M1) jusqu'à aujourd'hui où tu étais en première ligne pour subir les moments de stress (et oui, je connais le stress) liés à l'approche de cette soutenance...
Merci **Maud**, merci d'être là !

Adaptations métaboliques du caneton de Barbarie (*Cairina moschata*) et du Manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) en réponse à un stress chronique froid

De par leur importante diversité phénotypique (10000 espèces), les oiseaux ont colonisé la plupart des niches écologiques, aussi « extrêmes » soient-elles. Les zones polaires (Arctique et Antarctiques) et le climat extrêmement froid qui les caractérise, suscitent l'intérêt de nombreuses études. Ce travail de thèse avait pour but d'explorer les différents mécanismes intervenant dans la mise en place de la thermorégulation chez l'oiseau.

Nous nous sommes principalement intéressés, par une approche intégrative, de l'animal entier (méthodes de calorimétrie indirecte) à l'expression génique (techniques de RT-PCR), à caractériser les modifications métaboliques et l'implication d'une protéine découplante (avUCP) dans les mécanismes de thermorégulation, et principalement la thermogenèse sans frisson (NST) en réponse à une exposition chronique au froid.

Au cours de deux études menées chez le caneton de Barbarie, nous avons démontré l'aspect « adaptatif » de la NST ainsi que l'implication potentielle de l'UCP aviaire dans ce mécanisme en faisant varier tout d'abord la température d'acclimatation puis la durée d'exposition pour caractériser la mise en place de la NST au cours de la croissance.

Lors d'une troisième étude, nous nous sommes intéressés à une étape clé de la vie des manchots royaux (passage en mer) caractérisée par un stress thermique important et une activité physique accrue dus aux longs séjours en eau froide. Ce contexte environnemental et physiologique entraîne nécessairement des adaptations métaboliques, comme la mise en place d'un métabolisme lipidique efficace soutenant ainsi les dépenses énergétiques accrues lors des voyages en mer.

Metabolic adaptations of Muscovy duckling (*Cairina moschata*) and King penguin (*Aptenodytes patagonicus*) to chronic cold exposure

Because of their huge phenotypic diversity (10,000 species), birds were able to colonize many "extreme" ecological niches. Many studies have been focus on the polar areas (i.e. Arctic and Antarctica) with their typical cold climate. The aim of this work was to explore the onset of thermoregulatory mechanisms in birds.

Using an integrative approach, from whole animal (indirect calorimetry) to gene expression (RT-PCR analysis), we investigated metabolic adaptations and avian uncoupling protein implication in non shivering thermogenesis (NST) during chronic cold exposure.

In two studies, working on Muscovy ducklings, we have highlighted the "adaptative" aspect of NST and potential implication of avUCP in this mechanism in relation to different ambient temperatures of acclimation and to cold exposure duration.

In a third study, we were interested by passage from shore to marine life of King Penguins that represents a key step of their life. This is defined by massive cold stress (cold water) and increase of physical activity (long-time swimming), leading great metabolic adaptations, such as an increase of lipid oxidative capacities which would sustain expensive energetic cost of marine life.

Liste des figures

Première partie : Introduction et Rappels bibliographiques

Figure 1.1 : illustration du concept d'écophysiologie	p.5
Figure 1.2 : Illustration des différents termes « Adaptation, Acclimatation et Naturalisation »	p.7
Figure 1.3 : Ectothermes versus Endothermes – deux réactions différentes face aux variations thermiques	p.9
Figure 1.4 : relation entre Métabolisme et température corporelle en fonction de la température ambiante	p.10
Figure 1.5 : Contrôle du frisson thermique en réponse à un stress froid	p.13
Figure 1.6 : Evolution du frisson en fonction de la température ambiante	p.14
Figure 1.7 : Localisation des dépôts de tissu adipeux brun chez le rat	p.15
Figure 1.8 : Illustration des différences morphologiques entre les adipocytes du tissu adipeux blanc et les adipocytes du tissu adipeux brun	p.16
Figure 1.9 : Arbre phylogénique des principaux groupes de Tétrapodes	p.17
Figure 1.10 : Différence entre oiseaux nidicoles et nidifuges	p.20
Figure 1.11 : Schéma d'une mitochondrie	p.23
Figure 1.12 : Schéma représentant la chaîne respiratoire mitochondriale	p.23
Figure 1.13 : illustration schématique du phénomène de couplage Ox/Phos	p.24
Figure 1.14 : Siège de la thermogenèse de régulation	p.25
Figure 1.15 : Représentation du découplage mitochondrial	p.26
Figure 1.16 : Représentation simplifiée du cycle de Krebs	p.28
Figure 1.17 : Mécanisme de régulation de la production de radicaux libres par les UCPs	p.34
Figure 1.18 : Schéma récapitulatif du métabolisme lipidique	p.36
Figure 1.19 : Mécanismes potentiels de transport des acides gras via UCP3 et UCP aviaire	p.38
Figure 1.20 : différents genres de manchots	p.45
Figure 1.21 : Photographies illustrant la spécialisation du Manchot royal à la plongée	p.46
Figure 1.22 : Carte de l'Archipel de Crozet	p.48
Figure 1.23 : Le Canard de Barbarie (<i>Cairina moschata</i>) au stade éclosion, caneton et à l'âge adulte	p.51

Deuxième partie : Matériel et méthodes

Figure 2.1 : la baie du Marin, île de la Possession, Archipel de Crozet	p.54
Figure 2.2 : représentation schématique du principe de thermochimie respiratoire	p.55
Figure 2.3 : Illustration de la chaîne métabolique utilisée pour les canetons ou les manchots	p.56
Figure 2.4 : Illustration des différents éléments composant la chaîne métabolique	p.57
Figure 2.5 : illustration du protocole de prélèvements sanguins	p.61
Figure 2.6 : illustration schématique du système d'anesthésie gazeuse	p.63
Figure 2.7 : Protocole d'extraction des mitochondries musculaires intermyofibrillaires par centrifugation différentielle	p.65
Figure 2.8 : Illustration de la courbe obtenue lors d'une respiration mitochondriale classique et du rapport de contrôle respiratoire (RCR)	p.67
Figure 2.9 : Principe de la mesure du rapport ATP/O	p.68
Figure 2.10 : Matériel utilisé lors de l'étude mitochondriale	p.69
Figure 2.11 : Principe de la RT-PCR semi-quantitative (en rapport à l'actine) et de la quantification sur gel d'agarose	p.72

Quatrième partie : Discussion générale

Figure 4.1 : Rappel schématique des différentes études replacées dans leur contexte scientifique	p.125
Figure 4.2 : Relation entre capacités de NST et intensité du froid auquel les canetons ont été exposés	p.126
Figure 4.3 : Relation entre NST et âge chez des canetons élevés à thermoneutralité	p.127
Figure 4.4 : Expression relative de l'UCP aviaire dans le muscle squelettique des canetons en fonction de la température d'acclimatation (A) et illustration de la corrélation entre UCP aviaire et NST en fonction de la température d'acclimatation (B)	p.127
Figure 4.5 : Description de la mise en place des mécanismes de régulation thermique du <i>M. royal</i>	p.128
Figure 4.6 : Effet de la perfusion de triglycérides sur le métabolisme <i>in vivo</i> de <i>M. royaux</i> juvéniles	p.129
Figure 4.7 : Illustration de la théorie des traits d'histoire de vie d'un caneton. Budget énergétique à allouer à trois composantes différentes : Croissance, survie (thermorégulation) et reproduction	p.132
Figure 4.8 : Illustration de la relation « environnement-stratégie choisie » chez le lézard vivipare (<i>Lacerta vivipara</i>) lors d'une exposition au froid	p.135
Figure 4.9 : Illustration des différents rôles potentiels de l'UCP aviaire en réponse à un stress froid	p.138

Liste des tableaux

Première Partie : Introduction et Rappels bibliographiques

Tableau 1.1 : tableau récapitulatif des différentes études portant sur la thermorégulation des oiseaux p.19

Tableau 1.2 : Influence de la nature des substrats métabolisés au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale p.28

Tableau 1.3 : Augmentation de l'expression relative de l'UCP aviaire chez différentes espèces d'oiseaux p.40

Deuxième partie : Matériel et méthodes

Tableau 2.1 : Séquence des amorces utilisées en RT PCR p.71

Quatrième partie : Discussion générale

Tableau 4.1 : Effet de la durée d'acclimatation sur différents paramètres physiologiques p.131

N.B. : Les figures et les tableaux de la troisième partie « **Etudes expérimentales** » ne sont pas inclus dans cette liste.

Liste des publications et des communications scientifiques

Publications présentées et discutées dans le manuscrit

Teulier L., Rouanet J-L., Letexier D., Romestaing C., Belouze M., Rey B., Duchamp C. and Roussel D. Cold acclimation induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency. *J Exp Biol.* 213: 2476-82. **2010.**

Teulier L., Rouanet J-L., Rey B., Duchamp C. and Roussel D. Non Shivering Thermogenesis in the Muscovy duck (*Cairina moschata*): an ecological perspective for precocial bird. *En préparation*

Teulier L., Tornos J., Rouanet J-L., Lecoadic M., Dolmazon V., Rey B., Duchamp C. and Roussel D. King penguins burn fat to keep warm, a metabolic adaptation to life in cold sea water. *En préparation*

Publications non présentées dans le manuscrit

Rey B., Roussel D., Teulier L., Eyenga P., Degletagne C., Belouze M. and Duchamp C. Functional argument for the existence of an avian nitric oxide synthase in muscle mitochondria: effect of cold acclimation. *Febs. Lett.* 585: 173-177. **2011**

Salin K., Teulier L., Rey B., Rouanet J-L., Voituron Y., Duchamp C. and Roussel D. Tissue variation of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in cold acclimated ducklings. *Acta. Biochim. Pol.* 57: 409-412. **2010**

Belouze M., Sibille S., Rey B., Rouanet J-L., Roussel D., Letexier D., Romestaing C., Teulier L., Baetz D., Koubi H. and Duchamp C. Leanness of Lou/C rats does not require thermogenic activation of brown adipose tissue. *En révision dans Physiol. Behav.*

Teulier L., Tornos J., Rouanet J-L., Rey B., Duchamp C. and Roussel D. Lipid oxidation sustain thermogenic processes in King penguin chicks (*Aptenodytes patagonicus*). *En preparation.*

Articles de vulgarisation scientifique

Raccurt M., Rey B., Degletagne C., Teulier L., Roussel D., Rouanet J-L. et Duchamp C. Les manchots, modèles d'adaptations géniques aux environnements polaires. *Rapport d'activités de l'Institut Polaire Français Paul Emile Victor 2010.*

Communications orales

Loïc Teulier, Jean-Louis Rouanet, Dominique Letexier, Maud Belouze, Claude Duchamp and Damien Roussel. Skeletal muscle avUCP expression correlates with cold-induced nonshivering thermogenesis capacity in ducklings. *Workshop - The Effects of Temperature on Avian Physiology and Behaviour*, Janvier 2010, Newcastle upon Tyne, U.K.

Loïc Teulier, Jean-Louis Rouanet, Jérémy Tornos, Vincent Marmillot, Claude Duchamp, Damien Roussel. Passage from shore to marine life increases lipid oxidative capacity in juvenile king penguins. *7th International Penguin Conference*, août – septembre 2010, Boston Massachusetts, U.S.A.

Communications affichées

Loïc Teulier, Jean-Louis Rouanet, Claude Duchamp et Damien Roussel. Etudes des adaptations métaboliques du muscle squelettique chez le caneton de barbarie soumis à une exposition au froid d'intensité variable. *11^{ème} Journée Scientifique de l'EDISS*, mars 2007, Lyon, France.

Loïc Teulier, Jérémy Tornos, Jean-Louis Rouanet, Mireille Raccurt, Damien Roussel et Claude Duchamp. Augmentation des capacités d'oxydation des lipides lors du passage en mer du manchot royal. *6^{ème} journée du CNFRA*, novembre 2009, Paris, France et *15^{ème} Journée Scientifique de l'EDISS*, mars 2010, Lyon, France.

Karine Salin, Benjamin Rey, Claire Hemmer, Odile Grolet, Emilien Luquet, Maud Belouze, Loic Teulier, Caroline Romestaing, Sylvie Bony, Isabelle Gaillard, Alain Devaux, Damien Roussel and Yann Voituron. La plasticité mitochondriale : clé du trade-off entre longévité et croissance ? *Septembre 2010. Ecologie 2010, Montpellier, France.*

Liste des abréviations

ADP	adénosine-5'-diphosphate
ATP	adénosine-5'-triphosphate
AGs	acides gras
ANT	transporteur des nucléotides adényliques (adénine nucléotide translocase)
BSA	albumine bovine sérique (bovine serum albumine)
COx	cytochrome oxydase
FADH ₂	flavine adénine dinucléotide
FCCP	carbonyl cyanide-p- trifluoromethoxyphenyl-hydrazone
G6P	glucose-6-phosphate
GAPDh	glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GDP	guanosine-5'-diphosphate
H ₂ O ₂	péroxyde d'hydrogène
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
NEFA	acides gras non estérifiés
NST	thermogenèse sans frisson (<i>non shivering thermogenesis</i>)
RMR	métabolisme de repos
ROS	dérivés réactifs de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>)
SOD	superoxide dismutase
T ₃	3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine
TAB	tissu adipeux brun
TG	Triglycérides
UCP	protéine découplante (<i>Uncoupling Protein</i>)
•VO ₂	débit d'oxygène consommé

Sommaire

Avant-propos	p.1
Première Partie : Introduction & Rappels bibliographiques	p.4
I. Petite introduction au concept d'écophysiologie	p.5
1. L'environnement	p.5
2. L'adaptation : un concept encore confus	p.6
a. <i>Acclimation, Acclimatization et Adaptation : à l'origine des confusions</i>	p.6
b. <i>La difficulté de la traduction française</i>	p.7
3. Plasticité phénotypique ou acclimatation	p.7
II. La thermogenèse de régulation	p.8
1. Généralités	p.8
a. <i>Endothermes versus ectothermes</i>	p.8
b. <i>Températures critiques</i>	p.10
2. Chez les Oiseaux	p.11
a. <i>Thermogenèse de frisson</i>	p.12
1. Définition	p.12
2. Différents types de frisson	p.13
3. Le frisson thermique, durable dans le temps ?	p.14
b. <i>Thermogenèse sans frisson</i>	p.15
1. Petit rappel chez les mammifères	p.15
2. Différence Mammifères-Oiseaux	p.17
3. Mise en évidence de la NST aviaire	p.18
3. Ontogenèse de la thermogenèse de régulation	p.20
a. <i>Nidicoles/nidifuges</i>	p.20
b. <i>Ontogenèse chez les oiseaux nidicoles</i>	p.21
c. <i>Ontogenèse chez les oiseaux nidifuges</i>	p.21
III. Métabolisme mitochondrial	p.23
1. Théorie chimio-osmotique de Mitchell (1961)	p.23
2. La mitochondrie : au cœur des phénomènes de thermogenèse	p.24

3.	Modulations de l'efficacité mitochondriale	p.26
	<i>a. La composition membranaire</i>	<i>p.27</i>
	<i>b. La nature des substrats utilisés</i>	<i>p.27</i>
	<i>c. La présence de transporteurs protéiques</i>	<i>p.29</i>
IV.	L'UCP aviaire : son implication dans la thermogenèse de régulation	p. 30
1.	Les UCPs : généralités	p.30
	<i>a. La famille des UCPs</i>	<i>p.30</i>
	<i>b. UCP1</i>	<i>p.30</i>
	<i>c. UCP2 et UCP3</i>	<i>p.30</i>
	<i>d. Les autres UCPs</i>	<i>p.31</i>
2.	L'UCP aviaire	p.31
	<i>a. Généralités</i>	<i>p.31</i>
	<i>b. Régulation de l'UCP aviaire</i>	<i>p.32</i>
	- Par les hormones thyroïdiennes	p.32
	- Par le glucagon	p.32
	- Par le système β adrénergique	p.33
	<i>c. Rôles potentiels de l'UCP aviaire</i>	<i>p.33</i>
	– Un rôle antiradicalaire ?	p.34
	– Un rôle dans le métabolisme des lipides ?	p.35
	– Un rôle thermogène ?	p.39
V.	Objectifs de la thèse	p.42
VI.	Présentation des modèles expérimentaux	p.44
1.	Le manchot royal : <i>Aptenodytes patagonicus</i> (Miller, 1778)	p.44
	<i>a. Description générale</i>	<i>p.44</i>
	1. Famille des Sphéniscidés, genre <i>Aptenodytes</i>	p.44
	2. Le Manchot royal : un spécialiste de la vie marine	p.45
	3. Cycle reproducteur du manchot royal	p.47
	<i>b. Description du milieu de vie : Archipel de Crozet</i>	<i>p.47</i>
	<i>c. Le passage en mer, une étape clé de l'adaptation thermique</i>	<i>p.48</i>
	<i>d. Intérêts et limites du modèle</i>	<i>p.49</i>
2.	Le caneton de Barbarie : <i>Cairina moschata</i> (Linné, 1758)	p.50
	<i>a. Description générale</i>	<i>p.50</i>
	<i>b. Avantage du modèle</i>	<i>p.51</i>

Deuxième Partie : Matériel et Méthodes

p.52

I.	Lots expérimentaux d'animaux	p.53
1.	Les canetons de Barbarie	p.53
2.	Les manchots royaux juvéniles	p.53
II.	Etude <i>in vivo</i>	p.54
1.	Mesure de la thermogenèse sans frisson	p.54
2.	Mesure du métabolisme <i>in vivo</i>	p.55
a.	<i>Principe de la thermochimie respiratoire</i>	p.55
b.	<i>Description de la chaîne métabolique</i>	p.56
	<u><i>Pour les canetons</i></u>	p.57
	<u><i>Pour les manchots</i></u>	p.58
c.	<i>Protocole expérimental</i>	p.58
	<u><i>Pour les canetons</i></u>	p.58
	<u><i>Pour les manchots</i></u>	p.58
3.	Mesure du frisson	p.59
a.	<i>Méthode d'acquisition</i>	p.59
b.	<i>Traitement des données par le logiciel Biopac Student lab v.3.6.7.</i>	p.59
4.	Pose de cathéters, perfusion et prélèvements	p.60
a.	<i>Mise en place des cathéters</i>	p.60
b.	<i>Protocole expérimental</i>	p.60
c.	<i>Les prélèvements</i>	p.61
d.	<i>Dosages plasmatiques</i>	p.61
	1. Dosage des acides gras	p.62
	2. Dosage des triglycérides	p.62
	3. Dosage du glycérol	p.62
III.	Anesthésie et Chirurgie	p.62
1.	Anesthésie gazeuse	p.62
2.	Chirurgie (<i>d'après Falhman et al., 2005</i>)	p.63
IV.	Etude biochimique	p.64
1.	Sacrifice et prélèvements des tissus	p.64
2.	Isolement des mitochondries de muscle squelettique (gastrocnémien interne) par centrifugation différentielle	p.64
3.	Mesure des respirations mitochondriales	p.66
a.	<i>Principe de la polarographie</i>	p.66
b.	<i>Respiration mitochondriale classique</i>	p.66
c.	<i>Calcul du RCR (Rapport de Contrôle Respiratoire)</i>	p.67
d.	<i>Mesure de la Cytochrome-c Oxydase</i>	p.67
4.	Mesure du rapport ATP/O	p.68
a.	<i>Principe</i>	p.68
b.	<i>Protocole</i>	p.69

V. Etude moléculaire	p.70
1. Technique de RT-PCR	p.70
2. Extraction et dosage des ARN totaux	p.70
3. Rétro transcription des ARN messagers	p.70
4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	p.71
5. Analyse des produits de PCR	p.71

VI. Etude statistique	p.73
------------------------------	-------------

Troisième Partie : Etudes expérimentales **p.74**

Etude 1 : *La thermogenèse sans frisson induite par une acclimatation au froid est associée à une augmentation de l'expression de l'UCP aviaire sans altération du rapport ATP/O.* **p.75**

Résumé de l'étude 1 **p.76**

Méthodes **p.76**

Animaux **p.76**

Principales méthodes utilisées **p.77**

Principaux résultats et conclusion **p.77**

Article complet **p.78**

Références bibliographiques **p.90**

Etude 2 : *La thermogenèse sans frisson chez le caneton de Barbarie : une perspective écologique pour les oiseaux nidifuges.* **p.94**

Résumé de l'étude 2 **p.95**

Méthodes **p.95**

Animaux **p.95**

Principales méthodes utilisées **p.96**

Principaux résultats et conclusion **p.96**

Article complet **p.97**

Références bibliographiques **p.106**

Etude 3 : *Brûler des lipides pour rester chaud, une adaptation métabolique des manchots royaux nécessaire pour la vie marine.* **p.108**

Résumé de l'étude 3 **p.109**

Méthodes	p.110
<i>Animaux</i>	<i>p.110</i>
<i>Principales méthodes utilisées</i>	<i>p.110</i>
Principaux résultats et conclusion	p.110
Article complet	p.111
Références bibliographiques	p.120

Quatrième Partie : Discussion générale & perspectives **p.123**

I. Rappel des principaux résultats	p.125
1. La NST, un mécanisme adaptatif répondant à une plasticité phénotypique	p.126
<i>a. Une capacité d'ajustement de la NST en fonction de l'intensité du stress thermique</i>	<i>p.126</i>
<i>b. Une régulation de la NST à thermoneutralité</i>	<i>p.126</i>
2. Corrélation de l'UCP aviaire avec la température d'acclimatation	p.126
3. Le métabolisme lipidique, au cœur de la réponse adaptative	p.128
II. Discussion générale	p.130
1. Vers une vision plus intégrée de la thermogenèse sans frisson	p.130
<i>a. Existence encore controversée chez les Oiseaux</i>	<i>p.130</i>
<i>b. Une stratégie nécessaire pour les oiseaux nidifuges...</i>	<i>p.132</i>
<i>c. ...mais délaissée par les oiseaux nidicoles aux premiers temps après éclosion</i>	<i>p.133</i>
<i>d. NST versus Frisson : une question de coût ?</i>	<i>p.134</i>
<i>e. Une mise en place induite par les caractéristiques climatiques ?</i>	<i>p.134</i>
2. L'UCP aviaire : au cœur des mécanismes de thermorégulation	p.135
<i>a. L'UCP aviaire : un petit pas vers un rôle thermogène...</i>	<i>p. 136</i>
<i>b. ... mais un grand pas vers une implication importante dans la thermogenèse de régulation !!</i>	<i>p.137</i>

III. Perspectives	p.139
1) <i>A quel âge les canetons arrivent-ils à développer des capacités de NST ? La NST est-elle vraiment efficace dès le plus jeune âge ?</i>	<i>p.139</i>
2) <i>L'expression de l'UCP aviaire est-elle corrélée avec les capacités de thermogenèse sans frisson développées au cours du temps ?</i>	<i>p.139</i>
3) <i>La NST est-elle réellement plus avantageuse en termes de coût énergétique que le frisson lors d'une exposition chronique ?</i>	<i>p.140</i>
4) <i>La NST est-elle un phénomène présent chez la plupart des espèces aviaires?</i>	<i>p.140</i>
 Bibliographie	 p.141
 Annexes	 p.154
Glossaire	p.155

Avant-propos

En 2001, en tournant le « Peuple Migrateur », Jacques Perrin a montré au grand public l'incroyable diversité des Oiseaux. La classe des *Aves* (**Linneus, 1758**) composée de près de 10 000 espèces constitue le plus grand groupe de vertébrés endothermes, les Mammifères ne comptant que 5500 espèces connues. De par leur nombre important, les Oiseaux sont les témoins d'une importante diversité morphologique et d'une vaste répartition géographique. Ils ont ainsi colonisé avec succès la plupart des niches écologiques, aussi « extrêmes » soient-elles... Que ce soit le chocard à bec jaune (*Pyrrhocorax graculus*) seul endotherme à se reproduire à près de 6500 m, l'alouette de Dunn (*Eremalauda dunnii*) qui vit au milieu du désert d'Arabie et dont la zone de neutralité thermique se situe entre 35°C et 45°C, l'oie à tête barrée (*Anser indicus*) qui peut voler à des altitudes de plus de 9000 m au cours de ses migrations au dessus de la chaîne himalayenne ou la sterne arctique (*Sterna paradisae*) nichant en Arctique qui parcourt chaque année 36 000 km pour hiverner dans la région subantarctique, les exemples extraordinaires d'adaptations phénotypiques ne manquent pas. Ainsi la colonisation des **environnements froids** a induit chez les Oiseaux bon nombre de modifications morphologiques et physiologiques. Cette contrainte climatique a largement été illustrée dans « La Marche de L'Empereur » (**Jacquet, 2004**) et « Happy feet » (**Miller, 2005**) par l'incroyable capacité du Manchot empereur (*Aptenodytes fosteri*) à vivre et à se reproduire au cœur de l'hiver austral sur les côtes du continent Antarctique.

Outre cet exemple particulier, de nombreuses espèces d'oiseaux vivent à des latitudes élevées, que ce soit en Arctique ou en Antarctique, nécessitant la mise en place d'adaptations pour le maintien de leur **endothermie**. Elles peuvent être d'ordres comportemental (regroupements en crèches, terriers), morphologique (raccourcissement des membres, amélioration de la qualité d'isolation et diminution de la surface d'échange thermique) et/ou métabolique (frisson thermique et/ou thermogénèse sans frisson).

Même si la **thermogénèse sans frisson** (NST pour *Non Shivering Thermogenesis*) est très bien caractérisée chez les Mammifères par la présence du tissu adipeux brun et l'activité thermogène d'une protéine découplante spécifique, l'UCP1 (*UnCoupling Protein 1*), son existence reste à ce jour débattue chez les Oiseaux. En effet, étant dépourvues de tissu adipeux brun, de nombreuses espèces semblent incapables de réguler leur température interne via ce mécanisme de NST. Cependant, chez deux espèces d'oiseaux, le **Canard de Barbarie** (*Cairina moschata*) et le **Manchot royal** (*Aptenodytes patagonicus*), une capacité de NST a été clairement décrite lors d'expositions chroniques au froid. De plus, au début des années 2000, la découverte d'une **protéine découplante aviaire** (*avUCP*), notamment chez

ces deux espèces, a entraîné un engouement scientifique pour essayer de décrire le ou les rôles potentiels de cette protéine : par analogie fonctionnelle avec les isoformes UCP 1, 2 et 3 des Mammifères, des fonctions anti-radicalaires, dans le métabolisme lipidique et thermogènes peuvent lui être imputées.

De fait, avoir la possibilité d'étudier ces deux espèces dans le but de caractériser un peu mieux d'une part ce mécanisme de thermogenèse sans frisson et d'autre part, l'implication de la protéine **avUCP** dans les processus de thermorégulation représentait une excellente opportunité.

Pourquoi ces deux espèces en particulier ?

Le **Manchot royal**, oiseau semi nidicole et « totalement » adapté à la vie marine, est un très bon candidat pour étudier les facultés de thermogenèse de régulation développées par un oiseau face à des conditions climatiques naturellement défavorables. Trois grands stress thermiques jalonnent le cycle de vie du Manchot royal :

- lors de son **éclosion**, où le poussin n'est pas encore endotherme et où sa régulation thermique n'est possible que par les soins de ses parents
- lors de **l'hiver austral** subantarctique, au cours duquel la température reste aux alentours de 0°C mais avec des précipitations et des vents très importants, entraînant une augmentation du « froid ressenti » (effet « *Windchill* ») où le poussin reste à terre
- lors du **passage en mer** des juvéniles, véritable choc thermique dû notamment à la conductance thermique de l'eau largement augmentée (x 20 par comparaison avec celle de l'air).

Le manchot royal représente donc un fabuleux modèle pour étudier la plasticité phénotypique mais son statut d'animal sauvage protégé et sa situation géographique lui confèrent cependant certaines limites.

Pour s'affranchir de ces difficultés, nous avons étudié un oiseau domestique, le **caneton de Barbarie** (*Cairina moschata*) présentant les caractéristiques d'animaux de laboratoire, c'est-à-dire appartenant à une souche bien identifiée (ici par un pédigrée INRA) pour éviter le plus possible les variabilités inter-individuelles, facile à obtenir et à élever. Nous avons pu acclimater différents groupes de canetons à des températures basses en contrôlant les autres paramètres (photopériode, humidité, ventilation) nous focalisant ainsi sur l'effet direct d'une exposition chronique au froid. De plus, un avantage non négligeable de cette espèce est qu'il est possible de réaliser une étude plus invasive chez cet oiseau, éthiquement discutable et difficile à mettre en place chez le Manchot royal.

Nous avons pu ainsi comparer les adaptations métaboliques mises en place chez une espèce soumise de façon naturelle et chez une espèce acclimatée expérimentalement à un stress froid chronique.

Cependant il semble invraisemblable que la thermogénèse sans frisson ne soit restreinte qu'à ces deux espèces d'Oiseaux. De fait, tout au long de mon manuscrit, j'essaierai de replacer ce mécanisme concret dans un **contexte écophysiologiste** afin de se questionner quant aux avantages écologiques que peut apporter un tel processus thermogène chez certaines espèces aviaires.

Aussi la première partie de cette thèse, sous forme de « *Rappels bibliographiques* », servira à replacer nos études expérimentales dans leur contexte scientifique. Pour cela, nous avons essayé de synthétiser dans un premier temps les principales études portant sur les processus thermogènes des oiseaux. Et dans un deuxième temps nous avons tenté d'exposer les différents rôles potentiels de l'UCP aviaire en relation avec la thermogénèse de régulation. A la fin de ce chapitre, les deux modèles d'études ainsi que leurs avantages et limites ont été décrits. La deuxième partie « *Matériel et Méthodes* » reprendra les principales méthodes utilisées au cours de ma thèse dans les différentes études expérimentales. La troisième partie sera consacrée à la présentation des trois « *Etudes expérimentales* » effectuées au cours de ma thèse, sous forme d'articles publiés ou en préparation. Enfin, la quatrième et dernière partie intitulée « *Discussion générale et perspectives* », servira à clore ce travail en proposant une large digression sur des aspects intégrés ainsi que des perspectives pour répondre aux nouveaux questionnements.

Première partie

Introduction

&

Rappels

bibliographiques

I. Petite introduction au concept d'écophysiologie

L'écophysiologie est l'étude des adaptations d'un organisme à son environnement [Figure 1.1]. Pour essayer de bien intégrer ce concept, nous allons reprendre chaque terme de cette définition.

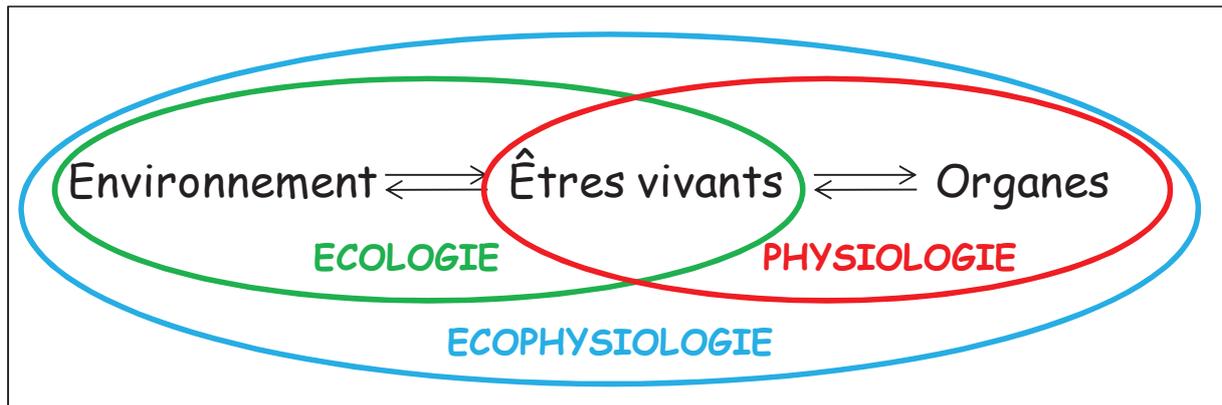


Figure 1.1 : Illustration du concept d'Ecophysiologie. C'est la fusion de deux grandes disciplines, l'Ecologie (qui définit les interactions entre les Êtres Vivants et leur Environnement) et la Physiologie (qui définit l'étude du fonctionnement des Êtres Vivants et de leur Organes).

1. L'environnement

L'environnement d'un organisme vivant n'est pas restreint seulement au climat. C'est en effet un système complexe comprenant de nombreuses variables propres à l'individu (alimentation, prédation, compétition intra et inter-espèces) mais aussi physiques (teneur en oxygène, pression atmosphérique, altitude et température...) (Willmer et al., 2000). A part certains milieux de vie très spécifiques, comme le milieu souterrain très tamponné, donc très peu variable, la majorité des environnements est soumise à une variabilité au cours du temps (saisons, cycles nycthémeraux) ou de l'espace (migrations...). Ces changements vont être à la source d'une multitude d'adaptations comportementales et/ou génétiques générées par les individus pour faire face à leur milieu.

Au cours de nos études, nous nous sommes focalisés sur les variations climatiques du milieu, et plus précisément sur la contrainte thermique froide, en conditions naturelle ou expérimentale.

2. L'Adaptation : un concept encore confus...

Aux vues des différentes définitions que l'on peut trouver pour le terme « adaptation », ce concept reste encore aujourd'hui délicat à définir.

a. *Acclimation, Acclimatization et Adaptation : à l'origine de la confusion*

La confusion vient notamment de la littérature anglaise dans laquelle on trouve trois termes : *Acclimation, Acclimatization* et *Adaptation*.

Le terme « *acclimation* » est traditionnellement utilisé pour expliquer les changements adaptatifs d'un organisme en réponse à des variabilités environnementales (en particulier, des changements climatiques) induites de façon expérimentale. Le terme « *acclimatization* » est quant à lui réservé pour décrire les adaptations d'un organisme en réponse à des changements climatiques naturels (**Willmer et al., 2000 ; IUPS Thermal Commission, 2001 ; Wilson et Franklin, 2002**).

Pour les auteurs du *Glossary of Terms for Thermal Physiology* l'« *acclimation* » et l'« *acclimatization* » sont toutes deux comprises dans le concept d'« *adaptation* », décrit comme étant l'ensemble des modifications d'un organisme visant à réduire les contraintes physiologiques imposées par un stress environnemental. Il est mentionné deux types d'adaptations : phénotypique (changements opérés au cours de la vie de l'organisme) et génotypique (résultat de la sélection génétique). Donc *acclimation* et *acclimatization* sont considérées dans les modifications phénotypiques.

Cependant, **Willmer et collaborateurs (2000)** apportent quelques précisions quant à l'aspect réversible de ces deux phénomènes. Il parle alors de réponses physiologiques à différentes échelles, en partant de la plus longue à se mettre en place de manière irréversible, i.e. l'adaptation, jusqu'à des réponses physiologiques et/ou comportementales immédiates et très ponctuelles, en passant par des modifications phénotypiques plus rapides et réversibles (« *acclimation* » et « *acclimatization* »).

L'auteur fait aussi une distinction prononcée entre les modifications phénotypiques apparaissant aux stades juvéniles des organismes et parle ainsi de plasticité développementale, concept repris par **Wilson et Franklin en 2002**.

b. La difficulté de la traduction française

On comprend alors aisément que le manque de précision sémantique de la langue française entraîne des confusions...

En effet, l'« Adaptation » française est restreinte à l'adaptation génotypique, c'est-à-dire liée à la sélection naturelle, donc intergénérationnelle. Et l'« Acclimatation » française est *définie comme étant l'ensemble des changements persistants d'une fonction spécifique due à une exposition prolongée à une condition d'environnement (Eckert et al., 1999)*. Le même auteur apporte une précision supplémentaire en décrivant le phénomène de « Naturalisation », traduction sémantique du terme anglais « *acclimation* », terme très peu usité [Figure 1.2].



Figure 1.2 : Illustration des différents termes Adaptation, Acclimatation et Naturalisation

L'Ours Polaire est adapté à son milieu, l'explorateur humain peut devenir partiellement acclimaté et le rat de laboratoire est forcé à s'acclimater au froid. D'après Willmer et al, 2000.

3. Plasticité phénotypique ou acclimatation

La plasticité phénotypique est la capacité que possède un génotype unique à produire plusieurs formes alternatives de morphologie, d'état physiologique et/ou de comportement en réponse à des conditions environnementales. (West-Eberhard, 1989)

Historiquement, une acclimatation entraîne nécessairement des modifications avantageuses (fitness et physiologie améliorée) en réponse à un stress environnemental : c'est l'hypothèse de l'acclimatation bénéfique (Leroi et al., 1994). Pour simplifier nos propos, l'acclimatation est une plasticité phénotypique qui ne prend pas en compte les effets néfastes des variations environnementales.

Pour faciliter la compréhension de la thèse, nous utiliserons donc le terme d'acclimatation pour définir les modifications phénotypiques intra-générationnelles et réversibles d'un organisme face à un stress environnemental et nous définirons le terme d'adaptation comme étant l'ensemble des modifications intergénérationnelles d'une population en réponse à une contrainte environnementale.

II. La thermogenèse de régulation

1. Généralités

Depuis quelques temps, que ce soit dans la communauté scientifique ou au niveau du grand public, les variations climatiques sont devenues un sujet de prédilection. Effectivement on parle de plus en plus du réchauffement climatique (**Walther et al., 2002 ; Hughes, 2000 ; Bradshaw et Holzapfel, 2006**) mais il ne faut pas oublier que dans certaines zones du globe terrestre, l'hiver reste une période rude. Les variations climatiques sont un des facteurs environnementaux entraînant le plus de contraintes au niveau des organismes qui les subissent. Ces organismes doivent s'adapter et/ou s'acclimater pour faire face au stress engendré par ces fluctuations thermiques.

Tous les organismes, ectothermes et endothermes, qui vivent dans des milieux de vie non tamponnés, subissent des contraintes environnementales.

a. Ectothermes versus Endothermes

Les ectothermes, groupe composé des insectes, des amphibiens, des reptiles et des poissons, subissent ces contraintes thermiques. En effet, ils sont incapables de réguler leur température interne (T_c , pour température corporelle) qui évolue de façon stricte en fonction de la température ambiante. Pour lutter contre le chaud ou contre le froid, ils ont principalement adopté des stratégies comportementales (évitement, enfouissement...). Cependant, lors de stress thermiques froids, ils ont développé différents mécanismes de défense d'ordre physiologique, comme la tolérance au gel (prise en glace partielle des fluides corporels) ou la surfusion (abaissement de la température de congélation en dessous de 0°C) retrouvées chez les insectes (**Sinclair et al., 2003**) et chez les amphibiens (**Costanzo et al., 1993 ; Voituron et al., 2002**).

Contrairement à ce groupe, les endothermes (mammifères et oiseaux) se caractérisent, eux, par la capacité à réguler leur température interne à un niveau élevé et constant dans une certaine zone de température, appelée zone d'homéothermie, plus ou moins importante selon les espèces (spécialistes vs généralistes) [Figure 1.3].

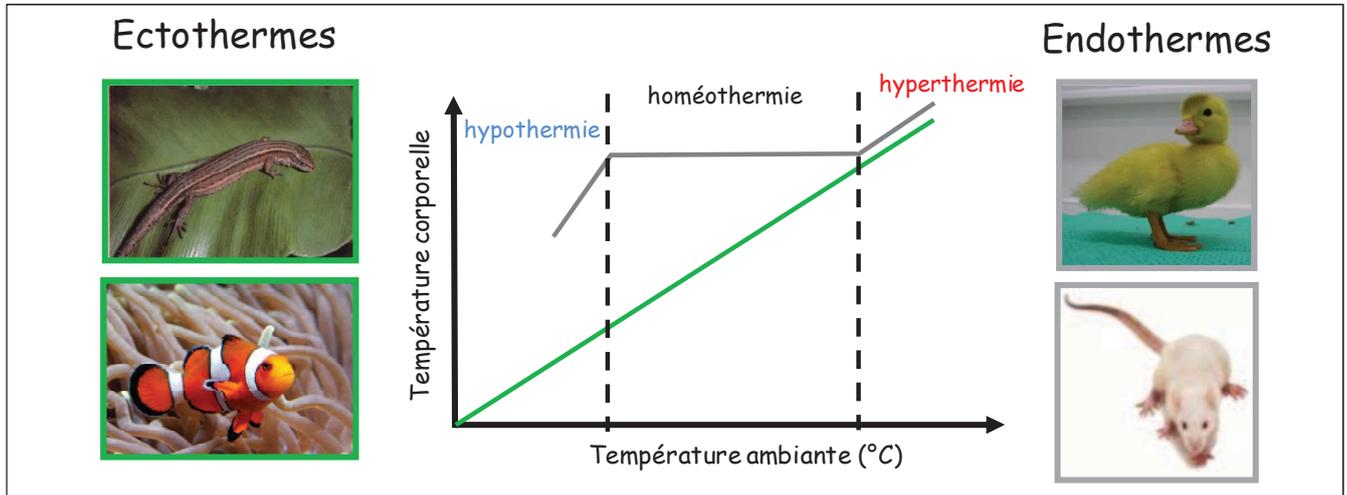


Figure 1.3 : Ectothermes versus Endothermes - deux réactions différentes face aux variations thermiques. On remarque sur cette représentation graphique, que la température corporelle des ectothermes peut parfois être élevée. Du coup, l'appellation « animaux à sang froid » est un abus de langage...

Le principal avantage que procure l'endothermie par rapport à l'ectothermie est sans nul doute le fait que les endothermes, en s'affranchissant des contraintes de température ambiante, arrivent à garder optimal leur métabolisme dans la zone d'homéothermie. Cependant l'inconvénient majeur est que l'organisme est obligé d'allouer un important budget énergétique pour ce système de régulation thermique, ce qui en période de carence alimentaire, peut être très contraignant.

b. Températures Critiques

Ainsi, pour garder leur température interne constante, les endothermes arrivent à moduler leur métabolisme en fonction de la température ambiante [Figure 1.4]. Il est important de noter que la plupart des endothermes sont généralement mieux équipés d'un point de vue physiologique pour lutter efficacement contre le froid (thermogenèse) que contre le chaud (thermolyse).

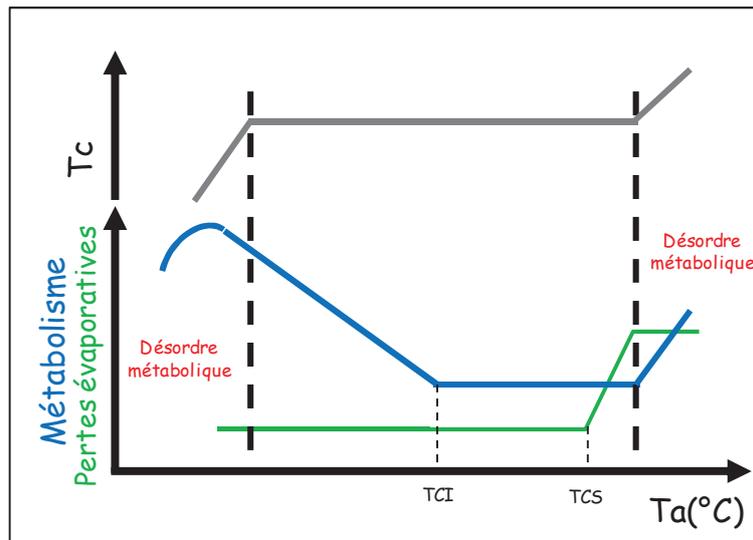


Figure 1.4 : Relation entre Métabolisme et Température corporelle en fonction de la température ambiante. T_a : Température ambiante, T_c : Température corporelle, T_{CI} : Température Critique Inférieure, T_{CS} : Température Critique Supérieure. En deçà de la T_{CI} , l'élévation du métabolisme pour des températures ambiantes basses correspond au mécanisme de thermogenèse. La T_{CS} , quant à elle, délimite la température ambiante pour laquelle les pertes évaporatives (mécanismes de thermolyse) vont augmenter sans élévation du métabolisme pour permettre de maintenir une homéothermie. Lorsque les pertes évaporatives ne permettent plus de réguler la température corporelle, le métabolisme augmente et l'organisme entre en hyperthermie. (d'après Barré et al., 2001)

Au-delà d'une certaine température ambiante, appelée Température Critique Supérieure (T_{CS}), les mécanismes de thermolyse (pertes évaporatives, vasodilatation périphérique...) vont s'activer pour maintenir une température interne constante sans élévation du métabolisme. Lorsque ces mécanismes ne sont plus efficaces, le métabolisme augmente, conduisant à un désordre métabolique léthal, caractérisé par une hyperthermie. En deçà de la Température Critique Inférieure (T_{CI}), les endothermes augmentent leur métabolisme pour produire de la chaleur (thermogenèse) et arrivent ainsi à garder élevée et constante leur température interne. Il faut ajouter qu'à partir d'une certaine température ambiante, ils ne sont plus capables d'augmenter suffisamment leur métabolisme, ce qui entraîne une hypothermie potentiellement mortelle.

Dans la suite de ma thèse, nous n'aborderons pas d'avantage les processus d'acclimatation et d'adaptation mis en place chez les Ectothermes. Nous nous focaliserons sur la thermogenèse de régulation des endothermes et en particulier celle des Oiseaux.

2. Chez les Oiseaux

La classe des oiseaux, avec près de 10000 espèces connues, forment le groupe le plus important du sous-embranchement des Vertébrés Endothermes (5400 espèces de mammifères recensées) (**GlobalTwitcher.com**). Ils ont su coloniser la plupart des niches écologiques et ont donc été souvent confrontés au cours du temps à des conditions environnementales plus ou moins extrêmes allant des climats tempérés chauds ou froids jusqu'aux zones désertiques (revue dans **Williams et Tieleman, 2001**), de haute-altitude (revue dans **Willmer et al., 2000**), polaires arctique (**Scholander et al., 1950**) et antarctique (revue dans **Shirihai, 2007**)...

La lutte contre le froid s'organise en trois étapes plus ou moins chevauchantes :

- des stratégies comportementales (revue dans **Schmidt-Nielsen, 1990**)

Elles peuvent être réalisées à l'échelle individuelle et/ou interindividuelles et mises en place à plus ou moins long terme, telles que l'évitement (migrations), l'enfouissement (terriers et abris de certains oiseaux polaires), les regroupements (« *turtle huddling* » des Manchots empereurs) et le repli sur soi en augmentant la couche d'air isolante par piloerection (pour protéger les extrémités et minimiser la surface corporelle en contact avec l'environnement). Il faut ajouter que c'est souvent ce type de stratégies qui est observé dans les premiers temps d'une exposition au froid.

- des stratégies morphologiques qui apparaissent en général au cours de l'évolution.

Ainsi, la plupart des animaux polaires ont réduit leurs extrémités (membres locomoteurs, oreilles principalement exposées au froid), ont diminué leur rapport surface/volume (favorisé par une croissance rapide, **Schekkerman et al., 2003 ; Raccurt et al., 2008**) et augmenté leur isolation (densité du plumage, augmentation de la couche adipeuse). Ce type de stratégie mise en place sur le long terme s'apparente clairement à une adaptation et de fait n'est que très peu modifiables lors de phénomènes climatiques stochastiques.

- des stratégies métaboliques et vasculaires mises en place lors d'une acclimatation

Outre la torpeur, stratégie caractérisée par un cycle de phases d'hypométabolisme suivies de phases de réchauffement en fonction des variations nyctémérales, retrouvée

chez quelques espèces, notamment les colibris (revue dans **Bicudo et al., 2002**), la thermogenèse de régulation ou facultative est définie par deux mécanismes principaux, la thermogenèse de frisson et la thermogenèse sans frisson. Ces mécanismes s'accompagnent de modifications physiologiques précoces telles que la vasoconstriction périphérique, la mise en place d'anastomoses artérioveineuses qui jouent un rôle important dans la réduction des pertes de chaleur périphériques par convection.

a. La thermogenèse de frisson

1. Définition

Elle apparaît comme la première réponse mise en place par l'organisme soumis à un stress thermique froid. Il s'agit d'un tétanos imparfait des muscles squelettiques, lié aux contractions asynchrones des muscles antagonistes, conduisant à une production de chaleur sans mouvement locomoteur (**IUPS Thermal Commission, 2001 ; Duchamp, 1990**).

Le frisson thermique répond donc à un stimulus « froid », détecté par les thermorécepteurs périphériques et centraux. Les motoneurones α transmettent l'information jusqu'aux effecteurs principaux : les muscles squelettiques [**Figure 1.5**]. Tous les types de muscles ne sont pas impliqués en même temps dans les mécanismes de frisson. Les fibres musculaires oxydatives lentes caractérisant des muscles à métabolisme aérobie (comme le *gastrocnemius* ou le *soleus*) résistantes à la fatigue sont recrutées. Les autres types de fibres (rapides oxydatives-glycolytiques, et rapides glycolytiques) seront recrutés par la suite, si l'activité de frisson persiste (**Aulie et Toien, 1988 ;** revue dans **Duchamp, 1990**).

A l'échelle cellulaire, la contraction musculaire, engendrée par une libération de calcium au niveau du réticulum sarcoplasmique, entraîne une consommation d'ATP (par les pompes SERCA (*Sarco/ endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase*) et des ponts actine-myosine composant les myofilaments). Cette consommation accrue d'ATP nécessite une augmentation de l'activité de l'ATP synthase dans les mitochondries. Ce mécanisme entraîne une augmentation du métabolisme (consommation d'oxygène mitochondriale) d'environ 4 à 5 fois lorsqu'il est stimulé de façon maximale, contrairement à un exercice locomoteur tel que le vol qui induit une augmentation de 20 fois, ce qui peut lui permettre de durer dans le temps. L'énergie produite par les mitochondries, normalement utilisée pour un travail mécanique, est principalement dissipée sous forme de chaleur (revue dans **Block, 1994 ; Marjoniemi, 2001**).

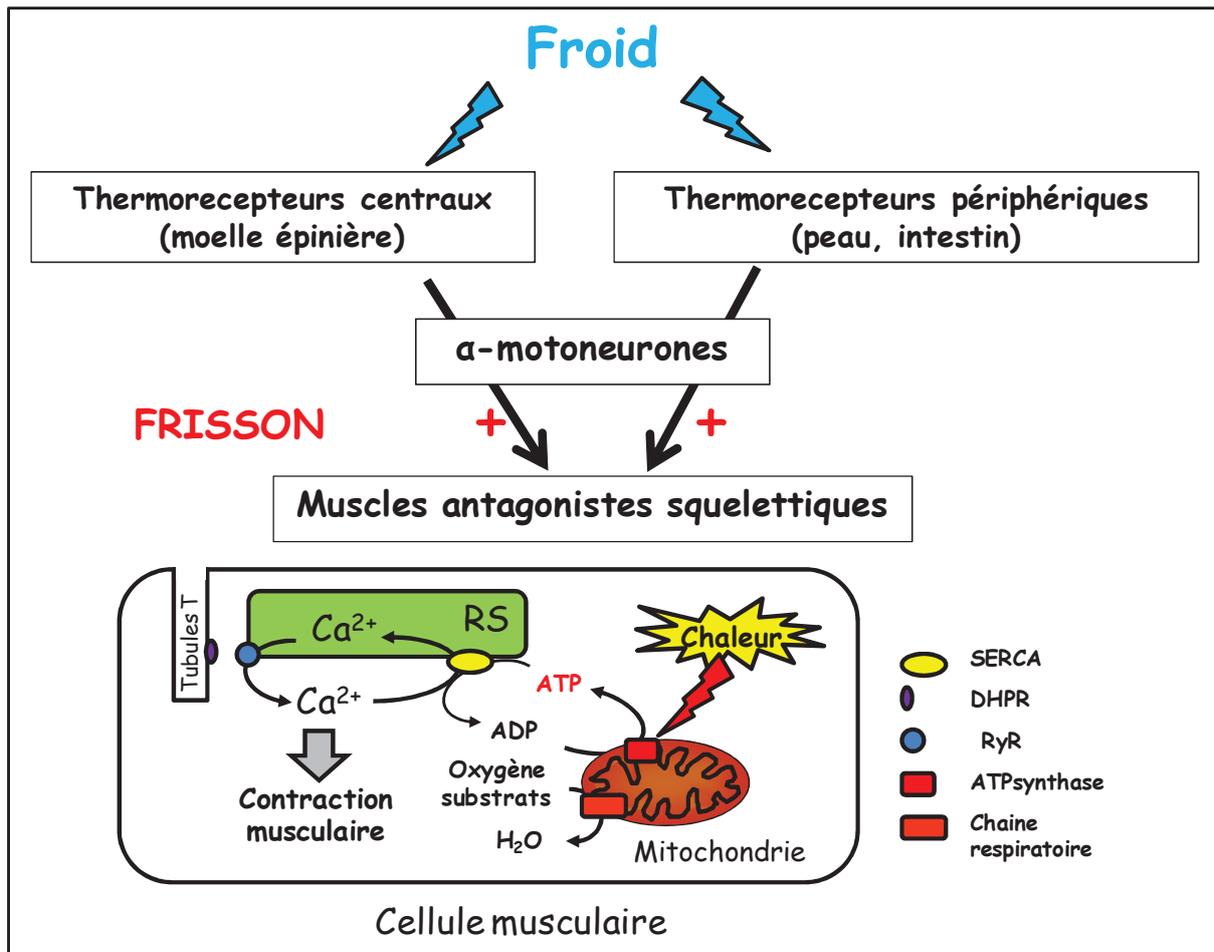


Figure 1.5 : Contrôle du Frisson thermique en réponse à un stress froid. Suite à un stimulus « Froid », les thermorecepteurs centraux (M.E) et périphériques (principalement ceux situés sur la peau) vont transmettre une information aux motoneurones alpha (les mêmes qui interviennent lors d'une contraction musculaire volontaire). Contrairement aux mammifères, l'hypothalamus chez les oiseaux, ne contient pas de thermosenseurs du type « froid ». A l'échelle cellulaire, la contraction musculaire active un cycle libération-repompage de Calcium contenu dans les citernes calciques du Réticulum Sarcoplasmique (RS), entraînant une synthèse accrue d'ATP au niveau mitochondrial. (D'après **Block, 1994 ; Montaron et al., 1995, Marjoniemi, 2001**)

2. Différents patterns de frisson

Il existe plusieurs sortes d'activité de frisson. Soit le frisson apparait par bouffées, soit il est continu [**Figure 1.6**]. Il semblerait d'ailleurs que ces deux patterns de frisson entraînent une consommation préférentielle de substrats différents. Lors de bouffées de frisson, l'organisme utiliserait plutôt des substrats d'origine glucidique, alors que de façon continue, il consommerait plutôt des lipides (revue dans **Hohtola, 2004**).

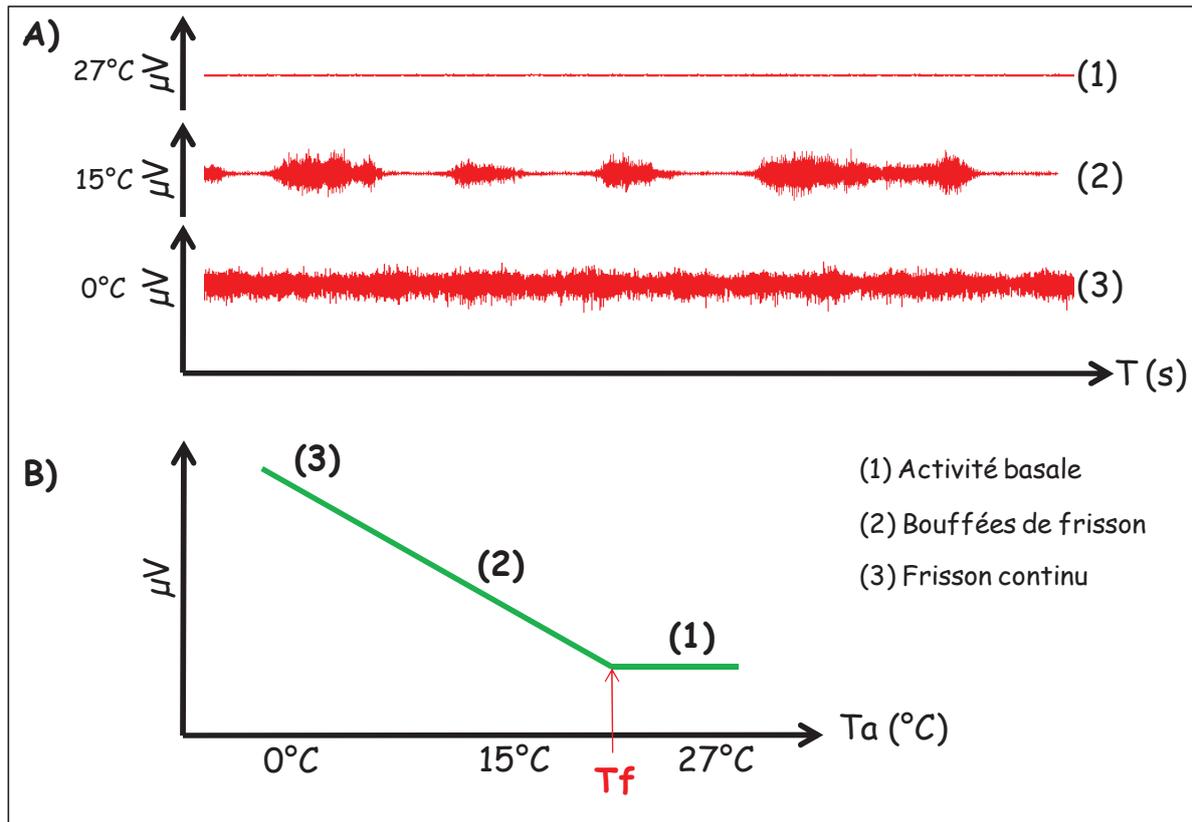


Figure 1.6 : Variation de l'activité du frisson en fonction de la température ambiante. En A), EMG brut enregistré chez un caneton de Barbarie à thermoneutralité (27°C), à 15°C et à 0°C. On remarquera la différence de patterns de frisson entre les deux basses températures. A thermoneutralité, l'activité électromyographique est basale, à une température intermédiaire, le caneton développe une activité de frisson par bouffées et à basse température, le frisson devient continu. En B), représentation schématique de l'évolution de l'intensité de frisson (en vert) en fonction de la température ambiante. (T_f : température d'apparition du frisson)

3. Le frisson thermique, durable dans le temps ?

De par sa définition même, il semble contraignant pour les fonctions locomotrices, ce qui peut être très préjudiciable dans certaines phases de vie en milieu naturel, notamment en cas de fuite face à un prédateur. Ce dernier point de vue est remis en cause par plusieurs études (revue dans **Hohtola, 2004**). Elles tendent à montrer que le frisson thermique serait le mécanisme le plus important, voir même le seul (**Marjoniemi, 2001**) à être impliqué dans la thermogénèse de régulation chez les oiseaux.

D'après **Hohtola (2004)**, les trois prérequis conditionnant un « bon » site de production de chaleur se retrouvent chez le muscle squelettique. En effet, le muscle squelettique représente une masse suffisamment conséquente pour défendre l'organisme

contre le froid, le contrôle nerveux du frisson suit la voie de la contraction volontaire, capable instantanément de répondre aux variations thermiques [Figure 1.5].

Pourtant le troisième point soulevé par **Hohtola**, qui est la capacité de rester actif sur le long terme, ne semble pas définir le frisson thermique comme un bon moyen adaptatif de thermogénèse.

Ainsi, de façon comparable à ce qui se passe chez le mammifère de petite taille (rongeurs et nouveau-nés), lors d'une exposition chronique (saisonniers ou expérimentale) au froid, un mécanisme adaptatif se substitue à la thermogénèse de frisson pour produire de la chaleur sans activité musculaire contractile. Il s'agit de la thermogénèse sans frisson ou NST (*Non Shivering Thermogenesis*) (revue dans **Duchamp et al., 1999**), dont l'existence est encore très controversée chez les oiseaux (**Marjoniemi, 2001 ; Hohtola, 2004**).

b. La thermogénèse sans frisson

Par définition, il s'agit donc d'une augmentation du métabolisme stimulée par une exposition chronique au froid sans activité électromyographique (EMG).

1. Petit rappel chez les mammifères

Chez les mammifères, la thermogénèse sans frisson est principalement due à la présence du tissu adipeux brun. Ce tissu spécifique thermogène (revue dans **Cannon et al., 2004**), présent chez les petits mammifères (rongeurs et hibernants) et nouveau-nés, constitue le site préférentiel de la NST [Figure 1.7]. Il est soumis à des régulations hormonales et nerveuses, notamment via la noradrénaline. La stimulation par le froid entraîne une hyperplasie du tissu adipeux brun et une fragmentation des gouttelettes lipidiques contenues dans les adipocytes bruns, qui deviennent de fait, multiloculés [Figure 1.8].

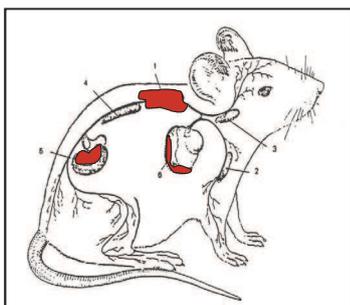


Figure 1.7 : Localisation des dépôts de tissu adipeux brun chez le rat (d'après Portet, 1983, dans Barré et al, 2001, Physiologie énergétique). Le tissu adipeux brun des mammifères est situé à des endroits précis du corps, sous forme de dépôts le long des artères et près des organes vitaux (zone interscapulaire, supra-cardiaque et péri-rénale). Cette disposition particulière lui confère une caractéristique importante : une riche vascularisation.

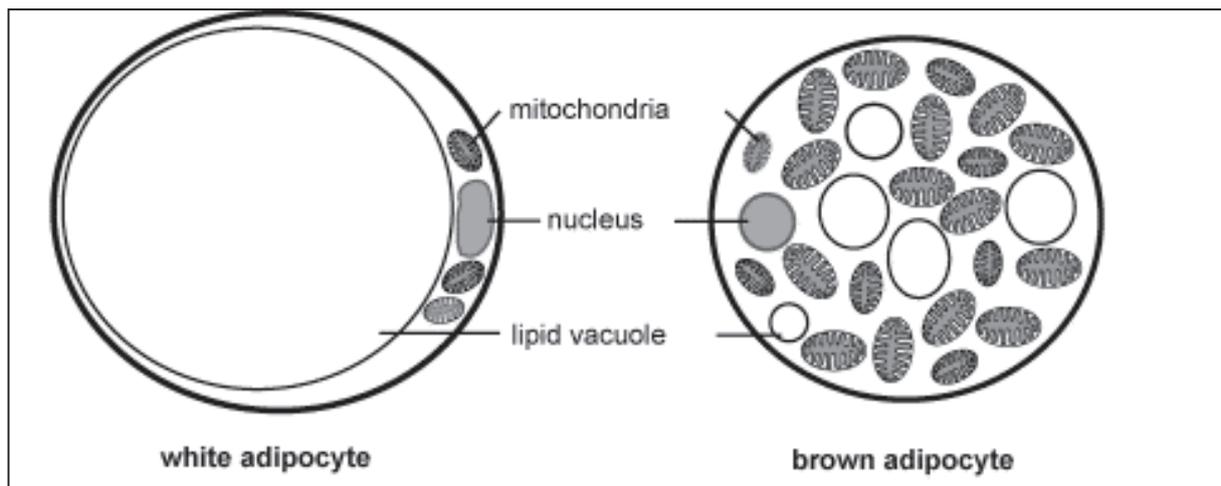


Figure 1.8 : Illustration des différences morphologiques entre les adipocytes du tissu adipeux blanc et les adipocytes du tissu adipeux brun. Ils sont morphologiquement différents des adipocytes blancs de par leur important contenu en mitochondries (d'où leur couleur brune) et en gouttelettes lipidiques (multiloculés). Ils réagissent lors d'une exposition chronique au froid ou lors d'une stimulation noradrénergique. Le tissu adipeux brun tient ses capacités thermogènes de sa très grande richesse en mitochondries et de la présence d'une protéine découplante spécifique de ce tissu, l'UCP1 (UnCoupling Protein 1) (revue dans **Cannon et Nedergaard, 2004**).

La deuxième particularité du BAT (*Brown Adipose Tissue*) est qu'il possède de nombreuses mitochondries, lui conférant ainsi sa coloration brune [Figure 1.8] et son pouvoir thermogène. En effet, ancrée dans la membrane interne des mitochondries du BAT, on retrouve une protéine découplante, l'UCP 1 (*Uncoupling Protein 1* d'abord appelée « thermogénine »). En découplant la chaîne respiratoire mitochondriale de la synthèse d'ATP (voir plus en détail dans le chapitre « Métabolisme mitochondrial »), elle entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène et l'énergie normalement dédiée à la synthèse d'ATP, est dissipée sous forme de chaleur (revue dans **Cannon et al., 2004**).

Son rôle est donc prépondérant chez les mammifères nouveaux-nés (relativement démunis contre le froid) et/ou de petite taille (rapport surface-volume peu favorable en condition environnementale froides). Le BAT participe à hauteur de 60% dans l'augmentation du métabolisme lors de la phase initiale de réveil des mammifères hibernants (revue dans **Jansky, 1973**). Et très récemment, grâce aux avancées technologiques (Tomographie par émission de positon...), du tissu adipeux brun a été trouvé chez un mammifère adulte : l'Homme (**Virtanen et al., 2009 ; Enerback, 2010**), dont la fonction première est toujours débattue.

2. Différence Mammifères-Oiseaux

Bien qu'une acclimatation au froid induise une différenciation de leur tissu adipeux blanc en tissu adipeux rose (PAT pour *Pink Adipose Tissue*) (**Barré et al., 1986a**) comportant quelques convergences morphologiques (adipocytes multiloculés, augmentation de la vascularisation) avec le BAT, il est reconnu que ce tissu adipeux rose ne possède pas les caractéristiques thermogènes (contenu en mitochondries, respirations mitochondriales et UCP 1) du BAT (**Barré et al., 1986-a ; Saarela et al., 1991 ; Bicudo et al., 2001**). Par conséquent, l'absence de tissu adipeux brun chez les oiseaux (**Johnston, 1971**) est un ancien postulat encore d'actualité.

Cette différence morphologique (**Mezentseva et al., 2008**) peut s'expliquer par une étude phylogénique des oiseaux et des mammifères (**Benton, 1990 ; Kumar et Hedges, 1998 ;** revue dans **Benton et Donoghue, 2007**). En effet, les oiseaux et les mammifères, appartiennent tous deux au « super groupe » des Tétrapodes. Les Tétrapodes se sont séparés en 2 groupes (il y a environ 340 millions d'années) : les Amphibiens et les Amniotes qui possèdent un sac amniotique, protégeant le fœtus soit dans une coquille soit dans l'utérus. Ces derniers divergeant il y a environ 310 millions d'années pour former le groupe des Synapsidés auquel appartiennent les mammifères et les Sauropsidés, groupe composé des Anapsidés (Lézards et Tortues) et des Diapsidés (groupe actuel des Oiseaux et des Crocodiliens) [**Figure 1.9**].

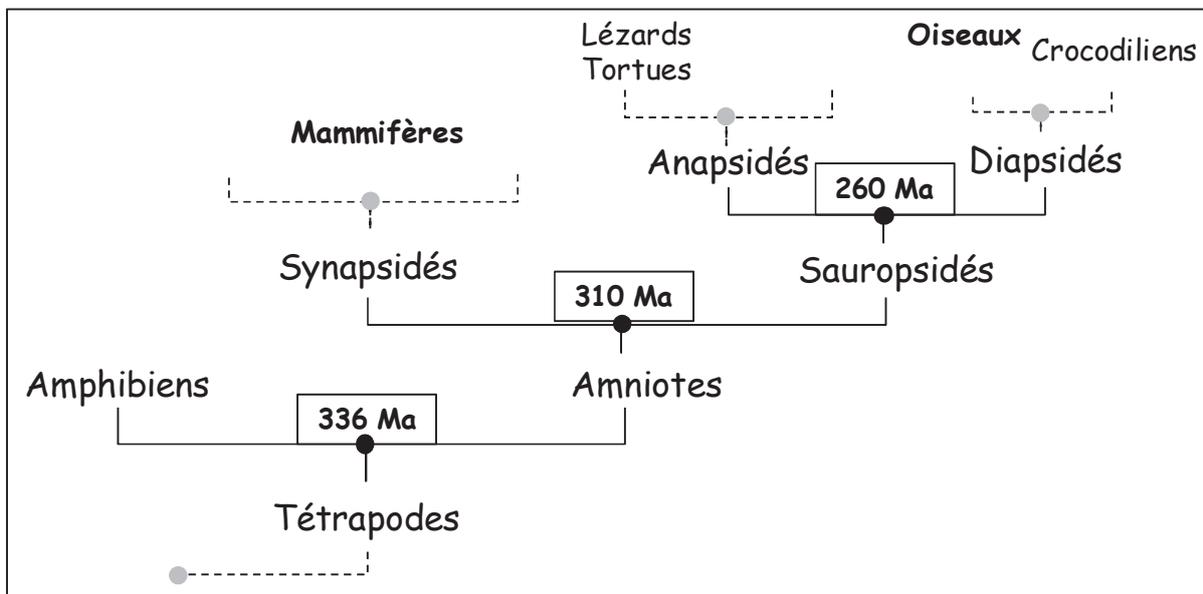


Figure 1.9 : Arbre phylogénique des principaux groupes de Tétrapodes. Les Oiseaux font partie des Diapsidés, phylogéniquement séparés depuis 320 Millions d'années du groupe comprenant entre autres les Mammifères, les Synapsidés. (D'après **Benton, 1990**, revue dans **Benton et Donoghue, 2007**)

De ce fait, la thermogenèse sans frisson développée par certaines espèces d'oiseaux, notamment le caneton de Barbarie (*Cairina moschata*) et le Manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*), doit avoir un effecteur autre que le BAT. Comme le soulignait **Hohtola (2004)**, le muscle squelettique est un bon candidat pour être le site privilégié d'un mécanisme thermogène. Comme décrit précédemment, c'est déjà le principal effecteur de la thermogenèse de frisson. Mais c'est aussi celui de la thermogenèse sans frisson chez l'oiseau (**Barré et al., 1985 ; Duchamp et al., 1991 ;** revue dans **Duchamp et al., 1999**). Chez le caneton de Barbarie, il peut contribuer à la thermogenèse sans frisson à hauteur de 70% environ (**Duchamp et al., 1993**).

3. Mise en évidence de la NST aviaire

De nombreuses études [**Tableau 1.1**] ont cherché à caractériser les mécanismes de thermorégulation chez les oiseaux et notamment chez des espèces soumises à des conditions thermiques froides de façon naturelle aussi bien en Arctique, telles que le lagopède (*Lagopus lagopus*), la mouette tridactyle (*Rissa Tridactyla*), le fulmar boréal (*Fulmar glacialis*), le guillemot à miroir (*Cepphus grylle*) ou le guillemot de Brunnich (*Uria lomvia*) (**Aulie et al., 1976 ; Gabrielsen et al., 1988**) que dans l'hémisphère sud, comme les Manchots empereur (*Aptenodytes fosteri*) et royal (*Aptenodytes patagonicus*), les pétrels des neiges (*Pagodroma nivea*), antarctique (*Thalassoica antarctica*) et le fulmar argenté (*Fulmarus glacialoides*) (**Le Maho, 1981 ; Barré, 1984 ; Weathers et al., 2000**). Mais la plupart de ces auteurs ne se sont intéressés qu'à la variation de métabolisme (consommation d'oxygène) de ces oiseaux sans mesurer l'autre paramètre indispensable pour caractériser une thermogenèse sans frisson : l'activité contractile des muscles squelettiques.

Espèces		Adaptation	Age	TCI (°C)	Tf (°C)	Références	
Nom commun	Classification						
Arctique	Mouette Tridactyle	<i>Rissa tridactyla</i>	naturelle	adulte	+ 4.5	??	Gabrielsen et al., 1988
	Fulmar Boréal	<i>Fumarus glacialis</i>	naturelle	adulte	+ 9.0	??	Gabrielsen et al., 1988
	Guillemot à Miroir	<i>Cephus grylle</i>	naturelle	adulte	+ 7.0		Gabrielsen et al., 1988
	Guillemot de Brunnich	<i>Uria lomvia</i>	naturelle	adulte	+ 2.0		Gabrielsen et al., 1988
	Tétra Lyre	<i>Lyrurus tetrrix</i>	naturelle	juvenile	+ 17	+ 6.3	Rintamäki et al., 1983
Domestique	Pigeon	<i>Columba livia</i>					Saarela and Vakkuri, 1982
	Poule	<i>Gallus domesticus</i>	6 semaines à 6°C	adulte			Arieli et al., 1979
	Faisan	<i>Phasianus colchicus</i>	conditions hivernales				Hissa, 1988
	Perdrix	<i>Perdix perdix</i>	conditions hivernales				Hissa, 1988
	Canard de Barbarie	<i>Cairina moschata</i>	3 semaines à 4°C	caneton	+ 22.3	+ 8.1	Barré et al., 1985
	Canard de Barbarie	<i>Cairina moschata</i>	5 semaines à 4°C	caneton	+23.7	+2.5	Barré et al., 1986
Antarctique	Manchot Empereur	<i>Aptenodytes fosteri</i>	naturelle	adulte	- 10	??	Le Maho, 1981
	Manchot Adélie	<i>Pygoscelis adeliae</i>	naturelle	adulte	- 10		Chappel et al., 1989
	Manchot Royal	<i>A. patagonicus</i>	naturelle (Eté/ Hiver)	poussin	+5/-10	0/-20	Barré, 1984
	Manchot Royal	<i>A. patagonicus</i>	désac* /naturelle	poussin	+ 5/-9	+ 5/-18	Duchamp et al., 1989
	Pétrel des Neiges	<i>Pagodroma nivea</i>	naturelle	adulte	+ 13.6		Weathers et al., 2000
	Pétrel Antarctique	<i>Thalassoica antarctica</i>	naturelle	adulte	+ 6.4	??	Weathers et al., 2000
	Fulmar Argenté	<i>Fulmarus glacialisoides</i>	naturelle	adulte	+ 5.6		Weathers et al., 2000

Tableau 1.1 : tableau récapitulatif des différentes études portant sur la thermorégulation des oiseaux. En vert, sont représentées les espèces vivant en Arctique, en blanc, les espèces vivant dans un climat tempéré et en bleu, les espèces antarctiques ou subantarctiques. Références non exhaustives. Il est important de noter que la Température d'apparition du Frisson (Tf, °C) a été caractérisée que pour quelques espèces seulement. * désac : désacclimatés

Les premières recherches alliant simultanément mesure du métabolisme et activité électromyographique chez l'oiseau ont débuté dans les années 60 (revue dans **Duchamp, 1990**) mais n'ont abouti qu'à des résultats négatifs chez des espèces sauvages adultes. Ensuite **El Halawani** et collaborateurs (**1971**) ont montré une augmentation du métabolisme sans augmentation du frisson chez des poulets acclimatés sur une longue période à de basses températures. Alors que des poulets du même âge, non acclimatés, frissonnaient quand on les plaçait à des températures ambiantes basses. D'autres études se succédèrent pour essayer de caractériser un peu mieux les mécanismes thermogènes aviaires. Ainsi, chez la poule (*Gallus domesticus*) élevée 6 à 8 semaines à 6°C, **Arieli et al., 1979** ont mesuré une augmentation de 30% de la consommation d'oxygène sans augmentation de l'activité de frisson. De même, chez le pigeon (*Columba livia*) acclimaté au froid (**Saarela et Vakkuri, 1982**) et le jeune tétra Lyre (*Lyrurus tetrrix*) élevé en conditions hivernales naturelles finlandaises (**Rintamäki et al., 1983**), les auteurs ont obtenu un décalage entre la TCI et la Tf d'environ 10°C, démontrant une capacité de NST d de 45% par rapport au métabolisme de repos. Enfin, chez le faisan (*Phasianus colchicus*) et la perdrix (*Perdix perdix*), les auteurs (**Hohtola et al., non publiées**) ont mesuré une augmentation du métabolisme en période hivernale sans activité contractile (revue dans **Hissa, 1988**). Mais ce sont des travaux menés au laboratoire, par **Barré (1984)** qui suggèrent pour la première fois la mise en place d'une

NST chez le Manchot royal en décelant le frisson thermique par palpation. Cette technique restait quelque peu critiquable quant à la détection de la mise en place du frisson. Depuis, le frisson thermique a été enregistré via des techniques moins « subjectives » sur les modèles du Manchot royal (Duchamp et al., 1989) et du caneton de Barbarie grâce à une acquisition électromyographique.

3. Ontogenèse de la thermogenèse de régulation

a. Nidicoles vs Nidifuges

Chez les oiseaux, il existe une différence importante au niveau développemental. En effet, les oiseaux ont été classés en deux grandes catégories : les oiseaux nidicoles et les oiseaux nidifuges. Ces deux groupes diffèrent principalement par leur degré de maturité à la naissance [Figure 1.10]. Ce degré peut être lié à la durée de la période d'incubation, généralement plus courte chez les oiseaux nidicoles. En conséquence, lors de l'éclosion, les oisillons nidicoles (« *altricial* » en anglais) sont nus, dépourvus de duvet, avec les yeux fermés. Ils sont ensuite couvés pendant une période plus ou moins longue et ne sont pas émancipés thermiquement. Ils sont donc très dépendants des soins prodigués par leurs parents. Les oisillons nidifuges (« *precocial* » en anglais), naissent quant à eux couverts de duvet et relativement alertes, leur permettant de quitter le nid précocement pour suivre leurs parents, notamment en quête de nourriture. Ils ne sont pas couvés et doivent donc être capable de réguler leur température interne rapidement. De fait, l'induction des mécanismes de régulation thermique diffère entre les deux groupes.



Figure 1.10 : Différence entre oiseaux nidicoles et nidifuges. En A), oisillons nidicoles (espèce indéterminée). En B), poussin de manchot royal, « demi-nidicole » et en C), caneton de Barbarie, totalement nidifuge.

b. Ontogenèse chez les oiseaux nidicoles

Lors de l'éclosion, les oisillons nidicoles sont en général de petite taille et dépourvus de duvet. Il faut souligner que la lutte contre le froid se décompose classiquement en trois processus différents : une origine comportementale, une amélioration de l'isolation et enfin les mécanismes métaboliques et vasculaires de thermorégulation. Les oisillons nidicoles ne doivent leur survie qu'au comportement de couvaion des parents (*Parental Care*).

Il est admis que contrairement aux mammifères nouveau-nés pourvus de tissu adipeux brun à la naissance, les oiseaux nidicoles ne sont pas capables de développer une thermogenèse de régulation efficace au début de leur vie. Ils acquièrent une réelle capacité de thermorégulation à la fin de la période de couvaion (**Pearson, 1998 ; Tortosa et Castro, 2003**). Plusieurs points peuvent être apportés pour expliquer cette absence de thermogenèse de régulation. La première hypothèse est que les oisillons nidicoles ont une maturité musculaire insuffisante pour soutenir une activité de frisson (revue dans **Olson 1994**). Effectivement, **Hohtola et Visser (1998)** ont montré dans leur revue bibliographique que la plupart des oiseaux nidicoles commençaient à frissonner à partir de 4 jours après éclosion contrairement aux oiseaux nidifuges qui semblent capable de frissonner dès leur naissance. La seconde hypothèse soutient le fait que les oisillons nidicoles, grâce aux soins parentaux (isolation et apport de nourriture), allouent une part importante de leur budget énergétique à la croissance et non aux mécanismes de thermorégulation (**Dawson et Evans, 1960**, cité dans **Tortosa et Castro, 2003 ; Dunn, 1980**).

c. Ontogenèse chez les oiseaux nidifuges

Contrairement aux oiseaux nidicoles, les oiseaux nidifuges sont capables de thermoréguler de façon très précoce. Ils sont en général plus gros à la naissance, entraînant un rapport surface/volume plus favorable pour éviter les déperditions de chaleur. Ils ont une croissance moins rapide que celle des nidicoles, ce qui leur permet d'allouer plus d'énergie pour la thermogenèse de régulation. **Nichelmann et Tzschentke (2002)** ont démontré l'existence de trois phases dans le développement de l'homéothermie chez ces oiseaux : la première période est celle avant éclosion, la deuxième se situe juste après éclosion (entre 0 et 10 jours) et enfin la dernière est celle que les auteurs ont nommé homéothermie complète (à partir de 10 jours).

- Avant éclosion (*Prenatal phase*)

Durant cette période, tous les mécanismes de thermorégulation se mettent en place et sont fonctionnels mais leur efficacité reste très limitée.

- Juste après éclosion (*Early postnatal phase*)

Dès l'éclosion, les oiseaux nidifuges sont capables d'augmenter leur production de chaleur. D'après **Nichelmann et Tzschentke (2002)**, dès le premier jour, les canetons de Barbarie (*Cairina moschata*) et les poussins (*Gallus gallus*) arrivent à garder leur température interne constante aux alentours de 40°C en augmentant leur production de chaleur. Les auteurs expliquent les différences d'efficacité thermogène entre Anatidés et Gallinacés via la capacité de NST développée par les canetons de Barbarie. Pour les poussins, la production de chaleur provient de l'activité musculaire due au frisson, mécanisme précocement fonctionnel chez les nidifuges (revue dans **Hohtola and Visser, 1998**).

- Homéothermie complète (*Phase of full-blown homeothermy*)

A partir de 10 jours après éclosion, les auteurs considèrent que les oiseaux arrivent à réguler leur température interne à un niveau élevé et constant dans la zone de température ambiante définie précédemment comme la zone d'homéothermie. Il faut souligner que les mécanismes de thermogenèse mais aussi de thermolyse (vasodilatation périphérique, pertes de chaleur par évaporation...) sont désormais très efficaces.

III. Métabolisme mitochondrial

1. Mitochondries et théorie chimio-osmotique de Mitchell (1961)

Les mitochondries sont des organites constitués de 2 membranes, externe et interne, siège de la respiration cellulaire. Elles possèdent en effet dans leur membrane interne un ensemble de quatre complexes protéiques (I, II, III et IV) formant la chaîne respiratoire [Figure 1.11].

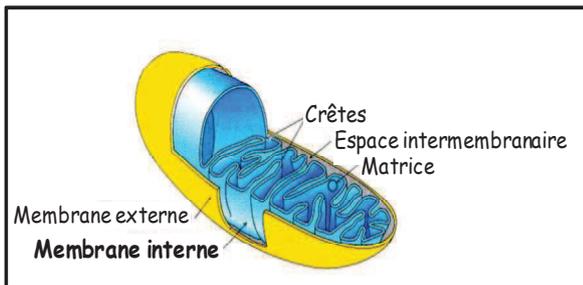


Figure 1.11 : Schéma d'une mitochondrie. Ces petits organites possèdent leur propre matériel génétique sous la forme d'un ADN circulaire dépourvu d'histone, transmis de façon maternelle par le cytoplasme de l'ovocyte au moment de la fécondation. Cet ADN code notamment les sous-unités des différents complexes de la chaîne respiratoire.

Sa fonction est d'oxyder des équivalents réduits (NADH et FADH₂) provenant de différentes voies métaboliques (glycolyse et β-oxydation via le cycle de Krebs). L'oxydation de ces équivalents réduits s'accompagne d'une expulsion de protons par les complexes I, III et IV et d'un transfert d'électrons jusqu'à un accepteur final : l'O₂ réduit en eau au niveau du complexe IV (cytochrome-c oxydase) [Figure 1.12].

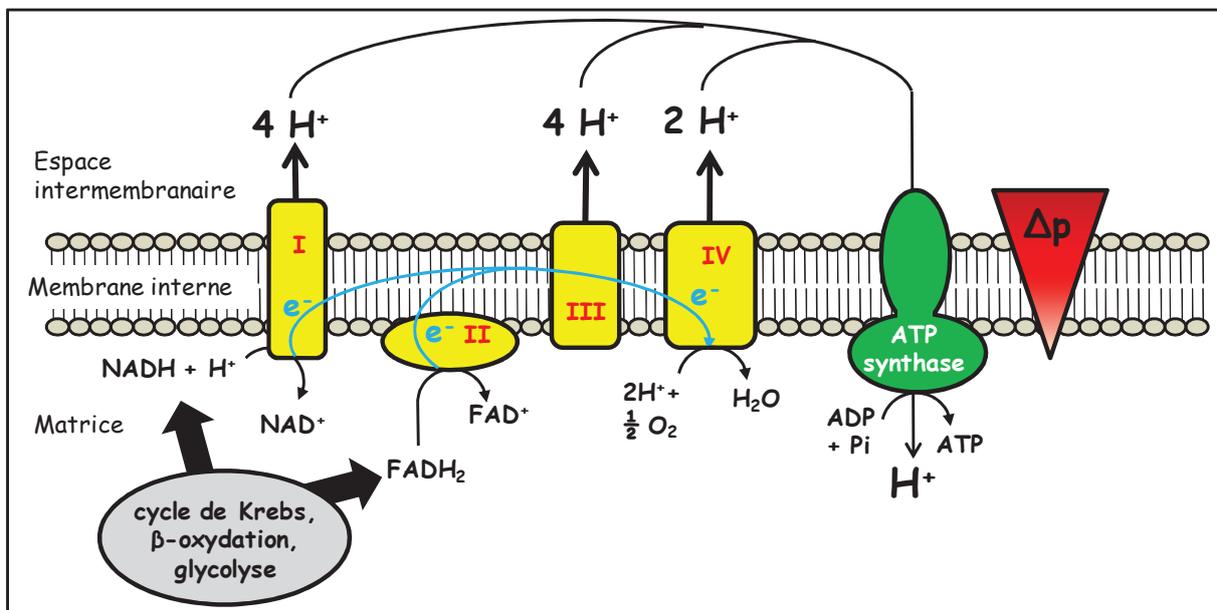


Figure 1.12 : schéma représentant la chaîne respiratoire mitochondriale. Illustration de la théorie chimio-osmotique de Mitchell. La chaîne respiratoire comporte quatre complexes enzymatiques et une ATP synthase. Le fonctionnement est détaillé dans le texte. ΔP : gradient électrochimique ; e⁻ : électron

L'imperméabilité relative de la membrane aux ions H^+ induit une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire. Une ATP-synthase (permettant le retour des protons dans la matrice) peut utiliser l'énergie potentielle de ce gradient électrochimique (ΔP) pour synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Ce phénomène de couplage entre la chaîne respiratoire et l'ATP synthase est appelé oxydation phosphorylante ou phosphorylation oxydative [Figure 1.13].

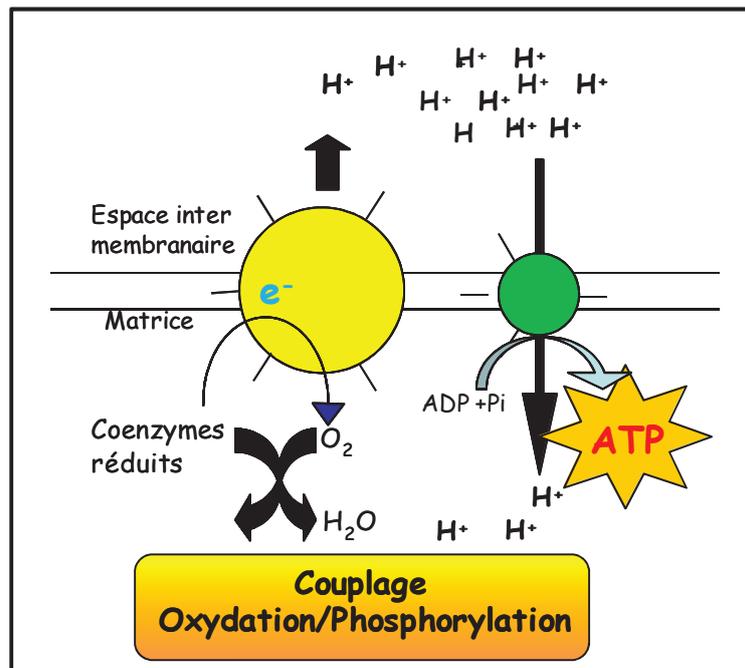


Figure 1.13 : Illustration schématique du phénomène de couplage de l'oxydation phosphorylante. La chaîne respiratoire (●) consomme de l'oxygène pour permettre à l'ATP synthase (●) de produire de l'ATP à partir de l'ADP et de phosphate inorganique. Le principe de base de la théorie chimio-osmotique est que l'oxydation des substrats entraîne une production d'énergie sous forme de gradient électrochimique, convertie par la suite en ATP. Ce gradient électrochimique ne peut exister que grâce à l'imperméabilité de la membrane interne de la mitochondrie aux protons. Cependant, il est clairement établi que la membrane interne mitochondriale n'est pas parfaitement imperméable, d'où un couplage naturellement imparfait des mitochondries.

2. La mitochondrie : au cœur des phénomènes de thermogénèse

Au niveau tissulaire et cellulaire, il existe deux moyens fondamentaux pour augmenter la production de chaleur : 1) augmenter la consommation d'ATP et/ou 2) diminuer le rendement de la transformation d'énergie dans la mitochondrie (Hochachka, 1974, cité dans Edelman, 1976) [Figure 1.14].

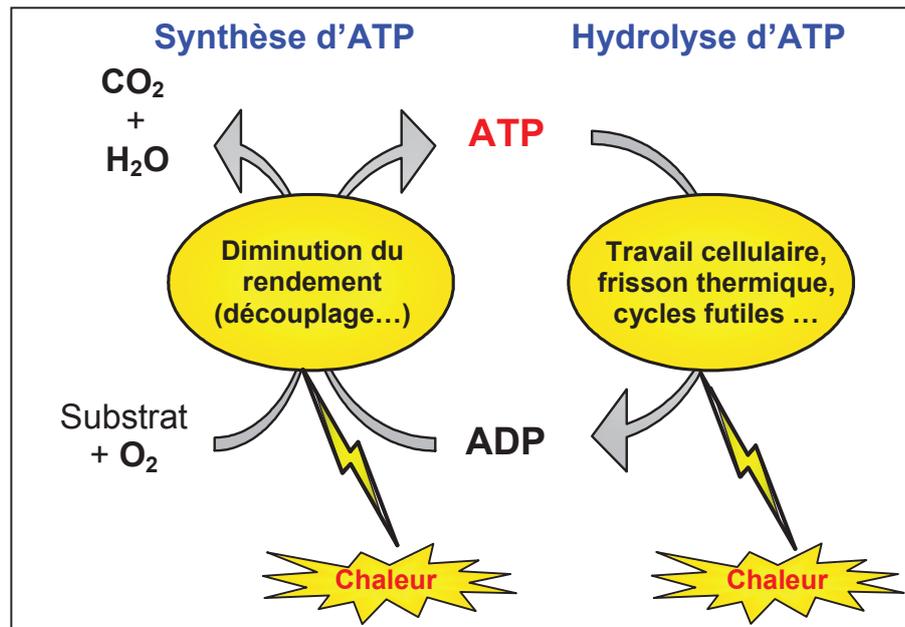


Figure 1.14 : Siège de la thermogenèse de régulation dans les cellules animales. La production de chaleur issue de l'activité cellulaire est basée sur deux grands mécanismes antagonistes 1) l'un utilisant des processus cellulaires consommateurs d'ATP stimulant l'activité mitochondriale, 2) l'autre opérant lors de la resynthèse de l'ATP en diminuant le rendement de phosphorylation au profit de pertes caloriques (Adapté de Rey B., *DEA Physiologie Intégrée en Condition Extrême*, 2004)

Le premier mécanisme revient à augmenter le métabolisme mitochondrial par un travail cellulaire plus important (cycles futiles, contractions musculaires dues au frisson). Par exemple, **Dumonteil et al. (1993)** a étudié plus particulièrement un cycle futile de libération-repompage du calcium au niveau du réticulum sarcoplasmique (RS), stimulé par les acides gras libérés par le glucagon. En effet, les esters d'acides gras induiraient la libération de calcium stocké dans le RS via une stimulation du récepteur à la Ryanodine. La libération accrue de Ca^{2+} entraînerait un repompage actif du calcium par les pompes Ca^{2+} -ATPasiques. Il a été montré une augmentation du nombre de récepteurs à la Ryanodine et de pompes Ca^{2+} -ATPasiques en réponse à une acclimatation au froid dans le muscle squelettique de caneton de Barbarie (**Duchamp et al, 1999**). Ce mécanisme cellulaire, en tant que consommateur d'ATP augmente le métabolisme mitochondrial et la production de chaleur.

Quant au deuxième mécanisme, il s'agit d'un découplage des oxydations phosphorylantes mitochondriales suggéré chez des oiseaux acclimatés au froid (**Skulachev et Maslov, 1960 ; Barré et al., 1986b ; Duchamp et al., 1992**), dont les rouages n'ont pas encore été totalement élucidés (revue dans **Duchamp et al., 1999**). Il pourrait être dû à la mobilisation accrue des acides gras (**Barré et al., 1986b**) et/ou à la présence d'une protéine découplante (**Raimbault et al., 2001**) faisant partie de la grande famille des transporteurs mitochondriaux.

Ces deux mécanismes reposent sur une modulation du couplage entre l'activité de la chaîne respiratoire et de l'ATPsynthase, c'est-à-dire une régulation de l'oxydation phosphorylante.

Le rendement de l'oxydation phosphorylante devient donc une notion centrale quelque soit le mécanisme thermogène utilisé. Une estimation de ce rendement peut être approchée par la mesure de la quantité d'ATP synthétisée par la mitochondrie pour chaque atome d'oxygène qu'elle consomme : c'est le rapport ATP/O.

3. Modulation de l'efficacité mitochondriale

L'efficacité mitochondriale est principalement définie par le « rendement énergétique », qui caractérise le rapport entre efficacité réelle et efficacité maximale théorique d'un système.

L'efficacité maximale d'une mitochondrie serait atteinte lorsque la perméabilité membranaire est réduite à néant, c'est-à-dire que la mitochondrie est parfaitement couplée. Le rendement énergétique peut être modulé par une augmentation ou une diminution des fuites protoniques, signifiant un découplage plus ou moins important de la phosphorylation oxydative. Plusieurs facteurs peuvent moduler cette efficacité mitochondriale [Figure 1.15].

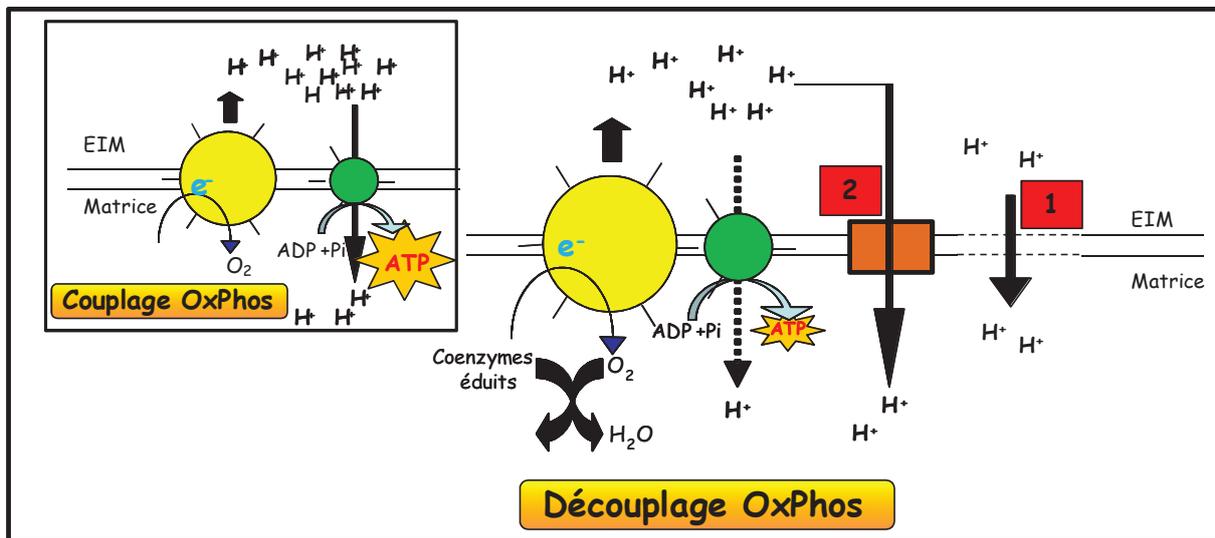


Figure 1.15 : représentation schématique du découplage mitochondrial. Dans la situation 1, la membrane interne est perméable aux protons. Dans la situation 2, les protons passent à travers la membrane interne via un transporteur (ANT) ou une protéine découplante (UCP).

EIM : Espace intermembranaire ; OxPhos : Oxydations Phosphorylantes ; Pi : phosphate inorganique

a. La composition membranaire

Les membranes mitochondriales sont constituées d'une bicouche de phospholipides dans laquelle sont enchâssées des protéines (modèle de la « mosaïque fluide », **Singer et Nicholson, 1972**). Il est désormais bien connu que suivant la nature de la tête hydrophile et/ou de la chaîne carbonée des acides gras, constituant les phospholipides membranaires, la conductance passive aux protons peut varier (**Porter et al., 1996**, revue dans **Rey, 2008**). En étudiant la conductance protonique des mitochondries hépatiques de différentes espèces d'oiseaux, **Brand et collaborateurs** ont notamment montré en **2003**, une corrélation positive entre l'intensité des fuites de protons et la quantité d'un certain type d'acides gras (acides gras n-3 polyinsaturés) et inversement une corrélation négative avec les acides gras monoinsaturés (**Brand et al., 2003**).

La relation précédemment décrite entre composition membranaire et fuite de protons pourrait être due à des variations de la fluidité membranaire. Plusieurs paramètres sont connus pour influencer sur la fluidité des membranes, tel que le degré d'insaturation (**Porter et al., 1996 ; Brookes et al., 1998**), la conformation (cis- ou trans-) des chaînes carbonées au niveau des doubles liaisons et la nature des têtes polaires. Ces différents paramètres peuvent varier en fonction de la température (revue dans **Hazel, 1995**).

Cependant dans les mitochondries musculaires de canetons de Barbarie acclimatés au froid, l'augmentation des acides gras membranaires insaturés à longue chaîne ne modifie que très partiellement la conductance protonique (**Chainier et al., 2000**).

b. La nature des substrats utilisés

Un autre paramètre peut entraîner une modification de l'efficacité mitochondriale. C'est la nature biochimique des substrats oxydés par la chaîne respiratoire. En effet, la chaîne respiratoire est constituée de plusieurs complexes (voir **Figure 1.12**) qui vont permettre l'oxydation soit de substrats glucidiques, soit de substrats lipidiques.

Il faut rappeler que les glucides et les lipides ne suivent pas les mêmes voies métaboliques : la glycolyse pour les glucides et la β -oxydation pour les lipides. Ces deux voies n'impliquent pas tout à fait les mêmes cofacteurs dans les réactions d'oxydoréduction : principalement le NADH pour les réactions à partir des glucides et le NADH et le FADH₂ lors de la β -oxydation des lipides [**Figure 1.16**]. Les cofacteurs NADH et FADH₂ ne vont pas entrer dans la chaîne respiratoire par les mêmes complexes [**Tableau 1.2**]. Le NADH va entrer au niveau du complexe I et le FADH₂ au niveau du complexe II. Ce qui va entraîner une différence dans la quantité de protons expulsés dans l'espace intermembranaire (10 H⁺ pour le NADH et seulement 6 H⁺ pour le FADH₂). Le rapport entre ATP produit et oxygène

consommé est alors plus faible lorsque le complexe I n'est pas sollicité. On peut donc dire que l'efficacité mitochondriale dépend du ratio NADH/FADH₂ présent dans l'environnement de la mitochondrie : plus il est élevé, plus l'efficacité mitochondriale sera importante.

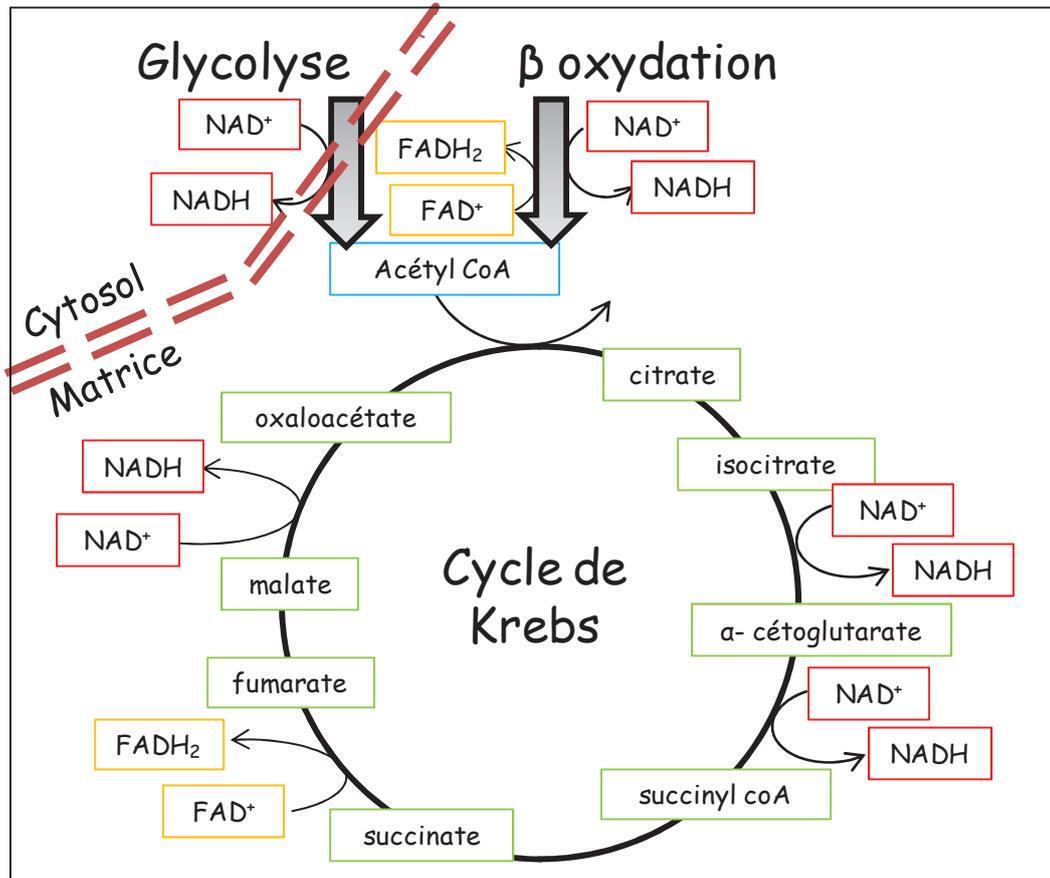


Figure 1.16 : Représentation simplifiée du cycle de Krebs. Cette figure permet de visualiser les différentes étapes permettant de produire les cofacteurs utilisés par la chaîne respiratoire et l'ATP synthase au niveau de la mitochondrie. La β oxydation et le cycle de Krebs s'effectuent dans la matrice mitochondriale alors que la glycolyse est un ensemble de réactions enzymatiques cytosoliques. Le produit final de la glycolyse qui donne de l'acetyl-coA est le pyruvate. In vitro, le succinate servira comme substrat au complexe II.

Cofacteurs	Entrée au niveau du complexe	Complexes expulsant des H ⁺	N protons	N ATP formés
NADH	I	I, III et IV	10	3
FADH ₂	II	III et IV	6	2

Tableau 1.2 : Influence de la nature des substrats métabolisés au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. La nature des cofacteurs oxydés diffère selon l'origine des substrats métabolisés (Glucides ou Lipides). En effet, lors de la glycolyse, seul du NADH est produit alors que lors de la β-oxydation, les deux cofacteurs sont produits (cf. figure 1.16).

c. La présence de transporteurs protéiques de métabolites ou d'ions.

Plusieurs métabolites et coenzymes nécessaires au bon fonctionnement mitochondrial ont une masse moléculaire trop importante pour franchir la membrane interne par simple diffusion. Ils nécessitent donc l'utilisation de transporteurs protéiques, enchâssés dans la membrane interne, couplant par exemple le transport d'un métabolite à l'entrée d'un proton. Ces transporteurs utilisent ainsi une partie du gradient de protons.

C'est notamment le cas de deux familles de transporteurs protéiques :

- Le transporteur antiport ANT (*Adenine Nucleotide Translocase*), responsable des échanges ADP cytosolique/ATP matricielle (**Andreyev et al., 1989**). Ces échanges s'accompagnent d'un flux de protons vers la matrice, entraînant une variation du ΔP . De ce fait, l'ANT joue un rôle important dans le contrôle de la respiration mitochondriale (**Roussel et al., 1998 ; Talbot et al., 2004 ; Toyomizu et al., 2002**). De plus ce transporteur interviendrait dans la modulation de la conductivité basale membranaire aux protons (**Brand et al., 2005**).
- Les protéines découplantes (UCP), auxquelles nous consacrerons le chapitre suivant.

En résumé

Souvent comparée à une centrale énergétique ou un moteur de voiture, la mitochondrie est un petit organite indispensable à la vie car c'est principalement elle qui fournit l'ATP, source énergétique de la plupart des réactions biochimiques exergoniques en le synthétisant à partir de l'oxydation de substrats... D'où un intérêt tout particulier pour cet organite dans l'explication des mécanismes thermogènes. En effet, qu'elle soit parfaitement couplée et donc qu'elle produise le maximum d'ATP pour alimenter les réactions biochimiques exergoniques (rapport P/O élevé), ou qu'elle soit découplée et qu'elle dissipe l'énergie en excès sous forme de chaleur (rapport P/O bas), la mitochondrie est source de production de chaleur. Plusieurs paramètres participent à son découplage plus ou moins partiel, notamment la présence ou non de protéines découplantes (UCPs) activées.

IV. L'UCP aviaire : son implication dans la thermogenèse de régulation ?

1. Les UCPs : généralités

a. La famille des UCPs

Comme évoqué dans le chapitre précédent, il existe des protéines transmembranaires d'environ 30kDa, spécialisées dans la modulation de la force proton motrice en favorisant le retour des protons depuis l'espace intermembranaire vers la matrice. Elles sont nommées UCP pour *UnCoupling Protein*.

Elles sont généralement activées par la présence d'acides gras et/ou de radicaux libres, notamment l'ion superoxyde O_2^- (Echtay et al., 2002 ; Talbot et al., 2003) et inhibées par des nucléotides di- et tri-phosphate comme le GDP, le GTP, l'ADP et l'ATP (Echtay, 2007).

b. UCP1

La première protéine découplante découverte il y a une quarantaine d'année (Ricquier et Kader, 1976 ; Heaton et al., 1978, revue dans Klingenspor et al., 2008), fut appelée thermogénine et caractérisée dans le tissu adipeux brun (BAT) des mammifères de petite taille ou nouveau-nés, lui conférant ses capacités thermogènes. En effet, son activité engendre un effondrement du gradient de protons, obligeant la chaîne respiratoire à fonctionner beaucoup plus rapidement pour essayer de rétablir le ΔP . L'énergie supplémentaire utilisée pour maintenir le gradient de protons est donc dissipée sous forme de chaleur (revue dans Cannon et Nedergaard, 2004). C'est donc par son activité découplante que l'UCP1 permet une production accrue de chaleur, utilisée lors d'une acclimatation au froid ou lors de la phase du réveil post-hibernation.

20 ans après, la thermogénine fut rebaptisée UCP1 car d'autres protéines homologues furent découvertes.

c. UCP2 et UCP3

UCP2 fut le premier homologue (59% avec UCP1) caractérisé (revue dans Krauss et al., 2005). Son ARNm est exprimé dans de nombreux tissus (tissu adipeux blanc, BAT, muscle, foie, cœur, rate, poumon, rein) (Fleury et al., 1997). Cependant au niveau protéique, Pecqueur et ses collaborateurs (2001) ont démontré une régulation transcriptionnelle de l'UCP2, absente dans le cœur, le muscle et le BAT de souris.

UCP3, décrite peu de temps après UCP2 (**Boss et al, 1997**), est quant à elle homologue à 57% avec UCP1 et à 73% avec UCP2 et exprimée principalement dans les muscles squelettique et cardiaque (**Vidal-Puig et al., 1997**).

Contrairement à UCP1, dont le rôle thermogène n'est plus remis en question (**Golozoubova et al., 2001**, revue dans **Nedergaard et al., 2001**), le rôle physiologique des protéines homologues UCP2 et UCP3 est toujours sujet à de nombreux débats.

d. Les autres UCPs

Ces dernières années, les études sur le domaine des UCPs se sont multipliées, rendant la littérature sur le sujet abondamment fournie. De nouvelles protéines homologues ont été découvertes, et ce, dans la plupart des clades du monde animal, tels les invertébrés (**Sokolova et Sokolov, 2005**), les poissons (**Jastroch et al, 2005**), les reptiles (**Schwartz et al., 2007 ; Rey et al., 2008b**) et du monde végétal (revue dans **Hourton-Cabassa et al., 2004**) et même chez les champignons (**Jarmuszkiewicz et al., 2000**). Ces protéines découplantes étant présentes chez des organismes ne nécessitant pas de mécanismes de régulation thermique démontrent que le rôle principal de cette famille de transporteurs protoniques n'est pas thermogène.

Outre les différentes UCPs précédemment citées, chez les endothermes, d'autres UCPs ont été décrites telles qu'UCP4 et UCP5 (ou BMCP1) exprimées dans le cerveau (**Mao et al.,1999 ; Sanchis et al., 1998**), HDMCP et KMCP1 exprimées respectivement au niveau hépatique et rénal chez les mammifères (revue dans **Damon et Collin, 2006**) et celle qui nous intéresse particulièrement, l'UCP aviaire (*avUCP* pour *avian UCP*, **Raimbault et al., 2001**).

2. L'UCP aviaire

a. Généralités

Contrairement aux mammifères, les oiseaux ne possèdent à ce jour qu'une isoforme d'UCP, l'UCP aviaire (**Emre et al., 2007**). Elle a été découverte au début des années 2000, tout d'abord chez le poulet (*Gallus gallus*) et le canard de Barbarie (*Cairina moschata*) (**Raimbault et al., 2001**) puis chez le colibri (*Eupetomena macroura*) (**Vianna et al., 2001**) et chez le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) (**Talbot et al., 2003**) et enfin très récemment chez le canari (*Serinus canaries*) (**Slocinska et al., 2010**).

Sa séquence est d'environ 300 acides aminés (304 a.a. chez le colibri et 307 a.a. chez le poulet). Son ARN est principalement exprimé dans le muscle squelettique

(**Raimbault et al., 2001**). Cependant une étude suggère qu'UCP aviaire est également exprimée en plus petite proportion dans le cerveau, la rate, le cœur, le foie et le poumon de poulet (**Evoek-Clover et al., 2002**). Cette distribution plus ou moins ubiquitaire ainsi que son homologie de séquence plus forte pour UCP2 et UCP3 (70%) que pour UCP1 (55%) entraîne un débat animé depuis plusieurs années sur le rôle potentiel de cette UCP aviaire.

b. Régulation de l'UCP aviaire

- Par les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes (T4 et T3) et principalement la T3 sont considérées comme étant les régulateurs les plus importants du métabolisme énergétique et de la fonction mitochondriale (revue dans **Collin et al., 2005**). De nombreuses revues et articles ont souligné l'implication des hormones thyroïdiennes dans les mécanismes de thermogénèse (revue dans **Silva, 2006**).

Tout comme UCP 1, 2 et 3 (revue dans **Lanni et al., 2003**), il semblerait logique que l'UCP aviaire soit soumise à une régulation par les hormones thyroïdiennes. De fait, peu de temps après la découverte de l'UCP aviaire, **Collin et collaborateurs** ont montré une augmentation très nette de la concentration en T3 (forme active des hormones thyroïdiennes) chez des poulets exposés à 14 jours de froid (**Collin et al., 2003**). Cette découverte est intéressante car elle met directement en relation l'augmentation de la concentration en T3 avec la surexpression du transcrit de l'UCP aviaire. De plus, une étude récemment publiée montre également une corrélation importante entre statut thyroïdien et expression de l'ARN messenger de l'UCP aviaire. Des canetons ayant un statut hypothyroïdien expriment moins l'UCP aviaire que des canetons euthyroïdiens et encore moins que des canetons hyperthyroïdiens (**Rey et al., 2010a**).

- Par le glucagon

Le glucagon, hormone clé du métabolisme lipidique, est connu pour jouer un rôle important dans la thermogénèse chez les oiseaux (**Barré et Rouanet, 1983 ; Barré et al., 1987 ;** revue dans **Duchamp et al, 1999**). Un traitement chronique au glucagon induit effectivement une thermogénèse sans frisson (**Barré et al., 1987**) et un mécanisme de découplage mitochondrial chez des canetons de Barbarie (**Barré et al., 1989**). Cette hormone semble jouer un rôle très intéressant dans le « *switch* » entre thermogénèse de frisson et NST. En effet, des injections intracérébrales de glucagon inhibent la réponse thermogène via l'activité de frisson (**Montaron et al., 1995**). Cette inhibition proviendrait de l'interaction existante entre le glucagon et le système β -adrénergique, acteur principal du contrôle des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) et du frisson thermique. En effet,

une injection de glucagon chez des canetons de Barbarie entraîne une augmentation presque immédiate de la sécrétion d'adrénaline et de noradrénaline (**Filali-Zegzouti et al., 2000**).

Aux vues de ces observations, **Raimbault et collaborateurs** ont cherché à mettre en évidence une corrélation entre NST, glucagon et UCP aviaire. Ils ont montré que l'expression des transcrits codant pour l'UCP aviaire augmentait très fortement chez des canetons de Barbarie traités chroniquement au glucagon (**Raimbault et al., 2001**).

- Par le système β -adrénergique

Il est depuis longtemps prouvé que le système adrénérique ainsi que les catécholamines sont impliqués dans la régulation des mécanismes thermogènes chez les mammifères (revue dans **Silva, 2006**) et notamment dans le contrôle de l'activité d'UCP1 (revue dans **Cannon et al., 2004**). Chez les oiseaux, une seule récente étude montre une implication du système β -adrénérique dans la régulation de l'expression relative de l'UCP aviaire (**Joubert et al., 2010**). Les auteurs ont montré un effet positif de l'isoprotérénol (agoniste β_2) sur la protéine UCP aviaire 24h après injection, qui n'était pas observable 4 heures après injection. Les transcrits, quant à eux sont augmentés de façon importante 4 heures après injection par rapport à 30 min ou 24 h après injection. De plus, une augmentation des facteurs de transcription impliqués notamment dans le métabolisme lipidique - PPARs α et β/δ , et de leur coactivateur PGC1- α , intervenant quant à lui, dans les mécanismes de différenciation musculaire, du métabolisme glucidique et de biogenèse mitochondriale (**Ueda et al., 2005, Liang et al., 2006**), semble précéder l'augmentation de l'expression relative de l'UCP aviaire.

c. Rôles potentiels de l'UCP aviaire

D'après une étude sur le génome de poulet, le caractère unique de l'UCP aviaire pourrait être dû à une perte des isoformes UCP1 et UCP2 (**Emre et al., 2007**) au cours des 310 millions d'années de divergence évolutive séparant les oiseaux des mammifères (cf. **figure 9 ; Kumar et Hedges, 1998**). Toujours d'après **Emre et collaborateurs (2007)**, l'UCP aviaire aurait compensé cette perte par l'acquisition de nouvelles fonctions, occupées chez les mammifères par les différentes isoformes d'UCP. De fait, trois rôles potentiels sont décrits dans la littérature : un rôle anti-radicalaire, un rôle dans le métabolisme lipidique et enfin un rôle thermogène (**Emre et al., 2007**).

- Un rôle anti-radicalaire ?

Aux vues des nombreuses études et revues publiées sur le sujet, il semble qu'UCP2 (Negre-Salvayre et al., 1997) et UCP3 (revue dans Brand et Esteves, 2005) jouent un rôle anti-radicalaire. En effet tout comme UCP1, ces UCPs sont activées par l'ion superoxyde O_2^- (Echtay et al., 2002) et semblent réguler la production de radicaux libres en diminuant la force protonmotrice, génératrice de radicaux libres. Il faut ajouter que la production de ROS (*Radical Oxygen Species*) est très finement régulée par une légère modulation du potentiel de membrane liée à un découplage partiel des oxydations phosphorylantes (*Mild uncoupling* ; Miwa et Brand, 2003) [Figure 1.17].

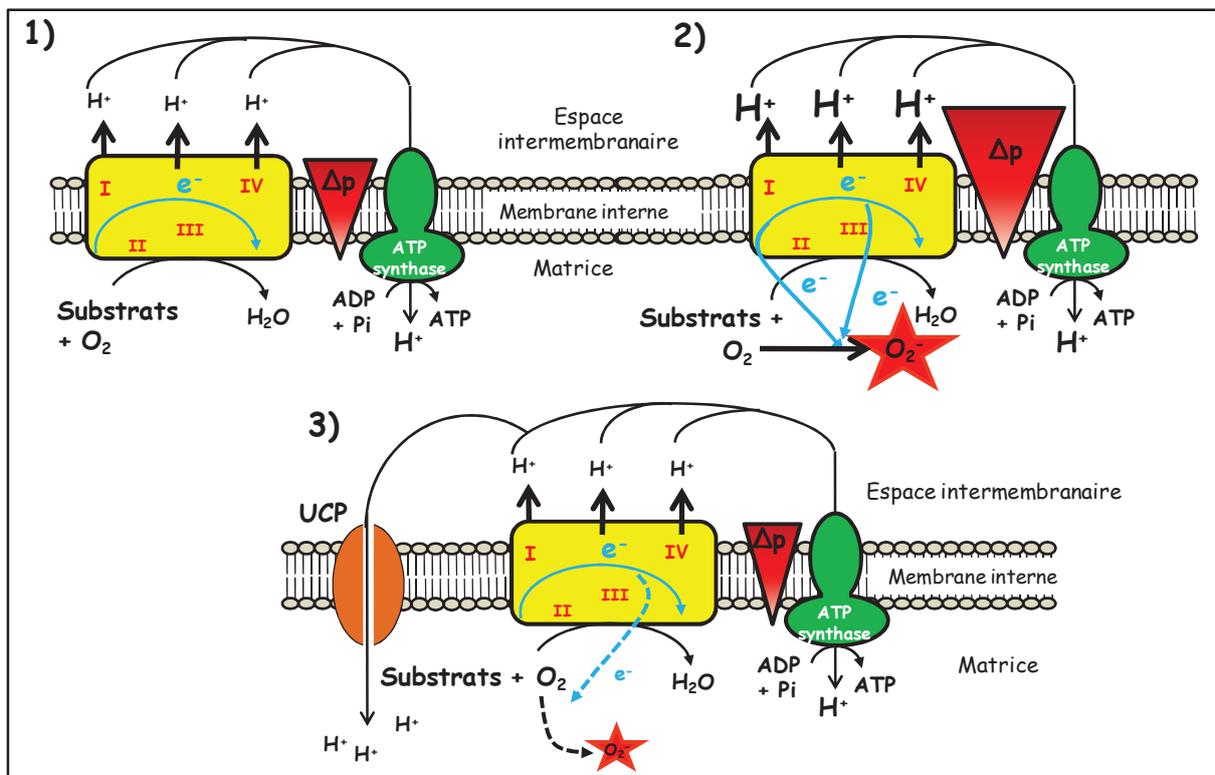


Figure 1.17 : Mécanisme de régulation de la production de radicaux libres par les UCPs. 1) Situation normale de l'activité des oxydations phosphorylantes de la chaîne mitochondriale. 2) Δp très important : ralentissement du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire, favorisant leur fuite dans la matrice. Ils réagissent ensuite avec l' O_2 pour former l'ion superoxyde O_2^- , espèce radicalaire. Il existe donc une relation entre force protonmotrice et production de radicaux libres. 3) En présence d'une UCP activée, les protons sont donc redirigés dans la matrice et la force protonmotrice diminue, entraînant un arrêt du retour d'électrons, stoppant la production de radicaux libres.

Chez les oiseaux, le rôle de l'UCP aviaire dans les mécanismes de défense antiradicalaire a été démontré lors d'une production artificielle de radicaux libres de l'oxygène (Talbot et al., 2004 ; Rey et al., 2010a).

Si l'on replace ce rôle potentiel dans un contexte écophysio­logique, il faut remarquer qu'au cours de sa vie, un oiseau peut être confronté à plusieurs situations pro-oxydantes. Notons que l'éclosion constitue pour l'oisillon une situation d'hypoxie-réoxygénéation propice à une production de radicaux libres. Cette situation entraîne une augmentation de l'expression génique de l'UCP aviaire (**Rey et al., 2010b**) et de fait suggère un effet antiradicalaire de l'UCP aviaire.

Une autre situation entraînant une augmentation de la production de ROS et de l'expression de l'UCP aviaire a été décrite par **Abe et collaborateurs** en **2006**. Il s'agit du jeûne alimentaire de courte durée (<48h) chez le poulet. En effet, au cours des heures suivant la privation de nourriture, l'afflux important de substrats lipidiques vers la mitochondrie induit une oxydation accrue sans que les besoins cellulaires en ATP soient modifiés. Il s'en suit une augmentation du potentiel de membrane, situation favorable à une production de radicaux libres. Cependant lors d'un jeûne de plus longue durée, ce stress oxydant semble diminuer car d'une part, les cellules augmentent leur capacité à oxyder les substrats lipidiques, limitant la production de ROS et d'autre part, en condition de carence nutritive prolongée, l'organisme met tout en œuvre pour diminuer le gaspillage énergétique.

Enfin certaines espèces d'oiseaux peuvent être soumises à un stress oxydant de façon répétée lors de situations bien particulières. En effet, qu'il s'agisse des profondes plongées successives en apnée du Manchot royal, *Aptenodytes patagonicus* (**Schmidt et al., 2006** ; **Culik et al., 1996**), ou des cycles de torpeur-réchauffement du colibri *Eupetomena macroura* (**Vianna et al., 2001**), exemples spectaculaires d'exercices musculaires endurants et/ou de succession de phases d'ischémie-reperfusion connus pour contribuer à l'augmentation du stress oxydant (**Cooper et al., 2002** ; **Ozaki et al., 2003** ; **Criscuolo et al., 2005**), ces situations entraînent également une modulation de l'expression de l'UCP aviaire chez ces oiseaux (**Talbot et al., 2003** ; **Vianna et al., 2001**).

- Un rôle dans le métabolisme lipidique ?

Bien que peu étudié jusqu'à maintenant, le rôle supposé de l'UCP aviaire dans le métabolisme lipidique (rappels **figure 1.18**) est surtout dû à une homologie fonctionnelle avec l'UCP3. En effet de nombreuses études tendent à montrer un rôle dans le métabolisme des lipides de l'UCP3 (revue dans **Brand et Esteves, 2005**). En fait, plusieurs mécanismes de transport des acides gras ou dérivés sont imputés à l'UCP3.

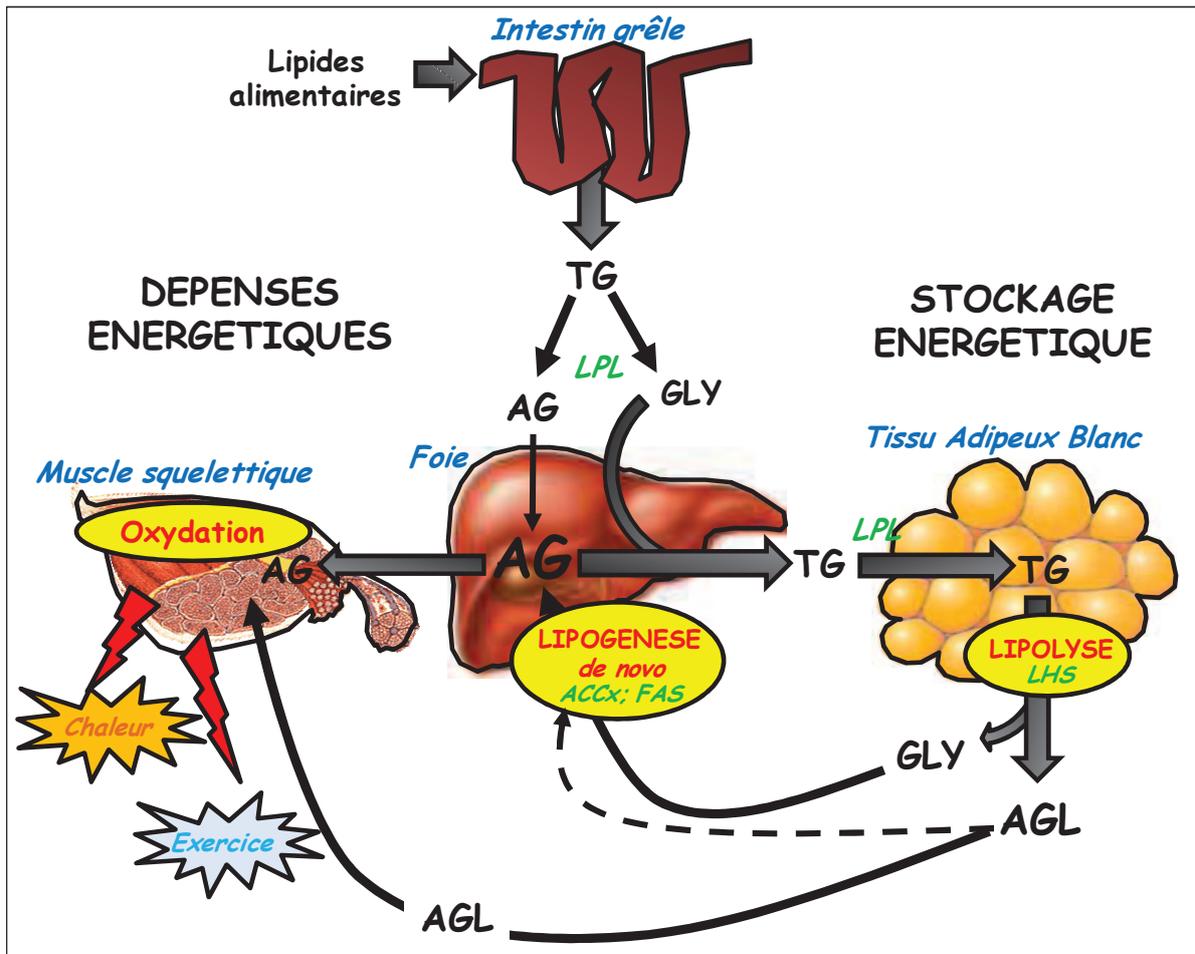


Figure 1.18 : Schéma récapitulatif du métabolisme lipidique. Il y a deux sources principales d'acides gras (AG) dans l'organisme : des apports exogènes (lipides alimentaires) et des apports endogènes provenant de la synthèse (lipogénèse) de novo. Il faut souligner le rôle clé du foie chez les Oiseaux, véritable carrefour métabolique. En effet, au niveau hépatique, les AG sont soit dirigés vers le muscle pour être directement utilisés comme substrat énergétique, soit vers le tissu adipeux blanc pour être stockés sous forme de gouttelette lipidique. Et contrairement aux mammifères, ils peuvent être stockés de manière non pathologique dans le foie. Lors d'une demande énergétique accrue (exercice musculaire intense, thermorégulation), les acides gras constituent le principal substrat énergétique. Et c'est au niveau du tissu adipeux blanc que s'activent les mécanismes de lipolyse, c'est-à-dire l'hydrolyse des triglycérides (TG) en glycérol (GLY) et acides gras libres (AGL). Le glycérol peut alors suivre les premières étapes de la glycolyse, jusqu'à former de l'Acetyl-coA permettant au foie de reformer des AG. Les AG provenant de la lipolyse sont principalement oxydés par le muscle squelettique comme substrat énergétique. (D'après Georges, 1996 ; Benistant, 1997, Bedu, 2002 et Letexier, 2004)

ACCx : Acetyl coenzyme A carboxylase ; AG : Acides gras ; AGL : Acides gras libres ; FAS : Fatty Acid Synthase ; GLY : Glycérol ; TG : Triglycérides ; LHS : Lipase Hormono-Sensible ; LPL : Lipoprotéine Lipase

L'UCP3 pourrait servir de transporteur d'acides gras sous forme anionique de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire (Himms-Hagen et Harper, 2001) lors

d'une augmentation du métabolisme lipidique. Effectivement, une oxydation importante des lipides entraîne une augmentation des concentrations en acyl-CoA (formés par un acide gras et un coenzyme A), et de fait une diminution de la disponibilité en coenzyme A, élément nécessaire pour la β -oxydation et le cycle de Krebs. S'en suit alors une cascade de réactions enzymatiques faisant notamment intervenir une thioestérase, permettant un clivage des acyl-coA en acide gras sous forme anionique et en coenzyme A, de nouveau libre pour participer à la β -oxydation et au cycle de Krebs. L'UCP3 serait alors à l'origine d'un mécanisme d'exportation des acides gras sous forme anionique hors de la mitochondrie pour qu'ils puissent à nouveau revenir sous forme protonique (revue dans **Schrauwen et al., 2006**) [Figure 1.19-1].

La deuxième hypothèse présentée par Schrauwen et collaborateurs (**Schrauwen et al., 2001**) montre que l'UCP3 permet de faire sortir de la mitochondrie les acides gras sous forme anionique qui, par un mécanisme de « flip-flop » au niveau de la bicouche lipidique, peuvent entrer dans la matrice mitochondriale [Figure 1.19-2].

La troisième hypothèse du rôle de l'UCP3 dans le métabolisme lipidique s'appuie sur une action antioxydante couplée à un rôle de transporteur des acides gras peroxydés. Les radicaux libres entraînent une peroxydation lipidique, néfaste pour les mitochondries. UCP3 interviendrait alors comme transporteur pour limiter les effets des lipides peroxydés et revêtirait alors dans un même temps, un rôle préventif contre les attaques radicalaires (**Goglia et Skulachev, 2003**) [Figure 1.19-3].

En s'appuyant sur ces observations et en se replaçant dans un contexte physiologique aviaire, on peut aisément comprendre la nécessité du rôle « lipidique » de la protéine découplante des oiseaux. En effet, les oiseaux ont un métabolisme principalement lipidique lors des phases de vol de longue durée (**Jenni-Eiermann et al., 2002 ; Vaillancourt et al., 2007**). Il a été montré que plus de 90% de l'énergie utilisée par les oiseaux en vol de longue durée était d'origine lipidique (**Jenni et Jenni-Eiermann, 1998**). De même, chez les Combattants (*Philomachus pugnax*), les substrats énergétiques consommés étaient d'origine lipidique à hauteur de 82% pour la thermogenèse de frisson et 66% pour la locomotion à terre (**Vaillancourt et al., 2005**).

De plus, des études récentes réalisées chez le poulet ont montré qu'il y avait un effet du régime alimentaire, plus ou moins riche en lipides, et du génotype gras ou maigre des animaux sur l'expression génique de l'UCP aviaire. Cette dernière étant plus exprimée chez des oiseaux soumis à un régime « *high-fat* » ou de génotype « gras » (**Collin et al., 2009**). Ainsi, chez le manchot royal, il a été montré que l'expression de l'UCP aviaire était

augmentée lors de phases de renourrissage avec des apports d'origine principalement lipidiques (Rey et al., 2008a).

Enfin, certaines études montrent une augmentation de la lipolyse [Figure 1.19] chez le caneton de Barbarie acclimaté au froid (Bénistant et al., 1998) et une modification des lipides membranaires, entraînant une augmentation des acides gras polyinsaturés (Châinier et al., 2000), plus sensibles à une peroxydation lipidique.

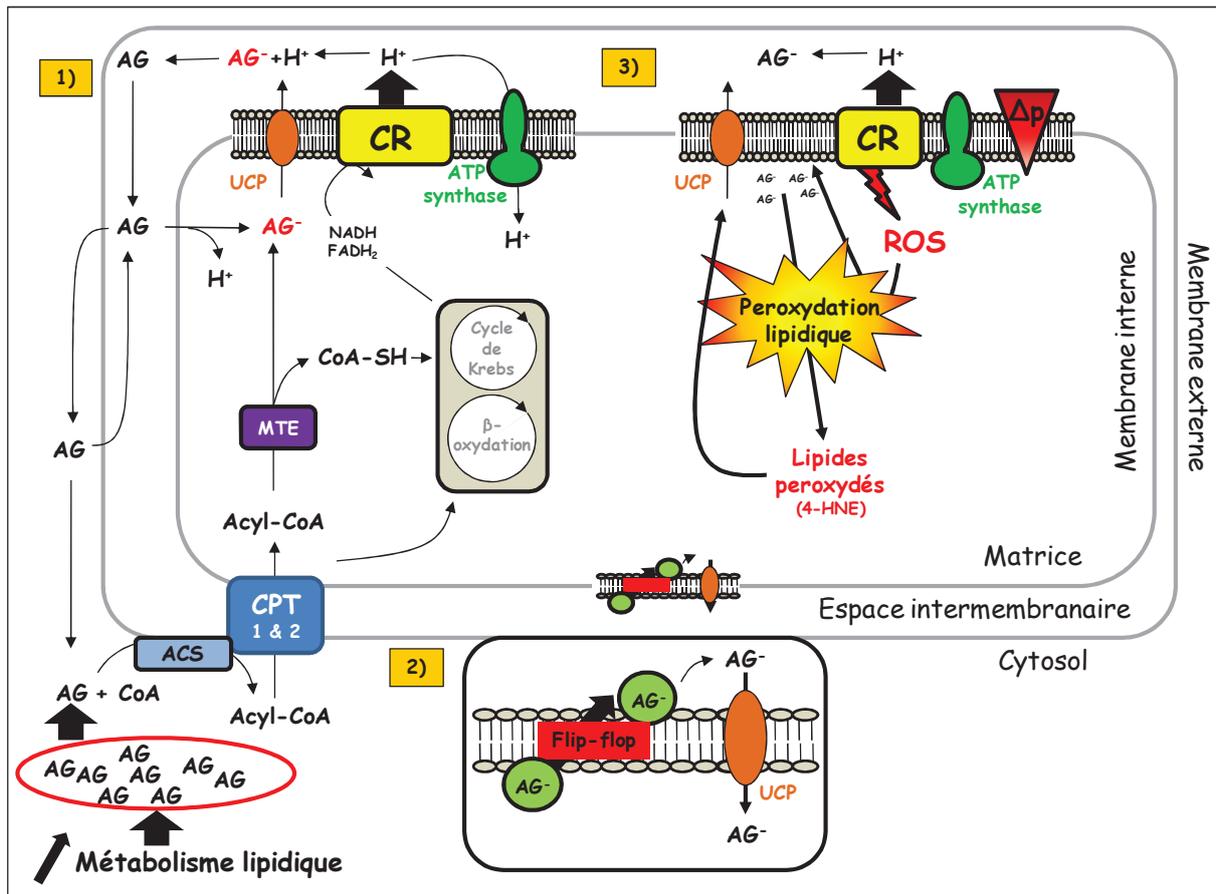


Figure 1.19 : Mécanismes potentiels de transport des acides gras via UCP3 et UCP aviaire. En 1), les UCPs servent à exporter les acides gras sous forme anionique lors d'une augmentation du métabolisme lipidique. La thioesterase mitochondriale va cliver les acyl-coA en AG^- et en Coa-SH. Ce qui va permettre une réutilisation du coenzyme A par le cycle de Krebs et la β -oxydation (Himms-Hagen et Harper, 2001). En 2), les UCPs servent d'exportateur d'acides gras anioniques, non métabolisables de la matrice vers l'espace intermembranaire pour contrer un effet « flip-flop » de la bicouche membranaire (Schrauwen et al., 2001). En 3), les UCPs apparaissent comme un mécanisme antioxydant, évacuant hors de la matrice mitochondriale les lipides peroxydés (4 HNE), produits par une attaque radicalaire des phospholipides membranaires, délétère pour la mitochondrie (Goglia et Skulachev, 2003). D'après Joubert, 2009 et revue dans Schrauwen et al., 2006.

ACS : Acyl-CoA Synthase ; AG : Acides Gras ; AG^- : Acides Gras sous forme anionique ; CoA-SH : Coenzyme A ; CPT : Carnitine Palmitoyl Transférèse ; CR : Chaîne respiratoire ; MTE : Mitochondrial ThioEsterase ; ROS : Radical Oxygen Species ; UCP : UnCoupling Protein ; 4-HNE : 4-Hydroxy-2-Nonenal

- Un rôle thermogène ?

Ce dernier rôle aurait pu sembler être le plus évident. Effectivement, on sait que l'UCP1 (première UCP découverte) est l'acteur principal de la thermogénèse sans frisson des mammifères. De ce fait, il paraît naturel de penser que l'UCP aviaire participe activement aux processus thermogènes des oiseaux. Plusieurs arguments que nous avons précédemment détaillés viennent étayer cette hypothèse :

- 1) Les oiseaux sont des endothermes, ce qui nécessite une régulation de leur température interne.
- 2) Il existe un mécanisme de thermogénèse sans frisson chez certaines espèces d'oiseaux.
- 3) Le site principal de la NST chez l'oiseau (le muscle squelettique) correspond à l'organe dans lequel l'UCP aviaire est le plus exprimé au niveau génique et protéique.
- 4) L'UCP aviaire est régulée par le système β -adrénergique, le glucagon et les hormones thyroïdiennes.
- 5) Et enfin, l'expression de l'UCP aviaire semble être modulée par la température ambiante (chaude ou froide).

Lors de la découverte de l'UCP aviaire par Raimbault et collaborateurs (**Raimbault et al., 2001**), une des idées premières était de tester l'effet de la température sur l'expression de cette nouvelle protéine découplante. Pour se faire, les auteurs ont acclimaté des canetons de Barbarie à 4 semaines de froid, condition suffisante pour induire une NST (**Barré et al., 1985**) et ont comparé les expressions géniques de l'UCP aviaire chez les oiseaux acclimatés avec des témoins élevés à neutralité thermique. De plus dans la même étude, un autre groupe expérimental a été formé par des canetons soumis à un traitement au glucagon, hormone lipolytique chez les oiseaux connue pour induire une NST (**Barré et al., 1987**). Chez ces animaux, l'UCP aviaire était aussi surexprimée au niveau génique. D'autres études ont montré une augmentation de l'expression relative de l'UCP aviaire chez des espèces domestiques acclimatées au froid, principalement chez *Gallus gallus* (**Toyomizu et al., 2002 ; Collin et al., 2003**) et *Cairina moschata* (**Rey et al., 2010a**) et chez des oiseaux sauvages (*Aptenodytes patagonicus*) adaptés à des ambiances thermiques extrêmes froides (**Talbot et al., 2003**). Ce potentiel thermogène peut être mis en relation avec l'augmentation de l'expression de l'UCP aviaire chez les colibris (*Eupetomena macroura*) lors de la transition entre les phases de torpeur et de réchauffement (**Vianna et al., 2001 ; revue dans Bicudo et al., 2002**).

Source	Année	Espèces	Temperature d'acclimatation	Durée d'acclimatation	Expression génique UCPaviaire	Gène de référence
Raimbault et al.	2001	<i>C. moschata</i>	4°C	4 semaines	+260 %	18 S
Toyomisu et al.	2002	<i>G. gallus</i>	4-6°C	10-12 jours	+50 %	GAPdH
Collin et al.	2003	<i>G. gallus</i>	20°C	14 jours	+25 %	GAPdH
Talbot et al.	2004	<i>A. patagonicus</i>	Water (8°C)	*	+460%	B actine
Ueda et al.	2005	<i>G. gallus</i>	4°C	2 ou 7 jours	+60%/+70%	GAPdH
Dridi et al.	2008	<i>G. gallus</i>	4°C	2h	+70 %	GAPdH
Rey et al.	2010	<i>C. moschata</i>	4°C	4 semaines	+150 %	GAPdH

Tableau 1.3 : Augmentation de l'expression relative de l'UCP aviaire chez différentes espèces d'oiseaux. Ce tableau permet de montrer les différences d'expression relative de l'UCP aviaire en fonction des études réalisées. Cependant, plusieurs facteurs se confondent, quant à l'interprétation de ces différences. Aux vues des données bibliographiques, il semblerait que l'expression génique de l'UCP aviaire diffère selon les espèces, la température et la durée d'acclimatation. * signifie que les auteurs considèrent les manchots adaptés au froid.

D'après la bibliographie [Tableau 1.3] il semble que l'expression relative de l'UCP aviaire dépende de plusieurs facteurs, notamment de l'intensité du stress froid auxquels les oiseaux sont soumis. Ainsi, chez le poulet, une exposition à un froid modéré (20°C) pendant 14 jours induit une augmentation de la quantité d'ARNm de l'UCP aviaire deux fois moins importante que chez des poulets acclimatés pendant 12 jours à 4°C. De plus une exposition aiguë à un froid intense (2h à 4°C) induit une augmentation de 70% des ARNm de l'UCP aviaire chez le poulet.

Une exposition chronique au froid semble augmenter de façon nettement plus spectaculaire l'expression de l'UCP aviaire que ce soit chez des oiseaux acclimatés expérimentalement (*Cairina moschata*, + 260%, +150%) ou chez des oiseaux naturellement adaptés (*Aptenodytes patagonicus*, +460%).

D'autres études se sont intéressées à l'expression de l'UCP aviaire lors d'un stress thermique chaud mais les résultats ont été contradictoires avec soit une surexpression chez des poulets acclimatés à 32°C pendant 10 jours (**Dridi et al., 2008**), ou une diminution de l'expression de l'UCP aviaire (**Mujahid et al., 2006 ; Mujahid et al., 2007**). La différence avec l'étude de **Dridi et collaborateurs** peut s'expliquer par la différence de durée d'acclimatation (10 jours versus 36 h). En effet un stress thermique chaud va entraîner une période de régulation thermique via un hypométabolisme et une augmentation des pertes de chaleur, situation contraire à l'activation des UCPs. Cependant, lors d'une longue période d'acclimatation, une ambiance chaude entraîne une augmentation de l'expression relative de la leptine (hormone lipolytique) et du métabolisme lipidique chez le poulet, d'où l'intérêt pour les mitochondries d'activer leur UCP (**Dridi et al., 2008**).

Résumé et conclusion

*Le débat scientifique sur le ou les rôles potentiels de l'UCP aviaire est encore aujourd'hui très animé. L'unicité de cette protéine découplante dans le génome aviaire permet d'envisager de nombreuses possibilités quant au rôle physiologique de cette UCP. La plupart des études récentes sur le sujet terminent leur conclusion en insistant sur les futures investigations à mener pour pouvoir répondre à cette question (**Emre et al., 2007 ; Collin et al., 2009 ; Rey, 2008 ; Joubert, 2009**).*

Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés par une approche écophysiological à mettre en évidence l'implication possible de cette protéine découplante dans les mécanismes adaptatifs mis en place chez des oiseaux naturellement ou expérimentalement soumis à un stress froid.

V. Objectifs de la thèse

Aux vues du contexte bibliographique précédemment exposé, il semble important de continuer à explorer les différents mécanismes intervenant dans l'adaptation des oiseaux au froid, et plus particulièrement la mise en place de la thermogenèse sans frisson aviaire. Avec la découverte de l'UCP aviaire, on peut se poser la question du rôle potentiel de cette protéine découplante. Depuis quelques années, cette protéine suscite de nombreuses interrogations, entraînant au final, pléthore de publications, sous forme d'article ou de thèses.

Nous nous sommes principalement intéressés, par une approche intégrative, de l'animal entier (méthodes de calorimétrie indirecte) à l'expression génique (techniques de RT-PCR) en passant par une étude biochimique au niveau mitochondrial, à caractériser les modifications métaboliques et l'implication de l'UCP aviaire dans le mécanisme de thermogenèse sans frisson mis en place lors d'une adaptation au froid.

Nous avons donc suivi trois axes principaux :

- 1) **Caractériser une implication potentielle de la protéine UCP aviaire dans la thermogenèse sans frisson.** Nous avons démontré l'aspect « adaptatif » de la thermogenèse sans frisson en acclimatant des canetons de Barbarie à différentes intensités de stress froid. Nous avons montré une augmentation de l'expression relative de l'UCP aviaire corrélée avec la capacité de NST développée par les canetons. Ce travail a été publié dans *Journal of Experimental Biology* (Juillet 2010).
- 2) **Caractériser la mise en place du processus de NST en fonction de l'âge chez des canetons de Barbaries acclimatés à 4°C durant leur croissance.** La mise en place des processus thermogènes au cours de la croissance est encore peu connue chez les oiseaux. Seule l'ontogenèse de la thermogenèse sans frisson chez le poussin de manchot royal a été étudiée (**Duchamp et al., 2001**). Mais chez un oiseau strictement nidifuge, comme le caneton de Barbarie, aucune étude n'a encore montré la mise en place d'un tel mécanisme. Nous avons donc étudié la variation du métabolisme *in vivo* en parallèle de l'activité électromyographique chez des canetons acclimatés à 4°C pendant 2, 3, 4 et 5 semaines.

- 3) **Caractériser chez le Manchot Royal, la mise en place d'un métabolisme préférentiellement lipidique, lors d'une adaptation à la vie marine.** En effet, lors d'une étape clé de sa vie (passage en mer), le manchot royal est soumis à un stress froid qui nécessite une réponse adaptative. Cependant la vie marine s'accompagne aussi d'une augmentation de l'activité physique due aux longs voyages alimentaires. Le manchot devient alors un marathonien, développant des aptitudes physiques d'endurance hors-norme. Le contexte environnemental (eau froide) et physiologique (apnées répétées et nage d'endurance) entraîne nécessairement des adaptations métaboliques, comme la mise en place d'un métabolisme lipidique efficace. Ce travail est en cours d'écriture.

VI. Présentation et Intérêts des modèles d'études

1. Le Manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*, Miller 1778)

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai eu la chance et l'opportunité de travailler sur un oiseau sauvage en condition naturelle : le manchot royal. Ce modèle animal m'a permis d'étudier les processus métaboliques mis en place lors d'une adaptation au froid chez des oiseaux naturellement soumis à un environnement thermique défavorable.

a. Généralités

1. Famille des Sphéniscidés, genre *Aptenodytes*

Il existe 18 espèces de manchots appartenant tous à la famille des Sphéniscidés [Figure 1.20], répartis dans l'hémisphère Sud, depuis l'équateur jusqu'au Pôle Sud, en Antarctique. Ils sont classés en 6 genres :

- g. *Pygoscelis* (Manchot Papou, M. à jugulaire, M. Adélie)
- g. *Eudyptes* (Gorfou sauteur, G. macaroni, G. des îles Snares, G. huppé, G. de Schlegel, G. des Fjordland),
- g. *Spheniscus* (M. de Magellan, M. de Humboldt, M. des Galápagos, M. du Cap)
- g. *Eudyptula* (petit M. bleu, M. à ailerons blancs)
- g. *Megadyptes* (M. à œil jaune)
- et enfin g. *Aptenodytes* (M. Empereur et M. Royal)

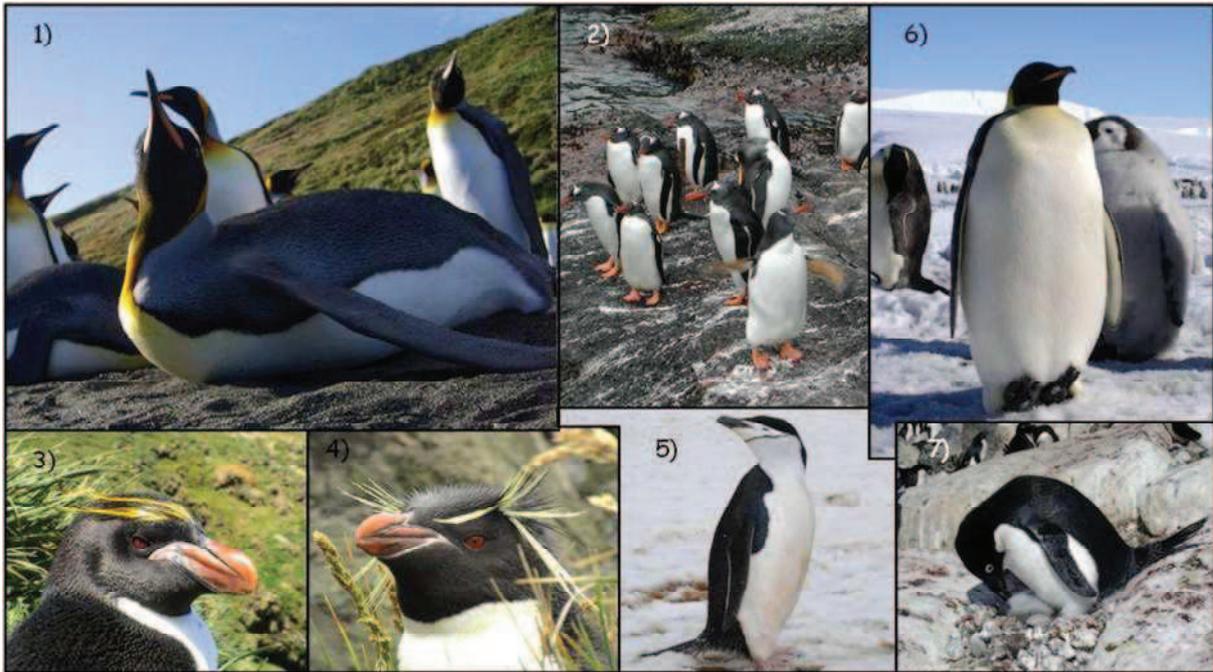


Figure 1.20 : différents genres de manchots. 1) Manchot royal. 2) Manchot Papou. 3) Gorfou Macaroni. 4) Gorfou sauteur. 5) Manchot à jugulaire. 6) Manchot empereur. 7) Manchot adélie. De 1) à 4) : manchots vivant en zone subantarctique. De 5) à 7) : manchots vivants en zone antarctique.

Le Manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) est séparé en 2 sous espèces en fonction de la zone géographique qu'ils occupent : *A.p. patagonicus* et *A.p.halli*, la première se rencontrant en Géorgie du Sud et aux Malouines et la deuxième sur les îles du Prince Edouard, Marion, Kerguelen, Macquarie, Heard et Crozet. La population totale estimée à 1.600.000 couples est dispersée en colonies regroupant quelques milliers à plusieurs centaines de milliers d'individus.

2. Le manchot royal : un spécialiste de la vie marine

C'est un oiseau marin pélagique, adapté à la plongée de grande profondeur, qui au fil de l'évolution, a perdu la capacité de voler. En effet, sa morphologie et sa physiologie ont évolué dans le but d'être le plus efficace en mer. Son corps fuselé et son plumage dense et court (~35 plumes par cm² de peau) lui apporte un hydrodynamisme, une isolation thermique (Dawson et al., 1999) et une résistance aux hautes pressions spectaculaires. Ses membres supérieurs sont devenus des palettes natatoires, rattachés à des muscles pectoraux impressionnants, optimisant la propulsion. De plus il possède une capacité à stocker l'oxygène via une concentration élevée en myoglobine (Noren et al., 2001) et un squelette très calcifié, diminuant la flottabilité et facilitant la plongée (Wilson et al., 1992) [Figure 1.21].

Compte tenu de cette morphologie propre aux Sphéniscidés et de sa grande taille (85 à 95 cm de haut pour 12-14 kg en moyenne), il est capable d'exploiter les ressources de l'océan jusqu'à plus d'un millier de kilomètres des côtes subantarctiques (Pütz, 2002) en plongeant de façon répétée à des profondeurs atteignant plus de 200 mètres. Son régime alimentaire se compose essentiellement de Myctophidés (poissons lanternes) et de petits Céphalopodes du genre *Onychoteuthis* (Cherel et al., 1993 ; Cherel et al., 1996). Du fait de son régime alimentaire peu varié, on peut voir des patterns différents de voyages nourriciers avec des distances parcourues nettement plus grandes quand les ressources alimentaires se font rares (en hiver : distance moyenne >1000 km, en été : distance moyenne ~300km) (Charassin et Bost, 2001 ; Pütz, 2002). Sa spécialisation au milieu marin s'accompagne d'un cycle de vie où seules les périodes de mue et de reproduction se passent à terre (parade, accouplement, ponte, couvaison et nourrissage des petits).



Figure 1.21: photographies illustrant la spécialisation du manchot royal à la plongée. A) Manchot royal sortant de l'eau. On voit sur la photographie le membre supérieur évolué en aileron. B) gros plan sur le plumage très dense du Manchot royal. C) Manchot royal dans son élément (© Tornos).

3. Le cycle reproducteur du manchot royal

Le cycle de reproduction du manchot royal est particulièrement long, puisqu'il s'étend sur plus d'un an (~ 14 mois) contre environ 5 mois pour le manchot empereur et 2 mois pour le manchot adélie. Les manchots pondent un œuf par an, et en fonction de la date de ponte, ils sont appelés reproducteurs précoces (novembre-décembre) ou tardifs (février-mars). Il faut noter que les succès de reproduction des oiseaux tardifs sont très faibles car les poussins sont élevés pendant une longue période (environ 11 mois) et ne seront nourris alternativement par leurs 2 parents de façon régulière que durant les 3-4 premiers mois d'été puis jeuneront durant la période hivernale (**Cherel et al., 1987** ; revue dans **Le Bohec, 2007**). Cette alternance de phases de nourrissage/ jeûne/ renourrissage nécessite la mise en place de capacités de stockage importantes lors de l'été. La survie des poussins est donc très largement dépendante des réserves accumulées pendant l'été et utilisées au cours de l'hiver austral.

b. Description du milieu de vie : Archipel de Crozet

L'Archipel des îles Crozet, est un ensemble d'îles d'origine volcanique, séparé en deux groupes, toutes situées entre les parallèles 45° et 47° Sud et les méridiens 50° et 53° Est (**Giret et al., 2003**) [**Figure 1.22**] :

- i. un groupe *occidental* avec les 12 îlots des Apôtres, l'île aux Cochons et l'île aux Pingouins,
- ii. l'autre *oriental*, à 100 km du précédent, avec l'île de l'Est et l'île de la Possession sur laquelle se trouve la base scientifique Alfred Faure.

Les plages des îles de l'archipel sont largement colonisées par les Manchots royaux, dont près de la moitié de la population mondiale serait concentrée sur ces îles, ce qui fait de l'île de la Possession et de sa base scientifique Alfred Faure, un atout majeur pour les études portant sur ce modèle animal. En effet l'île de la Possession (46°21' S, 51°37' E) est la seule île de l'archipel qui est accessible pour effectuer des recherches de terrain [**Figure 1.22**].

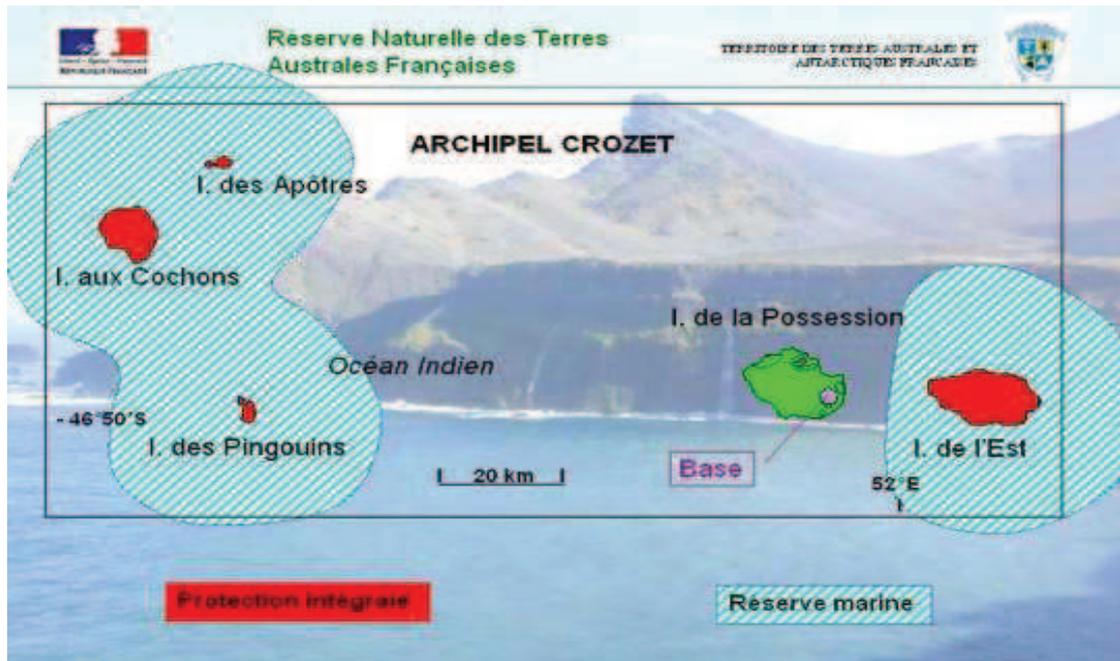


Figure 1.22 : carte de l'Archipel de Crozet. Seule l'île de la Possession (en vert) est accessible. Les autres sont protégées comme réserves naturelles. (IPEV, TAAF)

Le climat sur l'archipel est de type subantarctique, avec des températures avoisinant les 5°C de moyenne et fluctuant entre -5°C et +15°C . Les conditions thermiques ne sont donc pas extrêmes mais les vents dominants de secteur ouest à nord-ouest, souvent violents (plus de 100km/h) et très fréquents (plus de 100 jours par an) et le fort taux d'humidité (~85%) dû aux précipitations importantes (>2500 mm par an) et quasiment quotidiennes (300 jours de pluie par an) augmentent considérablement les sensations de froid (effet *Windchill*).

c. Le passage en mer, une étape clé de l'adaptation thermique

A terre, il semblerait que les Manchots royaux ne soient pas trop soumis à un stress thermique froid. Cependant si on prend en compte les différents stades de développement de cet oiseau, les contraintes évoluent en fonction des phases d'émancipation thermique. En effet, les poussins éclosent en général au début de l'été austral, complètement nus et sont couvés constamment jusqu'à l'acquisition d'une homéothermie suffisante (**Barré, 1978**). Le passage du statut hétérotherme à celui d'endotherme s'effectue en deux paliers : les 15 premiers jours, le poussin développe surtout ses capacités métaboliques de thermorégulation et durant les 15 jours suivants, il cherchera à augmenter son pouvoir isolant (apparition d'un épais duvet). L'émancipation thermique définitive s'opère un peu plus tard, à l'âge d'un mois (**Duchamp et al., 2002**). Les poussins bénéficient alors d'un microclimat favorable sur la colonie avec une température avoisinant les 8°C (**Barré, 1978**)

tout au long de l'été austral. Ils sont tout de même capables de développer une thermogenèse sans frisson en réponse à la rudesse climatique de l'hiver austral (**Duchamp et al., 1989**). Avant de muer, les poussins ne vont pas en mer, leur duvet n'étant pas adapté.

Par contre, une fois mués, les juvéniles vont s'adapter à la vie marine en séjournant progressivement de plus en plus longtemps en mer, se limitant au départ à des eaux dont la température varie seulement de 3 à 5°C (**Barré, 1981**). A l'âge adulte, le Manchot royal passera près de 80% de son temps en mer partant parfois plusieurs semaines pour assurer ses besoins nutritifs et ceux de son poussin, en période d'élevage.

Le passage de la vie terrestre à la vie marine est une étape clé du développement d'un manchot royal. Pour la première fois, le juvénile va être confronté à un stress thermique important, sollicitant des adaptations métaboliques spécifiques. En effet, on sait que l'eau a un pouvoir conducteur (0,55 W/m.°C à 0°C) 21 fois supérieur à celui de l'air (0,024 W/m.°C à 0°C) et que les phénomènes de convection associés à un déplacement sont d'autant plus augmentés que l'eau est froide (**Barré et al., 2001**). Pour limiter les échanges thermiques principalement aux extrémités, le Manchot royal utilise de puissantes vasoconstrictions périphériques associées à des systèmes d'échanges de chaleur à contre-courant au niveau des membres antérieurs et postérieurs permettant de diminuer les pertes de chaleur par convection.

Il faut noter que la nage, constituant un exercice physique de type endurance, engendre aussi une production de chaleur, participant certainement de manière importante au maintien de l'homéothermie. La contre partie de cette activité contractile prononcée étant un coût énergétique non négligeable.

De fait, évoluer dans une eau dont la température oscille entre 4°C en été et -0,8°C en hiver selon la zone de prédation (**Charrassin et Bost, 2001**), tout en parcourant de longues distances, représente pour le manchot royal un réel challenge énergétique.

d. Intérêts et limites du modèle

De par les spécificités de sa niche écologique et de son développement, ainsi que par la somme de connaissances accumulées au fil des années de recherche, le manchot royal se présente comme un candidat particulièrement approprié pour étudier les adaptations physiologiques des oiseaux au froid. Cependant, travailler sur ce modèle impose de nombreuses limites tant éthiques et scientifiques, que temporelles et financières. En effet, aux vues du statut protégé des espèces subantarctiques, les études scientifiques se doivent

d'être les moins invasives et traumatisantes possible sur un nombre d'oiseaux restreint, paradoxalement très varié au niveau génétique. Les limites temporelles et financières sont aisément compréhensibles, vu la situation géographique de l'île de la Possession. Ainsi il nous est apparu comme nécessaire et obligatoire de compléter ces données avec l'étude d'un autre modèle aviaire : le caneton de Barbarie.

2. Le caneton de Barbarie (*Cairina moschata*, Linné, 1758)

a. Description générale

Le canard de Barbarie (*Cairina moschata*) est une espèce domestique de la famille des Anatidés, dérivée du Canard Musqué, originaire d'Amérique du Sud. Il fut introduit en Europe dès le XVI^e siècle et est aujourd'hui commun sur tous les continents.

L'espèce sauvage atteint une taille relativement imposante d'environ 80 cm pour un poids de 3 kg chez les mâles adultes, avec un dimorphisme sexuel prononcé. Le mâle, plus imposant, arbore une protubérance à la base du bec et une zone de peau nue faciale qui sont noirâtres parfois rougeâtres lorsqu'il est mature sexuellement. Son plumage combine toutes les variantes entre le noir et le blanc.

L'espèce domestique a été sélectionnée au fil des générations pour atteindre une masse corporelle plus importante (80 cm ; 4-5 kg pour les mâles adultes et 2-3 kg pour les femelles adultes) ce qui les empêche généralement de voler.

La période d'incubation (~35 jours) est plus longue que chez la majorité des autres canards domestiques (en moyenne : entre 25 et 28 jours). A la naissance le caneton est couvert de duvet mais n'est pas encore thermiquement totalement émancipé. Les premiers jours, il a besoin d'une ambiance thermique chaude (~32°C) pour maintenir sa température constante (autour de 41°C). La cane peut participer au réchauffement des petits mais en situation d'élevage, les canetons se serrent les uns aux autres. Ensuite le caneton de Barbarie possède une croissance exponentielle les 4 premières semaines de sa vie.



Figure 1.23 : Le Canard de Barbarie (*Cairina moschata*) au stade éclosion, caneton et à l'âge adulte. Dans le cadre de nos expériences, les canetons de Barbarie utilisés étaient exclusivement des mâles de pedigree R31 (INRA, France) issus de l'établissement spécialisé Eclosion (groupe Grimaud la Corbière, 49450 ROUSSAY).

b. Avantages du modèle

Comme modèle d'étude, le caneton de Barbarie présente plusieurs avantages. Tout d'abord, historiquement notre laboratoire l'utilise couramment pour étudier la mise en place des mécanismes thermogènes chez l'oiseau. En découle une grande connaissance scientifique du modèle au travers des thèses passées au laboratoire (**Rouanet, 1983** ; **Barré, 1984** ; **Duchamp, 1990** ; **Roussel, 1999** ; **Rey, 2008** pour ne citer que celles-ci).

De plus, au niveau pratique, cet oiseau possède un pedigree INRA [**Figure 1.23**] et peut nous être fourni quasiment tout au long de l'année par un établissement agréé. Cela nous permet d'avoir une traçabilité de l'origine et de l'âge et limite les variations génétiques interindividuelles. En effet, les canetons sont livrés à un jour après éclosion (± 12 h). Et enfin, l'élevage des canetons de Barbarie est assez simple.

D'un point de vue purement scientifique, le caneton de Barbarie est très intéressant car avec le manchot royal et le poulet, c'est à ce jour le seul modèle oiseau à développer une NST musculaire (**Duchamp et Barré, 1993** ; revue dans **Duchamp et al., 1999**). Elevé dans une ambiance thermique froide (4°C), il arrive à accroître ses capacités thermogènes en augmentant l'efficacité du frisson thermique (**Barré et al., 1985**) et en développant par la suite une thermogénèse sans frisson d'origine musculaire (**Duchamp et Barré, 1993**). Enfin, parallèlement, les canetons exposés au froid présentent une augmentation importante de l'expression relative de l'UCP aviaire dans leurs muscles squelettique (**Raimbault et al., 2001, Rey et al., 2010a**), suggérant ainsi un rôle clé de cette protéine découplante dans la mise en places des processus thermogènes chez l'Oiseau.

Deuxième partie

Matériel & Méthodes

I. Lots expérimentaux d'animaux

1. Les canetons de Barbarie (*Cairina moschata*, Linné, 1758)

Les canetons de Barbarie (pédigrée R31, INRA) proviennent de l'élevage avicole industriel Ecllosion, Grimaud-La-Corbière, France.

Pour chaque étude, les canetons ont été reçus à l'âge d'un jour et ont été acclimatés pendant une semaine à l'animalerie, dans des enceintes spécialement conçues pour la stabulation aviaire. Durant la première semaine d'acclimatation, la température des enceintes était de 30°C (pendant les 3^{ers} jours) puis de 27°C pour la fin de la semaine.

Durant toute la durée des expérimentations, la nourriture (Moulin Guenard, Canard démarrage, 645000MI, France) et l'eau de boisson étaient fournies ad libitum.

Les canetons ont été élevés avec une photopériode 8h jour/16h nuit pour reconstituer artificiellement la période hivernale.

A partir de la deuxième semaine de stabulation, les canetons étaient répartis dans des enceintes expérimentales à températures ambiantes différentes : à 25°C (TN pour thermoneutralité), à 11°C ou à 4°C (CA 11 ou CA 4 pour *Cold-Acclimated*).

2. Les Manchots Royaux juvéniles (*Aptenodytes patagonicus*, Miller, 1778)

Les Manchots royaux ont été capturés dans l'archipel de Crozet, au cours de la campagne d'été 2008-2009 entre décembre 2008 et mars 2009.

La capture des oiseaux était précédée d'une phase de repérage. En effet, afin de correspondre à notre protocole, l'oiseau capturé devait répondre à différents critères phénotypiques.

Le premier groupe expérimental était constitué de juvéniles jamais allés en mer. Les manchots juvéniles étaient donc repérés au fond de la colonie dans une zone appelée le « Carré » [Figure 2.1] avec un reste de duvet sur la tête, signe qu'ils étaient en fin de mue mais n'étaient encore jamais passés en mer.

Le deuxième groupe expérimental était composé de manchots juvéniles déjà passés en mer. Pour être sûr qu'ils étaient déjà allés au moins une fois en mer, les manchots de ce groupe étaient capturés sur la plage à la sortie d'un bain. Les juvéniles étaient repérés par leur tache auriculaire jaune pâle (qui devient vive chez les adultes, matures sexuellement).

Une fois repérés et capturés, les manchots étaient remontés sur base et placés dans un parc de stabulation. Ils restaient 7 jours sur base avant d'être relâché en bord de plage. Aucun manchot n'est resté seul dans le parc plus d'une demi-journée. Chaque manchot était nourri deux fois par jours avec des maquereaux décongelés à raison de 1kg/jour pendant les 3 premiers jours suivant leur capture puis étaient mis à jeun 2 jours avant les expériences. Ce protocole de nourrissage/ jeûne nous permettait de standardiser le statut nutritionnel des oiseaux. Un point d'eau était toujours à disposition.



Figure 2.1 : la baie du Marin, île de la Possession, Archipel de Crozet. Différents lieux de capture des manchots royaux juvéniles : la plage pour les manchots adaptés à la vie marine et le « carré », un peu en retrait de la plage.

II. Etude *in vivo*

1. Mesure de la thermogénèse sans frisson

La thermogénèse sans frisson est définie comme un mécanisme de thermorégulation facultative se développant en condition de stress thermique chronique. Il se traduit par une augmentation du métabolisme (ce qui équivaut à une production de chaleur) sans augmentation de l'activité de frisson dans une gamme de température ambiante. Pour pouvoir calculer une capacité de NST, il faut donc obtenir simultanément une mesure du métabolisme *in vivo* et une mesure de l'activité électromyographique d'un muscle squelettique de l'animal au fur et à mesure que la température ambiante diminue.

Les matériels et méthodes utilisés dans ce but sont décrits ci-dessous.

2. Mesure du métabolisme *in vivo*

a. Principe de la thermochimie respiratoire

Les mesures du métabolisme *in vivo* sur les canetons de Barbarie et les juvéniles de manchot Royal ont été réalisées par thermochimie respiratoire en circuit ouvert (**Depocas et al., 1957**).

En tenant compte des différents paramètres acquis (Pression barométrique, taux d'humidité dans l'air, poids du caneton, $F_{E}O_2$, $F_{E}CO_2$) on calcule le métabolisme de l'animal (en W/kg) en condition STPD (*Standard Temperature and Pressure, Dry* : 0°C, 760 mmHg, air sec) ainsi que son quotient respiratoire (QR) [**Figure 2.2**].

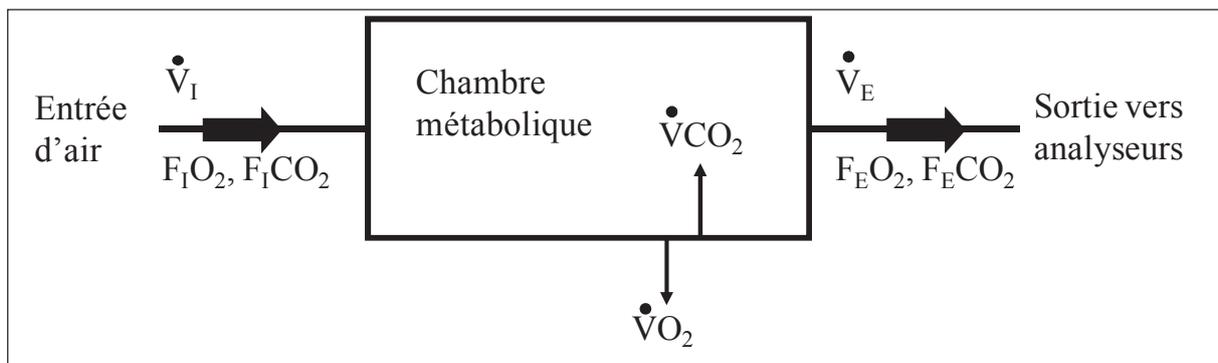


Figure 2.2 : représentation schématique du principe de thermochimie respiratoire. (D'après **Barré H.**, Thèse d'état « Recherche sur la thermogénèse de régulation chez l'oiseau », 1984)

$F_I O_2$: concentration fractionnaire en oxygène de l'air entrant dans la chambre métabolique (0.2093)

$F_I CO_2$: concentration fractionnaire en dioxyde de carbone de l'air entrant dans la chambre métabolique (0.0004)

\dot{V}_E : Débit d'air sortant de la chambre métabolique (L/h)

$F_E O_2$: concentration fractionnaire en oxygène de l'air sortant de la chambre métabolique

$F_E CO_2$: concentration fractionnaire en dioxyde de carbone de l'air sortant de la chambre métabolique

Calcul du métabolisme :

$$\dot{V}O_2 = [\dot{V}_E F_{I O_2} \times (1 - F_{E CO_2}) - \dot{V}_E F_{E O_2} \times (1 - F_{I CO_2})] / (1 - F_{I O_2} - F_{I CO_2})$$

$$\dot{V}CO_2 = [\dot{V}_E^* (F_{I O_2} - F_{E O_2}) - \dot{V}O_2^* (1 - F_{I O_2})] / F_{I O_2}$$

$$QR = \dot{V}CO_2 / \dot{V}O_2$$

$$\text{Métabolisme} = \dot{V}O_2 \times [4,687 + (((QR - 0,707) / 0,293) \times 0,361)] \text{ en kcal/h si } \dot{V}O_2 \text{ en L/h}$$

Avec 4,687 = coefficient calorifique des lipides

0,707 = QR des lipides

0,293 = $QR_{\text{lipides}} - QR_{\text{glucides}}$

0,361 = coefficient calorifique des lipides – coefficient calorifique des glucides

Pour convertir ce résultat en Watts, il suffit de le multiplier par 1,162.

(Pour rappel : 1cal = 4,184 J et 1 W = 1 J/s, donc kcal/h = 1000 cal/3600s = 41,84/36 = 1,162 J/s)

b. Description de la chaine métabolique

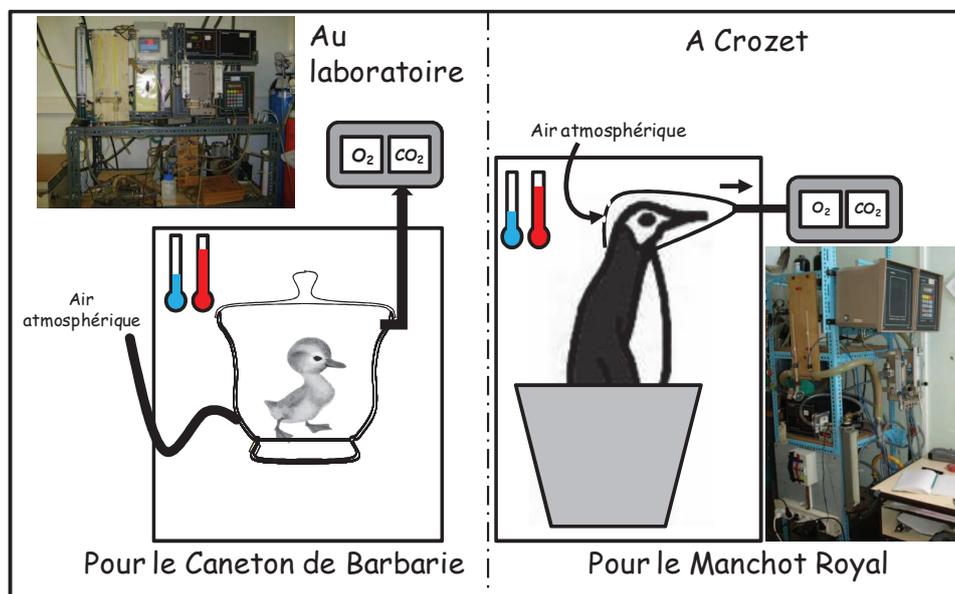


Figure 2.3 : Illustration de la chaine métabolique utilisée pour les canetons ou les manchots. Dans les 2 cas, l'oiseau est placé dans une enceinte thermostatée. Bien que le principe reste rigoureusement le même, la différence notable est que le caneton est enfermé dans une chambre métabolique, constitué par une enceinte en verre fermée hermétiquement, alors que le manchot porte un masque en polypropylène sur la tête.

Pour les canetons

Les canetons étaient placés dans une enceinte hermétique en verre de 5 litres, constituant la chambre métabolique, elle-même située dans un caisson thermostaté, permettant de laisser les oiseaux dans l'obscurité à la température souhaitée.

Le circuit d'air est alimenté par une pompe qui permet de garder un débit d'air constant de 7 à 16 L/min en fonction de la taille de l'individu, ce qui permet un renouvellement total de la chambre métabolique toutes les 50 secondes au minimum (évitant ainsi une hypercapnie) [Figure 2.3].

Des pièges à glace et de la drierite (CaSO_4 anhydre) permettent de sécher l'air expiré dont une partie (débit : 150 mL/min) est analysée par un analyseur paramagnétique d' O_2 du type Servomex série 1100 (précision 0,05% sur une échelle de 20 à 21%) et par un analyseur infrarouge de CO_2 du type Servomex série 1400 (précision 0,5% sur une échelle de 0 à 2%). Ces analyseurs permettent de mesurer la $F_{\text{E}}\text{O}_2$ et la $F_{\text{E}}\text{CO}_2$ de l'air sortant de l'enceinte [Figure 2.4].

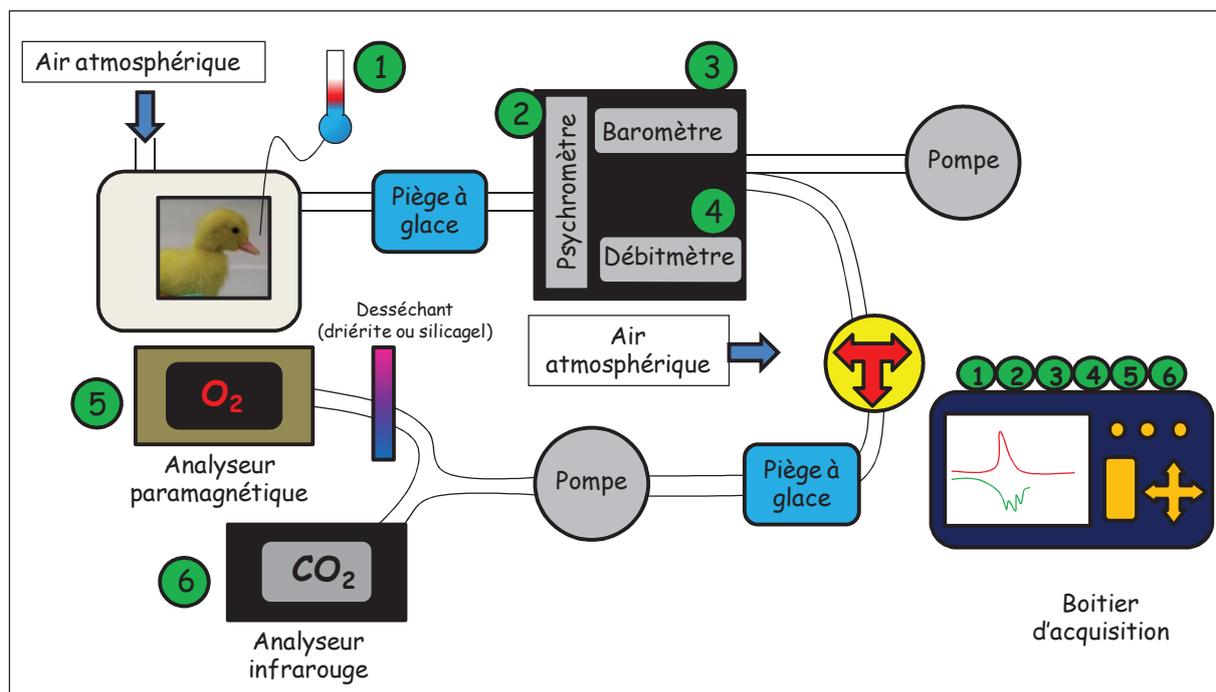


Figure 2.4 : Illustration des différents éléments composant la chaîne métabolique. Le principe est détaillé dans le texte. Les différents paramètres (numérotés de 1 à 6) sont enregistrés par un boîtier d'acquisition (Midi Logger GL200, Graphtec) et traités par ordinateur. 1) température ambiante, 2) humidité relative de l'air, 3) Pression atmosphérique, 4) Débit d'air, 5) teneur en oxygène, 6) teneur en dioxyde de carbone

Pour les manchots

Les manchots étaient placés en semi contention dans un bac, lui-même placé dans une enceinte ventilée et thermostatée (SECASI, France). Un masque en polyéthylène léger d'un volume total d'1,5 L leur entoure la tête. Une pompe permettait de garder un débit d'air constant de 40 L/min. Ce débit important permet d'éviter l'hypercapnie même en cas de forte agitation.

Comme pour les canetons, l'air expiré est séché par un piège à glace et de la driérite et une partie de cet air (débit : 150 mL/min) est analysée par des analyseurs d'O₂ et de CO₂ (même modèle que ceux utilisés au laboratoire).

Dans les 2 cas, les analyseurs étaient étalonnés chaque semaine avec de l'azote pur (N₂, Air Liquide, France) pour calibrer le « Zéro » et avec l'air atmosphérique (teneur en O₂ : 20.93%) et un mélange Cristal (N₂ [94,998%] /CO₂ [5,02%], Air Liquide, France).

c. Protocole expérimental

Pour les canetons

Avant chaque mesure du métabolisme, les canetons sont placés à jeun (12h) pour ne pas avoir d'influence de la digestion sur le métabolisme. A 7h30 ± 30 min, ils sont placés dans une chambre métabolique à thermoneutralité (27°C ou 29°C, selon les âges). Après un temps d'acclimatation d'environ 1 heure, la première mesure est enregistrée. Puis, on diminue progressivement la température ambiante de 27°C ou 29°C à -5°C en respectant plusieurs paliers durant lesquels la température ambiante reste stable pendant 1heure. Après ce temps d'acclimatation, le métabolisme du caneton est enregistré pour chacun de ces paliers.

Pour les manchots

Les manchots sont placés à jeun 48h avant la mesure du métabolisme. Puis le matin, entre 8h30 et 9h les oiseaux sont équipés du masque et sont placés dans l'enceinte thermostatée à thermoneutralité (10°C) pendant une heure durant laquelle le manchot s'acclimata à son nouvel environnement. Les mesures de métabolisme commencent suite à cette période d'acclimatation.

3. Mesure du frisson

a. Méthode d'acquisition

Pour enregistrer l'activité électromyographique(EMG) des canetons, trois électrodes (positive, négative et une terre) sont insérées dans le muscle gastrocnémien. Elles sont constituées d'un fil métallique de 0.12 mm de diamètre (Stabilohm 110, Ni 80% et Cr 20%, Johnson Matthey Ltd., UK) isolé par une gaine sur toute sa longueur sauf à 2 mm de son extrémité recourbée en hameçon. Chaque électrode est placée au sommet d'un triangle équilatéral de 10 mm de côté environ à l'aide d'une aiguille (0.5x16 mm, LB, Terumo). Une fois insérées, elles sont maintenues en place avec du sparadrap (Omniplast, 2,5 cm x 5 m, Hartmann) au niveau de la cuisse et du cou de l'oiseau. Elles sont reliées à une interface d'acquisition (modèle MP30B-CE, Biopac System Inc., USA) pour que les électromyogrammes soient acquis sur ordinateur par le biais du logiciel BIOPAC STUDENT LAB PRO V 3.6.7 (Biopac System Inc., USA).

b. Traitement des données par le logiciel Biopac Student lab v 3.6.7.

Chaque enregistrement de l'activité électromyographique est analysé par le logiciel BIOPAC STUDENT LAB PRO V 3.6.7 (Biopac System Inc., USA). L'interface d'acquisition est réglée pour enregistrer des fréquences entre 30 et 500 Hz (EMG) avec un filtre « passe-bas » à 500 Hz, un filtre « passe-haut » à 30 Hz et un filtre « stop bande » à 50 Hz. La fréquence d'échantillonnage est réglée sur 2000 points par seconde. L'intégration des données se fait par un redressement du signal moyenné sur 2000 points, c'est-à-dire sur une seconde.

Chaque mesure est effectuée sur au minimum 15 minutes, temps estimé assez long pour avoir une valeur de l'EMG stable si l'animal ne s'agite pas. L'activité musculaire liée à une agitation ou à un mouvement de posture n'ayant pas le même pattern que celle liée au frisson, les périodes d'agitation sont facilement repérées et retirées de l'analyse électromyographique a posteriori. De plus, une web cam permettait de discriminer les périodes d'agitation. Par conséquent, seules les valeurs d'EMG stable sont prises en compte dans le calcul de la moyenne.

4. Pose de cathéters, perfusions et prélèvements

a. Mise en place des cathéters

Les manchots étaient équipés d'un cathéter veineux à chaque aileron. La pose de cathéters s'effectuait sur animal vigile, évitant ainsi une répétition de période d'anesthésie. La contention des oiseaux était réalisée de façon à ce que l'oiseau soit le plus immobilisé possible avec un aileron libre.

Etant plus facile à positionner, le cathéter servant à la perfusion (Introcan 20G^{1/4}, BBraun medical SAS, France) était placé en premier sur l'aileron gauche. Une fois placé, le cathéter était bouché par un mandrin (Introcan, BBraun medical SAS, France) et protégé par une gaze. Ensuite l'oiseau était repositionné de façon à rendre libre l'autre aileron. Puis le cathéter utilisé pour les prélèvements (BD Insyte-W 16G x 1,77 in., BD compagny, USA) était placé. Un prolongateur en silicone médical (Silastic, Dow Corning, USA) de 12 cm environ était introduit par le cathéter pour remonter au niveau de la veine sous-clavière pour éviter la vasoconstriction périphérique lors des prélèvements. Le silastic était prolongé par 3 m de tube en polyéthylène (Portex Fine Bore Polythene, Smith medical, USA) protégé par une poche en plastique et une gaze. Le montage Silastic-tube polyéthylène était préparé à l'avance et rempli avec une solution saline (NaCl 0,9%).

b. Protocole expérimental

Les oiseaux étaient équipés la veille de l'expérimentation pour éviter tout stress lié à la manipulation et à la pose des cathéters.

Trois protocoles de perfusion différents ont été suivis.

- Perfusion de 30 mL de sérum physiologique (NaCl, 0,9%)
- Perfusion de 30 mL de sérum physiologique suivi d'une perfusion de 30ml de suspension de triglycéride (Intralipide 20%, Fresenius Kabi AB, Suède)
 - o Composition pour 100 mL :
 - Huile de soja purifiée 20 g
 - Excipients : phospholipides d'œuf purifiés, glycérol 2,2 g, hydroxyde de sodium, eau.
 - o Apport calorifique lipidique : 2000 kcal/L, teneur en AG essentiels : 120 g/L
- Perfusion de 30 mL de solution de glycérol (2,2 g/100 mL, Sigma, France)

Les perfusions étaient réalisées à l'aide d'une seringue automatique (model 100, Kd Scientific, USA) calibrée pour délivrer un mL/min. Pour chaque protocole de perfusion, un protocole de prélèvements a été élaboré pour obtenir une cinétique d'apparition et de disparition des différents métabolites lipidiques au cours du temps.

c. Les prélèvements

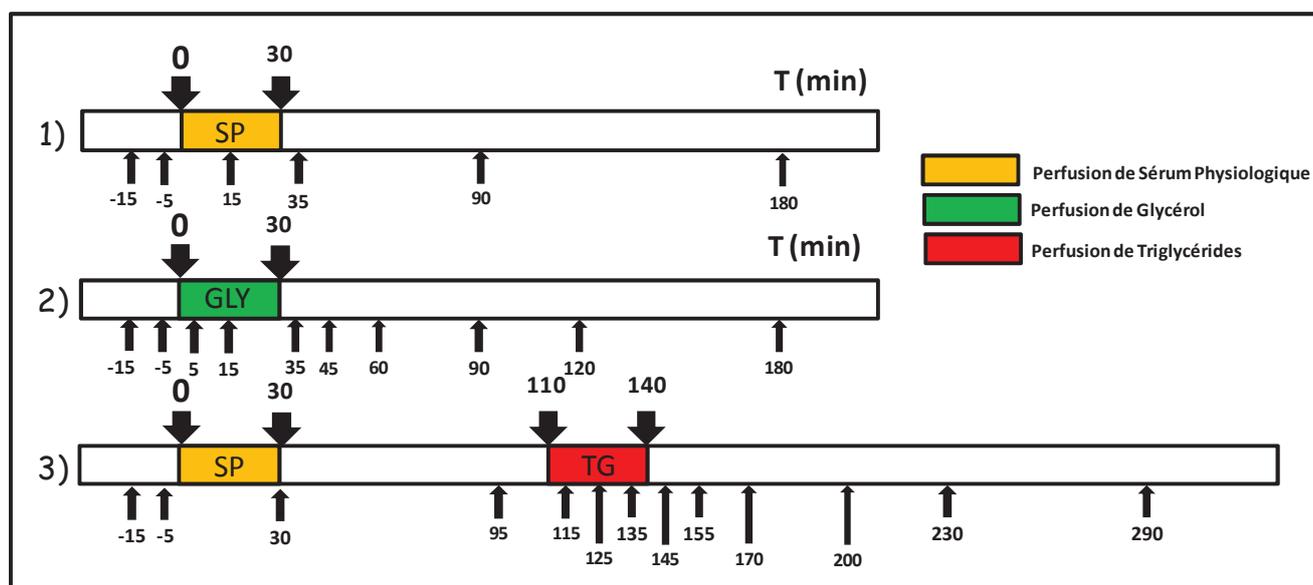


Figure 2.5 : illustration du protocole de prélèvements sanguins. Chaque prélèvement se faisait à un temps précis (temps indiqués sous les axes temporels). 1) Groupe perfusé au sérum physiologique. 2) Groupe perfusé au glycérol. 3) Groupe perfusé au sérum physiologique et aux triglycérides ensuite.

SP : sérum physiologique ; GLY : glycérol ; TG : triglycérides

Pour le groupe perfusé uniquement au sérum physiologique, 6 prélèvements ont été effectués. Pour le groupe perfusé au glycérol, 10 prélèvements ont été effectués et enfin pour le groupe perfusé au Sérum physiologique et avec une suspension de lipides, on a prélevé 14 échantillons [Figure 2.5].

Chaque échantillon de 700 μ L était prélevé par une seringue préalablement hépariné puis stocké dans de la glace à 4°C. Une fois tous les prélèvements réalisés, les échantillons étaient centrifugés 5 min à 3500 g. Le plasma ainsi récupéré était congelé pour des dosages plasmatiques ultérieurs.

d. Dosages plasmatiques

Pour chaque prélèvement effectué, les TG, le glycérol et les acides gras non estérifiés (NEFA, non esterified fatty acids) ont été dosés grâce à des kits commerciaux.

1. Dosage des acides gras

Les acides gras ont été dosés sur 7 μ L de plasma à l'aide d'un kit analytique colorimétrique (Kit NEFA-HR(2)©, Wako Chemicals, Allemagne).

2. Dosage des triglycérides.

Les triglycérides ont été quantifiés grâce à un test colorimétrique enzymatique (kit TG PAP 1000, Biomérieux, Marcy-l'étoile, France) sur 5 μ L d'échantillon. Le dosage repose sur l'action d'une lipoprotéine-lipase de micro-organismes (*Pseudomonas sp.*), capable d'hydrolyser les triglycérides en glycérol et acides gras. Le glycérol ainsi formé est alors transformé en glycérol-3-phosphate et oxydé en dihydroxyacétone-phosphate avec formation d'eau oxygénée. En présence de peroxydase, l'eau oxygénée réagit avec l'amino-4-phénazone et le chloro-4-phénol pour un dérivé coloré rouge.

3. Dosage du glycérol

Le glycérol est dosé quant à lui à l'aide d'une méthode colorimétrique (kit Gly GY105, Randox laboratories, UK) sur 15 μ L d'échantillon. Ce kit est basé sur le même principe que le kit de dosage des triglycérides.

III. Anesthésie et chirurgie

1. Anesthésie gazeuse

L'anesthésie est induite par inhalation d'isoflurane (Aerrane©, Baxter Laboratories, UK). Le manchot est maintenu avec un masque étanche lui entourant la tête. Le masque est relié à un distributeur d'isoflurane (Ohmeda medicals, USA), lui-même relié à une pompe permettant de délivrer un débit d'air atmosphérique (utilisé comme gaz vecteur) constant. Pendant 30 à 40 secondes, le manchot inhale 4,5% d'isoflurane [Figure 6]. Une fois endormi, l'animal est posé sur une table de chirurgie et intubé avec une sonde trachéale préalablement enduite d'un anesthésique locale (Tronothane gel 1%, Abbott Laboratories, USA).

Une fois le manchot intubé, la concentration en isoflurane est diminuée progressivement jusqu'à un pourcentage maintenu à 1,5% pendant la durée de la chirurgie. Le système d'inhalation est relié à un extracteur d'air permettant l'évacuation de l'air expiré grâce à un mécanisme de valve non retour. Un ballon est à disposition de l'anesthésiste qui, à tout moment, peut ventiler l'oiseau en cas de détresse respiratoire.

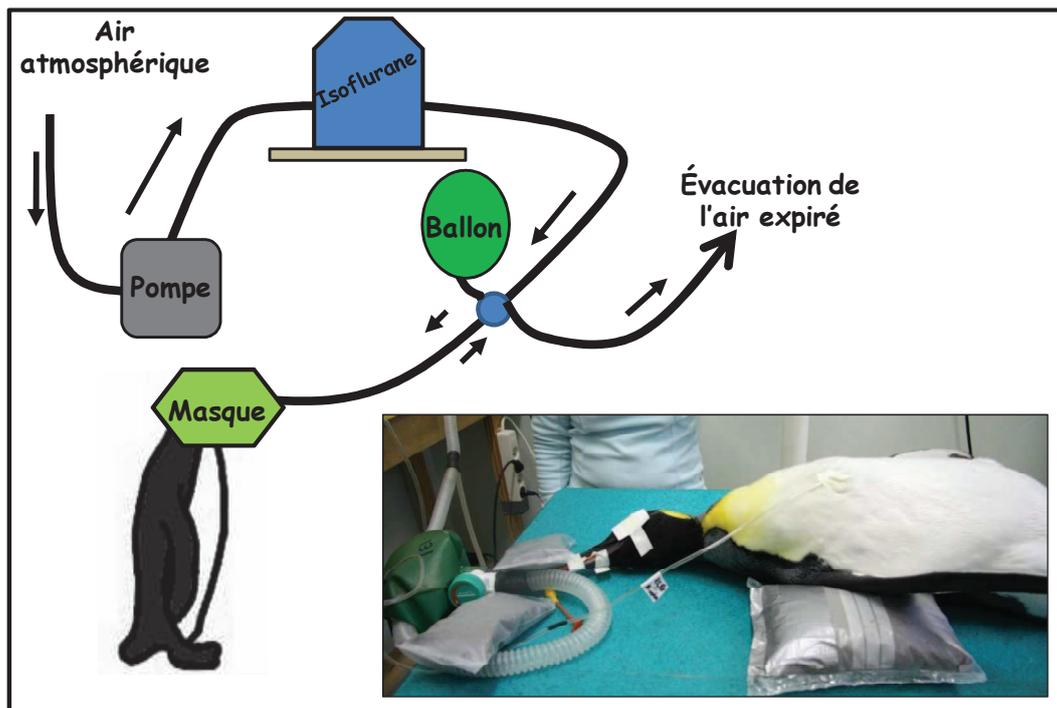


Figure 2 6 : illustration schématique du système d'anesthésie gazeuse. La tête du manchot était recouverte d'un masque étanche grâce auquel l'oiseau inhalait le mélange d'air atmosphérique et d'isoflurane. Une fois l'anesthésie induite, le manchot était placé sur la table d'opération et intubé. Une personne restait près du distributeur et une autre personne vérifiait les constantes (cardiaque et ventilatoire) du manchot.

2. Chirurgie (d'après *Falhman et al., 2005*)

Avant de commencer la chirurgie, un myorelaxant anticholinergique muscarinique (Robinul V, 0,01 mg/Kg, Vétoquinol, France) est injecté en intra musculaire au manchot. La zone stérile est alors préparée : une zone d'environ 2 cm² est entièrement déplumée et nettoyée abondamment avec de l'alcool et de la Bétadine. Un champ stérile est disposé sur l'animal.

Une incision de 2 cm était pratiquée au niveau du tiers supérieur du muscle pectoral. Et un prélèvement de 100 mg était effectué pour être utilisé plus tard en biologie moléculaire.

La plaie était suturée avec du fil de suture résorbable (Vicryl 3.0, Ethicon, France) par des points simples.

Une fois la suture terminée, la plaie était recouverte d'une fine couche d'aluminium antiseptique (Alumisol, Ceva santé animale, France) pour faciliter la cicatrisation. Avant le réveil de l'oiseau, un anti-inflammatoire (Ketoprofène, 2mg/kg, Profenid 50mg/mL, Adventis, France) et un antibiotique (Oxytrétracycline 5%, Vétoquinol, France) étaient administrés.

L'oiseau était porté dans un endroit calme pour le réveil et était gardé en observation pendant 2 jours sur base, avant d'être relâché en bord de plage.

IV. Etude biochimique

1. Sacrifice et prélèvement des tissus

Les canetons sont sacrifiés à jeun (pendant 12h) par décapitation à 5 semaines (\pm 4 jours), au nombre de 2 par jour pour éviter une trop grande différence d'âge. Les deux muscles gastrocnémiens internes de chaque caneton sont immédiatement prélevés et conservés dans du tampon d'isolement approprié (100 mM sucrose, 50mM KCl, 5 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl à pH 7,4) à 4°C.

2. Isolement des mitochondries de muscle squelettique (gastrocnémien interne) par centrifugation différentielle

La technique de centrifugation différentielle est couramment utilisée au laboratoire et a été adaptée pour le canard par **Barré et al., 1986a**.

Après avoir été finement émincés aux ciseaux dans du tampon d'isolement, les tissus musculaires sont ensuite homogénéisés par potterisation (5 passages successifs) dans 10 mL de milieu d'isolement/g de tissu.

Les homogénats subissent ensuite une première centrifugation à 800 g pendant 10 minutes à 4°C (Ultracentrifugeuse modèle L3 70, Beckman Coulter, USA)

A la suite de cette centrifugation, le surnageant (contenant les mitochondries subsarcolemmales) est écarté, le culot (contenant les mitochondries intermyofibrillaires) est récupéré et resuspendu dans 40 mL de milieu d'isolement. Une protéase (nagarse, 1 mg/g de tissu) permettant de digérer les myofibrilles pour libérer les mitochondries est ajoutée dans le milieu. 5 minutes après, un volume équivalent (40 mL) de milieu d'isolement est rajouté pour diminuer l'activité de la réaction enzymatique.

Une seconde potterisation permet la libération des mitochondries contenues dans les myofibrilles. Cet homogénat est centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes.

Le surnageant obtenu est ensuite filtré et centrifugé à 8700 g pendant 10 minutes.

Le culot contenant les mitochondries est resuspendu dans 10 mL de milieu d'isolement et subit une seconde centrifugation à 8700 g pendant 10 minutes.

Cette étape est répétée une seconde fois puis le culot obtenu est resuspendu dans 500 μ L de milieu d'isolement [**Figure 2.7**].

La concentration en protéines mitochondriales contenues dans les 500 μ L finaux, est dosée par la méthode du Biuret : 20 μ L de suspension sont dilués dans 160 μ L de milieu d'isolement, 20 μ L de désoxycholate de sodium à 3% et 800 μ L de réactif de Biuret.

Les échantillons sont incubés 30 minutes à température ambiante et sont ensuite lus au spectrophotomètre à 540 nm.

Une gamme étalon effectuée par le dosage d'une solution d'albumine bovine sérique (BSA) 10% permet de déterminer la quantité de protéines mitochondriales exprimée en mg/mL.

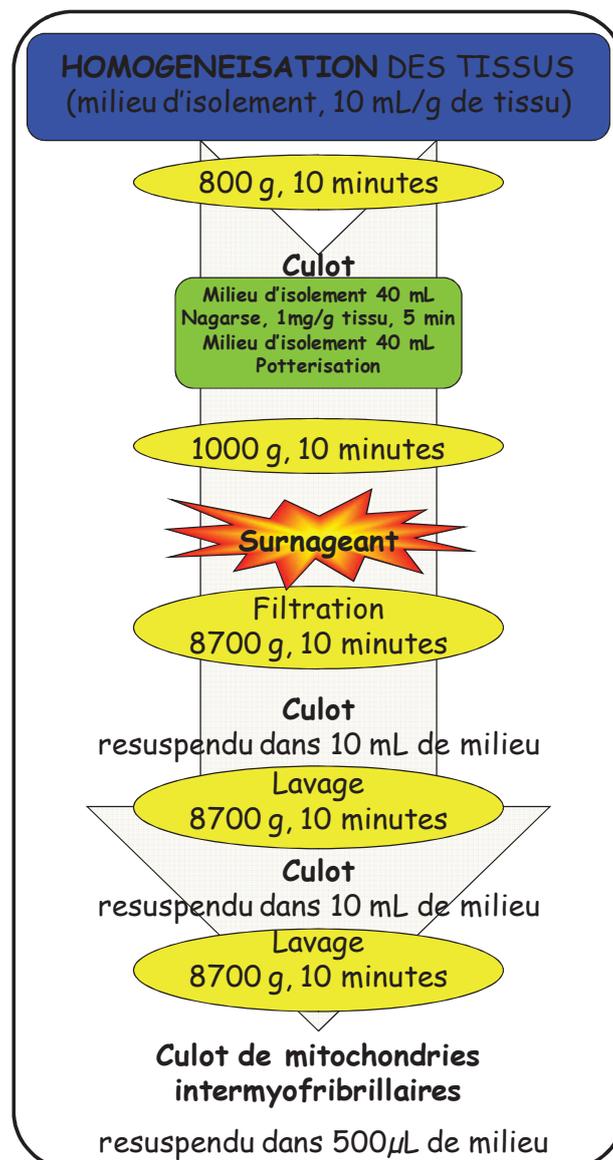


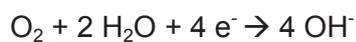
Figure 2.7 : Protocole d'extraction des mitochondries musculaires intermyofibrillaires par centrifugation différentielle. Décrit dans le texte

3. Mesure de respirations mitochondriales

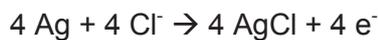
a. Principe de la polarographie

La respiration mitochondriale est mesurée par polarographie, méthode très utilisée au laboratoire qui repose sur une réaction d'oxydo-réduction permettant la mesure en temps réel de la tension partielle d'oxygène dans un milieu donné.

La consommation d'oxygène est donc mesurée par une électrode de Clark (Rank Brothers Ltd, France), composée d'une cathode en platine et d'une anode en argent. L'oxygène présent dans le milieu est réduit selon la réaction suivante au niveau de la cathode :



Et au niveau de l'anode, la réaction d'oxydation correspondante est :



Un faible courant électrique est mesuré entre les 2 électrodes lors de la réaction d'ionisation de l'oxygène. Ce courant est proportionnel à la pression partielle d'O₂ présent dans le milieu.

b. Respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale était mesurée par une électrode de Clark dans une cuve (volume : 1 mL) thermostatée à 38°C. Les mitochondries de muscle (0,3 mg de protéine/mL) étaient incubées dans un milieu respiratoire approprié (120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 3 mM HEPES et 0,3% BSA) à pH 7,4.

La respiration était initiée par l'addition de succinate (5 mM), un substrat entrant au niveau du complexe II de la chaîne respiratoire [**Figure 2.8**], en présence de roténone (5 µM), un inhibiteur du complexe I. La présence de roténone évite un flux inverse des électrons du complexe II vers le complexe I, réduisant ainsi la formation de radicaux libres de l'oxygène, c'est-à-dire une consommation d'O₂ non couplée à la formation du gradient électrochimique de protons.

L'ajout de 500 µM d'ADP, substrat de l'ATP synthase qui entraîne la formation d'ATP à partir d'ADP, induisait une augmentation de la consommation d'O₂, caractérisant l'état 3 de la respiration ou état actif phosphorylant.

L'état 4 respiratoire ou état basal non-phosphorylant caractérisé par une faible consommation d'O₂ était obtenu par ajout d'oligomycine, (2 µg/mL), un puissant inhibiteur de l'ATP synthase.

L'addition d'un découplant, le FCCP (2 µM) permettait de mesurer l'état d'activité maximale de la chaîne respiratoire dans nos conditions de mesure [Figure 2.8].

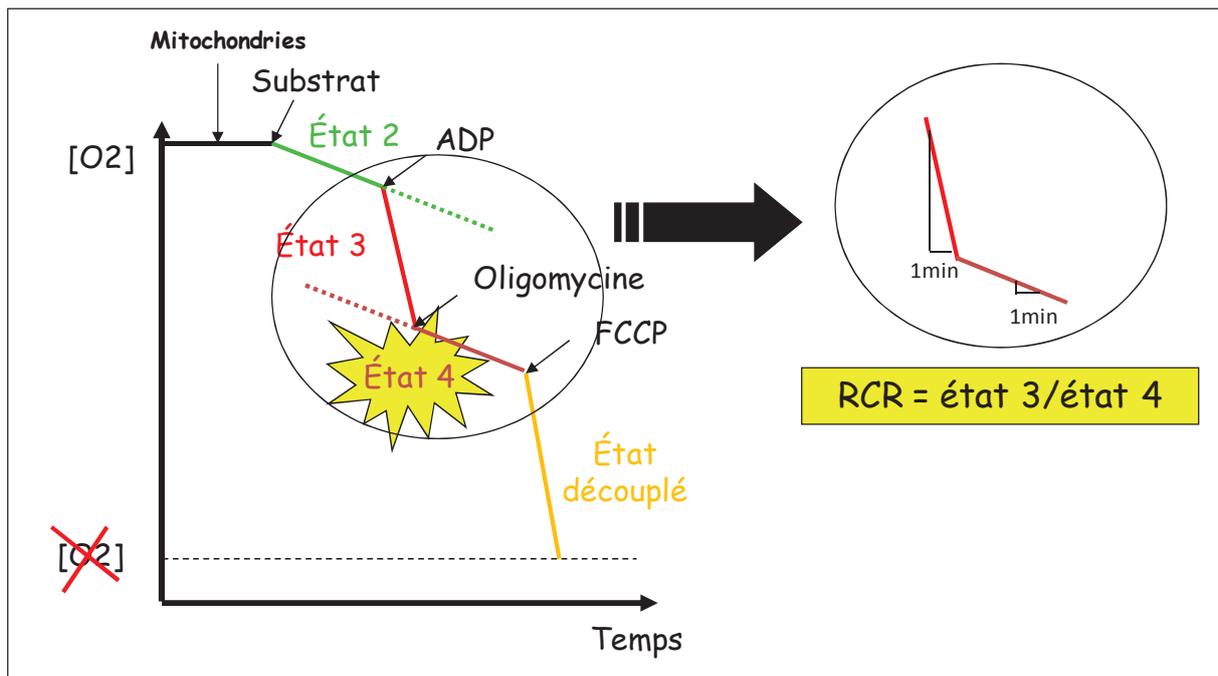


Figure 2.8 : Illustration de la courbe obtenue lors d'une respiration mitochondriale classique et du rapport de contrôle respiratoire (RCR). Protocole détaillé décrit dans le texte.

c. Calcul du RCR (Rapport de Contrôle Respiratoire)

Le RCR est le rapport entre état 3 phosphorylant, induit par la présence d'ADP dans le milieu de respiration et l'état 4 non phosphorylant, obtenu en inhibant l'ATP synthase par ajout d'oligomycine [Figure 2.8]. Ce rapport permet de connaître approximativement le niveau de couplage mitochondrial et donc renseigne sur la qualité du travail d'isolement des mitochondries.

d. Mesure de l'activité de la Cytochrome-c Oxydase.

L'ajout d'ascorbate (2 mM) et de TMPD (0,5 mM), délivrant directement des électrons au cytochrome c, permettait de mesurer de façon isolée l'activité de la cytochrome-c oxydase. La mesure de la consommation d'oxygène associée à l'activité de la cytochrome-c

oxydase était réalisée en présence de myxothiazol (3 μM), un inhibiteur du complexe III, afin d'éviter un flux inverse d'électrons, du cytochrome c vers le complexe III.

4. Mesure du rapport ATP/O

a. Principe

Le principe de cette méthode repose sur 3 réactions enzymatiques [Figure 2.9]. La première est la synthèse d'ATP par l'ATP synthase mitochondriale à partir d'ADP et la deuxième est la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate (G6P), réaction catalysée par l'hexokinase exogène. L'ATP nécessaire à cette réaction provient de la matrice mitochondriale et son transport de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire est assuré par un transporteur particulier : l'ANT en échange d'un ADP.

Une troisième réaction induite par la glucose-6-phosphate deshydrogénase, transforme le G6P en gluconolactone-6-phosphate. Cette réaction utilise comme cofacteur le NAD^+ et produit du $\text{NADH} + \text{H}^+$. C'est le NADH ainsi formé qui va être dosé au spectromètre à 340 nm.

Toutes ces réactions étant équimolaires, le dosage du NADH est le reflet de la production d'ATP mitochondriale.

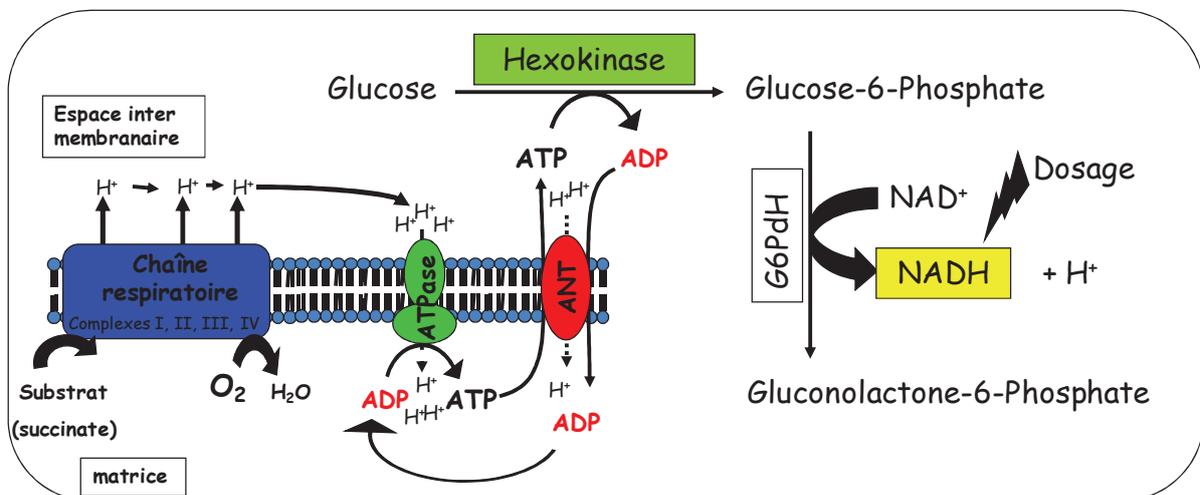


Figure 2.9 : principe de la mesure du rapport ATP/O. La suspension de mitochondries est placée dans une cuve thermostatée en présence de succinate (substrat), glucose et hexokinase. La mesure du rapport ATP/O est basée sur 3 réactions enzymatiques.

- 1) $\text{ADP} + \text{P}_i \xrightarrow{\text{ATP synthase}} \text{ATP}$
 - 2) $\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Glucose-6-Phosphate} + \text{ADP}$
 - 3) $\text{Glucose-6-phosphate} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{G6PDH}} \text{Gluconolactone-6-Phosphate} + \text{NADH} + \text{H}^+$
- C'est ce NADH formé qui est dosé au spectrophotomètre à 340 nm.

ANT : Adénine Nucléotide Translocase ; ATP : adenosine tri-phosphate ; ADP : adenosine 5' di-phosphate ; G6PDH : glucose-6-phosphate deshydrogénase ; NAD^+/NADH : Nicotamide adénine dinucléotide (oxydé/réduit)

b. Protocole

La solution de mitochondries était placée dans une cuve thermostatée à 38°C [**Figure 2.10**] dans un milieu de respiration adéquat (cf précédemment) supplémenté avec du glucose (20 mM), de l'hexokinase (1,5 U/mL), de la roténone (5 μ M) et du succinate (5mM).

L'état III « phosphorylant » était induit par addition de 500 μ M d'ADP.

Après s'être assuré de la stabilité de l'état III pendant 2 minutes, 4 prélèvements de 300 μ L de suspension étaient effectués à 30 secondes d'intervalle et transvasés dans de l'HClO₄ pour stopper les réactions enzymatiques, permettant d'avoir une mesure de la synthèse d'ATP à des temps précis.

Pour chaque concentration d'ADP ajoutée, après centrifugation (5 min à 15000 g) et ajout de KOH pour neutraliser le pH, la production de NADH était dosée par spectrophotométrie permettant d'obtenir au final la production d'ATP.

Le rapport ATP/O est le rapport entre la quantité d'ATP synthétisé et la consommation d'O₂ au cours de l'état III phosphorylant.



Figure 2.10 : **Matériel utilisé lors de l'étude mitochondriale.** L'électrode de Clark est à l'intérieur de la cuve thermostatée reliée à une interface électronique (en bleu). Le tracé est recueilli par une table traçante.

V. Etude moléculaire

1. Technique de RT-PCR

La RT-PCR semi-quantitative permet de déterminer l'abondance relative d'un ARN messager en fonction de celle d'un gène de référence. L'expression du gène de référence ne doit pas varier selon les conditions expérimentales [**Figure 2.11**]

2. Extraction et dosage des ARN totaux

Environ 70 mg de tissu ont été broyés 15 secondes à l'aide d'un ultraturax dans 1 mL d'une solution Trizol (Invitrogen, France). L'extraction des ARNs totaux a été obtenue par séparation de phase (organique et aqueuse), les ARNs étant solubilisés dans la phase aqueuse. La concentration en ARN a été dosée par spectrophotométrie en mesurant la densité optique à 260 nm et leur pureté vérifiée par la mesure du rapport des densités optiques à 260 et 280 nm (supérieur à 1,8). L'absence de dégradation des ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

3. Rétro transcription des ARN messagers et réaction de polymérisation en chaîne

Cette étape permet de synthétiser des ADNc à partir d'ARNm. Pour cela, nous avons utilisé la M-MLV RT (Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (Promega, France) en présence d'oligo(dT) servant d'amorce et permettant la complémentarité avec la queue poly (A) de l'ARNm. En effet, 1 µg d'ARN en présence d'1 µg d'oligo(dT) sont chauffés à 70°C pendant 5 minutes dans un volume final de 17,5 µL. Cette étape permet la déstabilisation des structures secondaires, favorisant ainsi la linéarisation des ARNm. Ensuite, 7,5 µL d'un mélange de RT sont ajoutés à chaque échantillon. Ce mélange est constitué de 5 µL de Tampon M-MLV RT (5X), 20 U de Rnasin Inhibitor, 15 nanomoles de dNTP, 100 U de M-MLV RT. L'ensemble est incubé pendant 1h30 à 42°C, permettant ainsi la transcription inverse, puis pendant 10 min à 70°C, favorisant la dénaturation de l'enzyme.

4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification par PCR des ADNc est réalisée à partir 2,5 μ L de produits de RT obtenus précédemment mélangés à 5 μ L de tampon 10X, 2 μ L de MgCl₂ (25 mM), 2,5 U de Taq Platinum (Invitrogen, France), 1,5 μ L de dNTP (10 mM) et 1,5 μ L d'amorces sens et anti-sens (15 μ M) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), pour un volume final de 47 μ L [Tableau 2.1]. Après une dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min, chaque échantillon subit un nombre de cycles de PCR (n) variable en fonction des cibles. Chaque cycle comprend 1 min à 94°C (dénaturation), 1 min à 60°C (hybridation) et 1 min à 72°C (élongation). Une étape finale de 10 min à 72°C est réalisée pour terminer l'amplification. L'appareil utilisé est un thermocycleur Thermo Hybaid (Ashford, UK). Un mélange de 1,5 μ L d'amorce sens et 1,5 μ L d'amorce antisens de β actine (15 μ M) est ajouté dans chaque tube de façon à ce que cette dernière subisse toujours 22 cycles de PCR. La β actine sert dans ce cas de standard interne à l'échantillon et est utilisée pour quantifier les ARNm cibles de manière semi-quantitative.

Les différents jeux d'amorces ainsi que les nombre (n) de cycles utilisés sont répertoriés dans le tableau suivant.

	Sens (5'→ 3')	Anti-sens (3'→ 5')	taille (bp)	n (cycles)
avUCP	GTG GAT GCC TAC AGG ACC AT	ATG AAC ATC ACC ACG TTC CA	390	26
β actine	GAC GAG GCC CAG AGC AAG AGA	GGG TGT TGA AGG TCT CAA ACA	225	22

Tableau 2.1 : Séquence des amorces utilisées en RT PCR. Technique expliquée dans le texte

5. Analyse des produits PCR

L'analyse des produits de RT-PCR est faite par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium. Après migration à 70 V pendant 30 min, les produits séparés sont visualisés sous UV et le gel est photographié à l'aide d'un système d'analyse d'images Kodak Digital Science™ camera (DC120) qui permet de mesurer l'intensité lumineuse des bandes. L'analyse semi-quantitative de l'expression du gène cible est déterminée par le calcul du rapport entre l'intensité de la bande du gène cible et celle de la β actine.

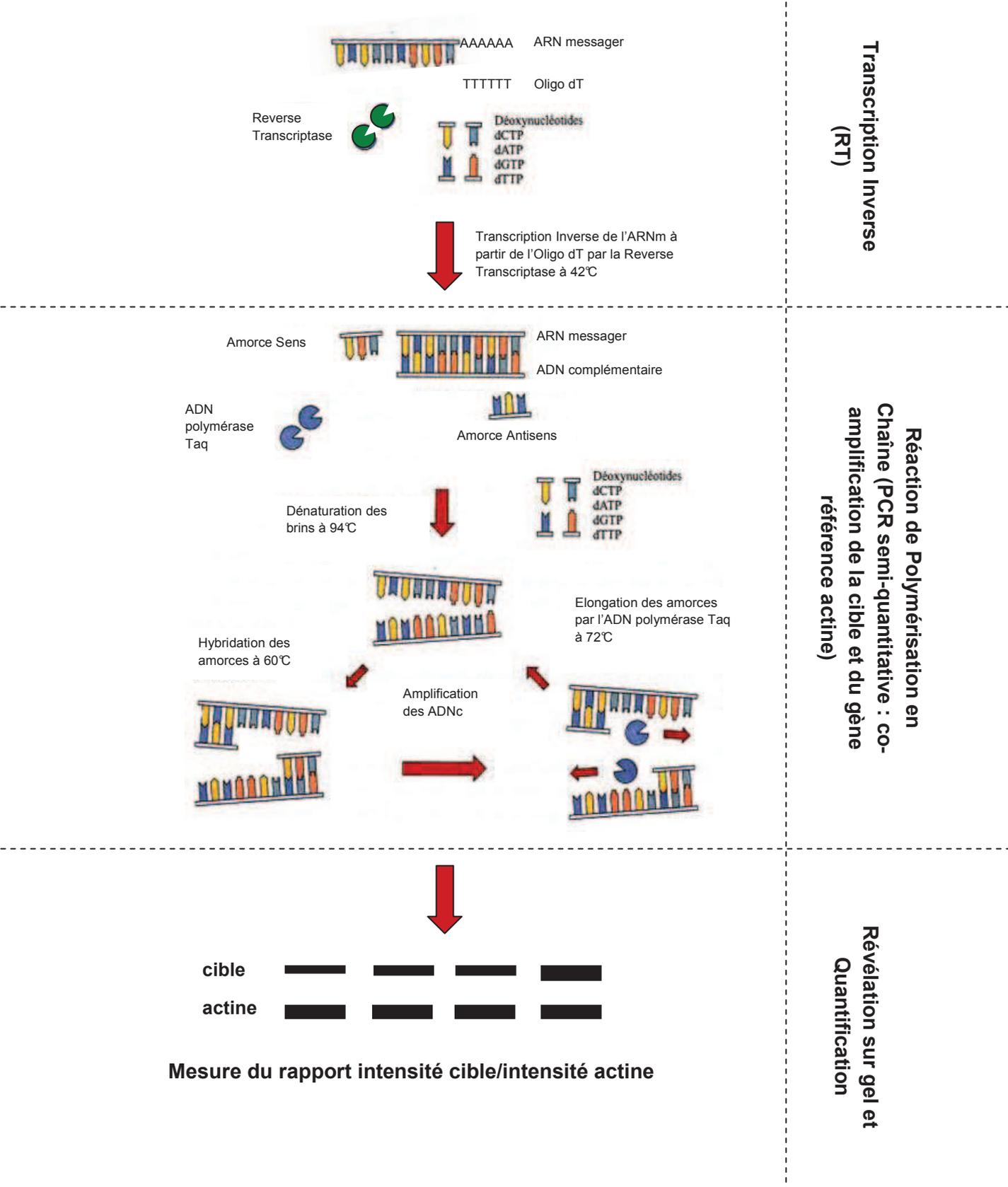


Figure 2.11 : Principe de la RT-PCR semi-quantitative (en rapport à l'actine) et de la quantification sur gel d'agarose

VI. Etude statistique

Nos résultats ont été exprimés par la moyenne \pm S.E.M. (Erreur standard à la moyenne). Les groupes ont été généralement comparés par analyses de variance (ANOVA) suivies de test t de Student pour les comparaisons de moyennes. Si ce n'est pas le cas, les tests utilisés sont précisés dans la légende des figures. Nous avons utilisé les logiciels Statview® et JMP7® pour les études statistiques.

Troisième partie

Etudes expérimentales

Etude 1

La thermogenèse sans frisson induite par une acclimatation au froid est associée à une augmentation de l'expression de l'UCP aviaire sans altération du rapport ATP/O.

(Publiée)

RESUME DE L'ETUDE N° 1

La thermogenèse sans frisson induite par une acclimatation au froid est associée à une augmentation de l'expression de l'UCP aviaire sans altération du rapport ATP/O.

Publiée dans *The Journal of Experimental Biology*, juillet 2010, volume 213 (DOI : 10.1242/jeb.043489) sous le titre original :

Cold-acclimation-induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency

Comme il a été explicité dans les rappels bibliographiques et ce, malgré les différentes thèses soutenues sur ce sujet ces dernières années, le ou les rôles physiologiques de la protéine découplante UCP aviaire, découverte chez les oiseaux au début des années 2000 (**Raimbault et al., 2001**) restent encore à démontrer. Plusieurs rôles potentiels ont été décrits, notamment un rôle thermogène. En effet, contrairement aux mammifères qui possèdent un tissu thermogène spécifique lié à l'activité de la protéine découplante UCP1 (**Cannon et al., 2004**), les oiseaux développent des mécanismes thermogènes d'origine musculaire. Bien qu'encore controversée de nos jours, une capacité de thermogenèse sans frisson (NST pour *Non Shivering Thermogenesis*) a été clairement mise en évidence chez certains oiseaux, notamment le canard de Barbarie en croissance (**Barré et al., 1985**). Par analogie fonctionnelle avec l'UCP1, l'UCP aviaire pourrait donc jouer un rôle dans ce mécanisme de NST musculaire.

Au cours de ce premier travail, nous avons donc cherché par une approche intégrée, à caractériser l'implication de l'UCP aviaire dans les processus thermogènes sans frisson chez le caneton de Barbarie soumis à un stress thermique d'intensités variable.

Méthodes

Animaux

Trois groupes de canetons de Barbarie mâles (pédigrée R31, INRA) ont été utilisés au cours de cette étude. Le premier était élevé à thermoneutralité (25°C, TN) et les deux autres étaient acclimatés à des températures ambiantes froides (11°C, CA11 et 4°C, CA4) pendant 4 semaines. Ils étaient exposés à une photopériode hivernale (8h jour/ 16h nuit) et avaient accès à la nourriture et à l'eau de boisson de façon *ad libitum*.

Principales méthodes utilisées

Mesure du métabolisme par calorimétrie indirecte et enregistrement du frisson

Le caneton était installé dans une chambre métabolique thermorégulée et son métabolisme *in vivo* était évalué par calorimétrie indirecte à partir de l'analyse des gaz (O₂ consommé et CO₂ produit) expirés. La température ambiante diminuait progressivement par palier pour obtenir une courbe de thermogénèse. L'activité électromyographique était enregistrée pour chaque palier de température ambiante grâce à des électrodes implantées dans le muscle gastrocnémien du caneton.

Respiration et rendement mitochondrial

Après euthanasie, le muscle gastrocnémien était prélevé et broyé à l'aide d'un potter. Les mitochondries étaient isolées par centrifugation différentielle. Ensuite l'étude mitochondriale (respiration classique et rapport ATP/O) a été réalisée par polarographie avec une électrode de Clark.

Biologie moléculaire

L'abondance relative de l'ARN codant l'UCP aviaire au niveau musculaire a été obtenue par RT-PCR semi quantitative, c'est-à-dire par rapport à l'expression d'un gène de référence, ici la β -actine.

Principaux résultats et conclusion

Nos résultats ont tout d'abord montré la capacité des canetons de Barbarie à ajuster leur thermogénèse sans frisson en fonction de la température ambiante à laquelle ils étaient élevés. Cette variation de production de chaleur est accompagnée d'une augmentation de l'abondance relative au niveau musculaire de l'UCP aviaire. Ensuite, nous avons étudié la fonctionnalité de cette UCP au niveau mitochondrial. Les résultats obtenus ne montrent pas de découplage des réactions d'oxydation-phosphorylation en l'absence d'activateurs des UCPs mais il semble que les capacités oxydatives et phosphorylantes augmentent avec l'intensité du froid auquel les oiseaux sont soumis.

Cold acclimation induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency

Loïc Teulier, Jean-Louis Rouanet, Dominique Letexier, Caroline Romestaing, Maud Belouze, Benjamin Rey, Claude Duchamp, Damien Roussel*

Université de Lyon, CNRS, UMR5123, Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, F-69622 Villeurbanne, France

***Corresponding author:** Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, CNRS UMR 5123, UCBLyon1, 43 Bld 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne cedex, France.
Tel.: +33 472 43 16 64; fax: +33 472 43 11 72. E-mail address: damroussel@yahoo.fr

Short title: AvUCP and cold-induced heat production

Key words: uncoupling protein, mitochondria, skeletal muscle, cold

SUMMARY

Despite their lack of brown adipose tissue, some bird species develop regulatory non-shivering thermogenesis (NST) of skeletal muscle origin in response to cold acclimation. Mechanisms involved in avian NST are still unclear but may involve reduced energetic coupling in skeletal muscle mitochondria through the expression of an avian homolog of mammalian uncoupling proteins. The aim of this work was to investigate whether the expression of avian uncoupling protein (avUCP) would correlate with the capacity for cold-induced muscle NST. Various levels of cold acclimation were obtained by rearing 1-wk old ducklings (*Cairina moschata*) for 4 weeks at three different ambient temperatures (25°C, 11°C or 4°C). Muscle NST was measured by simultaneous recordings of metabolic rate and electromyographic activity (*gastrocnemius* muscle) at ambient temperatures ranging from 27°C to -5°C. The expression of avUCP gene and mitochondrial bioenergetics were also determined in *gastrocnemius* muscle. Results showed that muscle NST capacity depends on the ambient temperature at which ducklings were acclimated, the lower the rearing temperature, the higher the capacity for NST. This increased metabolic heat production occurred in parallel with an upregulation of avUCP, which was not associated with a change in mitochondrial membrane conductance. The intensity of mitochondrial oxidative phosphorylation also increased in proportion with the harshness of cold, while the efficiency of ATP generation was equally effective in all three acclimation temperatures. In the absence of mitochondrial uncoupling, these data indicate a clear link between avian UCP expression and the capacity of ducklings to adjust their muscular aerobic activity to cold exposure.

INTRODUCTION

With the exception of some species, which become torpid in the cold, most birds maintain a relatively constant and high body temperature in a wide variety of habitats and over a wide range of environmental temperatures. Such ability to survive in the cold depends on a combination of behavioral, thermal insulation and production of metabolic heat (Chaffee and Roberts, 1971). Although shivering thermogenesis was long thought to be the main thermogenic mechanism in birds, it remains that the survival of some avian species also depends on their ability to develop non-shivering thermogenesis (NST) when chronically exposed to cold (Hissa, 1988; Duchamp et al., 1999).

In the absence of both mammalian thermogenic brown adipose tissue and UCP1 in birds (Johnston, 1971; Barré et al., 1986), there are some evidences that mitochondrial loose-coupling might contribute to cold-induced heat production in skeletal muscle (Skulachev and Maslov, 1960; Duchamp et al., 1992; Roussel et al., 1998), the major tissue contributing to 70% of the observed NST in cold-acclimated ducklings (Duchamp and Barré, 1993). This mitochondrial mechanism has recently gained molecular support from the identification of a functional homologue of mammalian UCP3 in avian skeletal muscles (Raimbault et al., 2001; Vianna et al., 2001; Talbot et al., 2003). This avian UCP mRNA expression was found up-regulated after long term cold exposure in birds (Raimbault et al., 2001; Toyomizu et al., 2002; Collin et al., 2003a) and its activity was increased after cold water adaptation in penguins (Talbot et al.,

2004). In contrast, the levels of avian UCP mRNA remained at baseline following short-term cold exposure (Raimbault et al., 2001; Ueda et al., 2005; Mujahid et al., 2005), when shivering thermogenesis is the main thermogenic mechanism. Interestingly, two independent studies provided data, although scarce, suggesting that the expression of avian UCP may depend upon the intensity of the cold temperature at which birds were reared (Collin et al., 2003a; Ueda et al., 2005).

However, a metabolic analysis at the bird level and at the mitochondrial level was not reported in those studies. Therefore, the question remains whether the cold-induced up-regulation of the avian UCP gene in skeletal muscles correlates with the capacity of NST in cold-acclimated birds. In order to generate such data, we acclimated male muscovy ducklings to different cold ambient temperatures. Then, we measured NST capacity in whole birds, as well as avian UCP gene expression and mitochondrial ATP efficiency and membrane potential in skeletal muscle.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male muscovy ducklings (*Cairina moschata*, pedigree R31, Institut National de la Recherche Agronomique, France) were obtained from a commercial stockbreeder (Eclouerie Primaud-lacorbière, France). Birds were fed ad libitum with commercial mash (Moulin Uenard, 645 g DM/kg) and had free access to water. From the age of 10 days, ducklings were caged for a period of 26 days at either 4°C, 11°C or 25°C (thermoneutral temperature) in a constant

photoperiod (light-dark : 8:16). Body weight was recorded daily, between 9.30 AM and 11.30 AM. The present investigation was conducted in accordance with the guiding principles of the French Department of Animal and Environmental Protection for the care and use of laboratory animals.

Metabolic rate

Metabolic rate was measured by indirect calorimetry. We used an open-circuit system as already used in ducklings (**Barré et al., 1985**). Ducklings were fasted overnight prior to be positioned in a thermostatic chamber ventilated by a constant atmospheric airflow (0.5 m³). Variable heat loss by conduction on the ground was minimized by a polypropylene bed. Ambient temperature (T_a) were controlled and measured with copper-constantan thermocouples inside the thermostatic chamber. Air flow rates (14 L·min) were measured using a Platon volumeter, and converted to standard values (STPD). The fractional concentrations of oxygen were measured using a Servomex 1100 paramagnetic gas analyzer (Taylor Instrument Analytics Ltd, Sussex, UK). Carbon dioxide concentrations were measured using a Servomex 1400 infrared gas analyzer. The O₂ analyser was calibrated with pure nitrogen gas and atmospheric air assuming oxygen content of 20.93%. The CO₂ analyser was calibrated with pure nitrogen gas and a known mixture of 5.2% CO₂. The rates of O₂ consumption and CO₂ production were calculated according to the equation of Depocas and Hart (1957). The caloric equivalent for O₂ was determined from the respiratory quotient using Lusk tables (1924).

Shivering

Shivering was measured as integrated electromyogram (EMG) activity of the gastrocnemius leg muscle. EMG was recorded using three monopolar electrodes insulated except for the tips (Stabilohm 110, Ni 800 and Cr 200, 1.2 mm diameter) acutely inserted into the muscle 1 mm apart. The EMG signal was collected by an acquisition interface (MP30B-CE, Biopac System Inc., Santa Barbara, USA) and integrated with Biopac Student Lab Pro v.3.6.7 software. Measurement of the integrated signal value was made at rest over long periods of 15 minutes. Portions of those integrated recordings in which artefacts were due to occasional movements of duckling were eliminated by simultaneous monitoring of the bird using a webcam.

Non-shivering thermogenesis

Non-shivering thermogenesis was assessed by the simultaneous measurement of MR and EMG at constant T_a ranging from 27 to -5°C. MR and EMG were determined in overnight fasted ducklings over 30 min that followed an initial 60 min adjustment period to obtain metabolic steady state and thermal equilibrium at a given ambient temperature. From these relations, a lower critical temperature (LCT) and a shivering threshold temperature (STT) were determined as the T_a below which the metabolic rate and the muscle electrical activity elicited a significant increase, respectively. The NST is given by the metabolic rate in the cold, not yet accompanied by shivering activity. Hence, the activity of NST was calculated as the level of metabolic rate determined at the STT temperature minus the RMR.

Mitochondrial isolation

Ducklings were fasted overnight prior to being killed by decapitation. Skeletal muscle mitochondria were isolated in an ice-cold isolation buffer containing 100 mM sucrose, 50 mM KCl , 5 mM EDTA, 50 mM Tris-base, and pH 7.4 at 4°C (Roussel et al., 2000). Briefly, gastrocnemius muscle was rapidly dissected and cut up finely with sharp scissors and diluted 1:1 (w/v) in isolation medium. The minced tissue was homogenized with a potter-Elvehjem homogenizer (five passages) and centrifuged at 800g for 1 min. The pellet was suspended in 4 mL of isolation buffer and was treated with protease (1 mg/g muscle wet weight) for 5 min in an ice bath. The muscle mixture was diluted 1:2, homogenized with a potter-Elvehjem homogenizer (three passages) and centrifuged at 1,000g for 1 min. The supernatant containing muscle mitochondria was collected, filtered through cheesecloth and centrifuged at 8,700g for 1 min. The resulting pellet was washed twice by suspension in the isolation buffer and centrifuged at 8,700g for 1 min. All steps were carried out at 4°C. The protein concentration of mitochondrial suspensions was determined by a biuret method with bovine serum albumin as standard.

Mitochondrial respiratory parameters and membrane potential

Oxygen consumption was measured with a Clark oxygen electrode (Rank Brothers Ltd, France), in a closed and stirred glass cell of 1 mL volume, thermostated at 38°C. While the body temperature of ducklings is 4°C (Barré et al., 1985), we made the choice to

performed all the respiration measurements at 38°C in order to generate data comparable with those recently reported in other avian species, especially penguins (Talbot et al., 2003, 2004; Rey et al., 2008) and chicken (Ueda et al., 2005; Toyomizu et al., 2002). Muscle mitochondria (3 mg of protein/mL) were incubated in a respiratory buffer containing 120 mM KCl , 5 mM Mg_2P_4 , 1 mM EDTA, 2 mM MgCl_2 , 30 bovine serum albumin (w/v) and 3 mM EPES, pH 7.4. Substrate concentrations were 5 mM succinate plus 5 μM rotenone. The active state of respiration (state 3) was initiated by the addition of 50 μM ADP. The basal non-phosphorylating respiration rate (state 4oligo) was obtained by the addition of 2 $\mu\text{g/mL}$ of oligomycin. The uncoupled state of respiration (state 3unc) was initiated by the addition of 2 μM carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP). Thereafter, myxothiazol (3 μM) was added to fully inhibit succinate supported respiration. Then, ascorbate (2 mM) and N,N,N'-N-tetramethyl-p-phenylenediamine (50 μM) were added and the maximal respiration rate associated with isolated cytochrome-c oxidase activity recorded. The respiratory control ratio (RCR) refers to the ratio of oxygen consumed after adding ADP to that consumed in the presence of oligomycin.

Membrane potential was measured using electrode sensitive to the potential-dependent probe triphenylmethylphosphonium (TPMP^+). Mitochondria (3 mg/mL) were suspended in 2 mL respiratory buffer supplemented with rotenone (5 μM), oligomycin (2 $\mu\text{g/mL}$) and nigericin (60 ng/mL). The electrode was calibrated by sequential 5 μM additions up to 2 μM TPMP^+ , then 5 mM succinate was added to start the

reaction. 2 μM FCCP was added at the end of measurement to dissipate the membrane potential and release all TPMP back into the medium for baseline correction. Membrane potentials were calculated as previously described by Brand (1995), assuming a TPMP binding correction of $0.35(\mu\text{L}\cdot\text{mg protein})^{-1}$ for skeletal muscle mitochondria (Rolfe et al., 1994).

Mitochondrial ATP synthesis and oxidative phosphorylation efficiency

Oxygen consumption and ATP synthesis rates were performed at 38°C in 1.5 mL respiratory buffer supplemented with glucose (2 mM), hexokinase (1.5 U/mL), rotenone (5 μM) and succinate (5 mM). The mitochondrial ATP synthesis was initiated by the addition of 5 μM , 2 μM , or 5 μM ADP. After recording the phosphorylating respiration rate (state 3) for 2 min, four 3 μL samples of mitochondrial suspension were withdrawn from the suspension every 3 seconds and were quenched in a perchloric acid solution consisting of 1 M ClO_4 and 25 mM EDTA. After centrifugation of the denatured protein (15,000g for 6 min) and neutralization of the resulting supernatant, the ATP production was determined from the glucose-6-phosphate content of samples, which was assayed spectrophotometrically by monitoring the production of NAD^+ in the presence of glucose-6-phosphate dehydrogenase at 340 nm (Lang and Michal, 1974). Briefly, the supernatant was incubated in 1 mL of a reaction buffer consisting of NAD^+ (5 mM), triethanolamine- Cl (5 mM), MgCl_2 (7.5 mM), EDTA (3.75 mM), pH 7.4. The concentration of glucose-6-phosphate was calculated from the difference between the level of NAD^+

measured before and 1 hour after the addition of glucose-6-phosphate dehydrogenase (5 U). The rate of mitochondrial ATP production was calculated from the slope of the linear accumulation of glucose-6-phosphate over the sampling time interval (1.5 min). The linearity of glucose-6-phosphate accumulation allowed us to check that the system was in a steady state.

It is important to note that we made sure that the ATP production rates were specific of the mitochondrial ATP synthase activity, by determining oxygen consumption and ATP synthesis rates in the presence of oligomycin (2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$). Over the range of ADP concentrations used, a non-mitochondrial ATP synthesis activity was measurable at 5 μM of ADP (TN = 57 \pm 6 nmol ATP/min.mg of protein; CA11 = 68 \pm 4 nmol ATP/min.mg of protein; CA4 = 76 \pm 2 nmol ATP/min.mg of protein). Even though, this oligomycin-insensitive ATP synthesis production, presumably associated with adenylate kinase activity, was significantly higher in CA4 ducklings than in TN birds ($P < 0.05$), it represented approximately 1% of total ATP production in each experimental group. These values were taken into account to calculate the rate of mitochondrial ATP synthesis.

PCR analysis

Total RNA were extracted from muscle samples (70mg) using Tri Reagent (Euromedex, France). Concentration and purity were checked by measuring optical density at 260 and 280 nm. Messenger RNA relative abundance was determined by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction using β -actin as an internal standard. For each sample, a RT

was performed from 1 µg of total RNA with 1 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, France), 5 µL of M-MLV RT 5' buffer, 2 U of RNasin Ribonuclease Inhibitor, 12 pmol of deoxynucleoside triphosphate and 1 µg of oligo dT, in a final volume of 25 µL. After chilling, 2.5 µL were used for PCR reactions by adding 47.5 µL of PCR mix containing 5 µL 1x EurobioTaq PCR buffer, 6 pmol MgCl₂, 8 pmol deoxynucleosides triphosphate, 2.5 U Taq Platinum (Invitrogen, France), 22.5 pmol of corresponding antisens (3'-ATG AAC ATC ACC AC- TTC CA-5' for avUCP gene and 3'-TGT TAA A- TCT CAA ACA-5' for β-actin gene) and sense primers (5'-TAT CAT TAC A- ACC AT-3' for avUCP gene and 5'-AC TAA CCA A- CAA A-3' for β-actin gene). The PCR conditions were: 2 min at 94°C followed by 26 and 2 cycles for avUCP and β-actin respectively (1 cycle = 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C). These cycle numbers were chosen after we performed preliminary tests in which a range of cycles (25, 27, 29 and 31 cycles for avUCP and 17, 19, 21, 21 and 23 cycles for β-actin) had confirmed that these conditions were in the exponential phase of PCR and that there was no saturation limitation. PCR was ended by 1 min at 72°C. AvUCP and β-actin products of the three experimental conditions were simultaneously separated on 2% agarose gel prestained with ethidium bromide. Relative bands intensities and the ratio of each target to β-actin were determined with Kodak Digital Science 1D 2.0 software (Kodak Scientific Imaging System).

Statistical analysis

Relations between integrated EM activity and Ta, or metabolic rate and Ta were expressed by two linear regression lines (Scholander et al., 1950; Barré et al., 1985) that intersect at the shivering threshold temperature (STT) or at the lower critical temperature (LCT), respectively. To draw these regression lines, we statistically determined by a paired-ANOVA test at which ambient temperature EM activity or metabolic rate became significantly different from basal values, respectively. These values and those measured at lower ambient temperatures were then integrated in a second linear regression line distinct from the basal linear regression line. Values are means ± s.e.m. When not detailed, the statistical significance of observed variations was assessed using one-way ANOVA. Differences between means were subsequently tested by Sheffe's test.

RESULTS

Body mass and growth rate

Ducklings were weighed every day in order to determine the effect of cold exposure on their growth rate. Long-term cold exposure slowed the growth rate of ducklings (**Fig. 1**) despite an increased food intake in the cold (**Benistant et al., 1998; Chânier et al., 2000**). From day 17, body mass of cold-acclimated (CA) ducklings was significantly less ($P < 0.05$) than that of thermoneutral (TN) ducklings, and the difference between CA and TN ducklings increased with increasing age. Thus, after 26 days of cold exposure at 11°C (CA11) or 4°C, (CA4) body weight was significantly lowered by -15% and -

38% as compared with corresponding control birds.

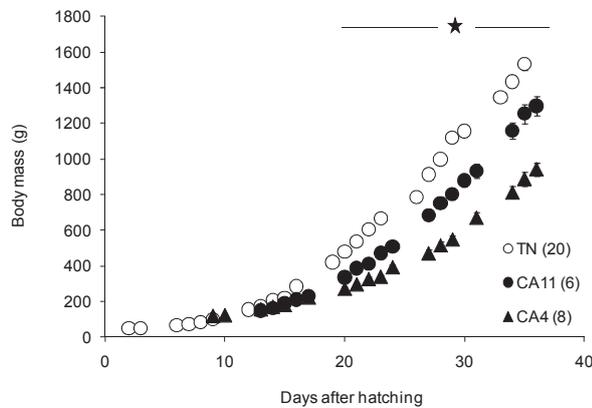


Fig. 1. Effect of cold-acclimation on growth rate in ducklings. From the age of 10 days, thermoneutral control ducklings (TN, open symbols) were reared at 25°C, while cold-acclimated birds (filled symbols) were either reared at 11°C (filled circles) or at 4°C (filled triangles). Values are means \pm s.e.m. for (n) ducklings per group as specified in the graph. * $P < 0.01$, body mass were significantly different between the three groups. When not visible, bar errors are within symbols

Metabolic rate

The relation between metabolic rate and ambient temperature (T_a) was expressed by two linear regression lines that intersect at the lower critical temperature according to **Scholander et al. (1950)**. Below this critical temperature there was a significant linear increase in metabolic rate as ambient temperature decreased (**Fig. 2A-C**). The lower critical temperature (LCT) was significantly decreased in CA4 ducklings as compared with TN birds, and was slightly, but not significantly lowered ($P = 0.3$) in CA11 birds (**Table 1**). In all three experimental groups, metabolic rate remained constant over ambient temperature ranging from 25°C to 27°C. The resting metabolic rate (RMR) was calculated within this temperature range, considered to be in the

thermoneutral zone. RMR was higher in cold-acclimated ducklings (CA11 8.2 ± 0.3 , CA4 7.9 ± 0.5 , $P = 0.05$) than in TN (6.1 ± 0.4) ducklings. When body weight differences are taking into account, the RMR remained significantly higher in CA4 ducklings (**Table 1**). Noted that respiratory quotient values were not significantly different between groups (TN 0.75 ± 0.02 ; CA11 0.76 ± 0.02 ; CA4 0.77 ± 0.01)

Shivering

Integrated EMG activity showed a continuous basal activity of $1 \pm 11 \mu V.s$ in all three duckling groups. EMG activity was significantly increased in the cold from an ambient temperature of 2°C in TN ducklings, 8°C in CA11 ducklings and 0°C in CA4 ducklings (**Fig. 2D-F**). The shivering threshold temperatures (STT) are reported in Table 1. In both cold-acclimated groups, the STT was significantly lower than the LCT (**Table 1**), indicating that within this range of ambient temperatures, regulatory thermogenesis was independent of shivering. Table 1 clearly showed that the capacity for NST was dependent on the harshness of cold, the lower the rearing ambient temperature, the higher the capacity for NST. At the shivering threshold, ducklings acclimated at 11°C or at 4°C displayed a capacity for NST that amounted to 29% and 44% above the resting metabolic rate, respectively.

Avian UCP expression

As shown in **Fig. 3**, the relative abundance of avian UCP transcript in gastrocnemius muscle was significantly higher in cold-acclimated groups (CA11,

+56□, P□□□5 and CA4, +95□, P□□□5)

than in thermoneutral control group.

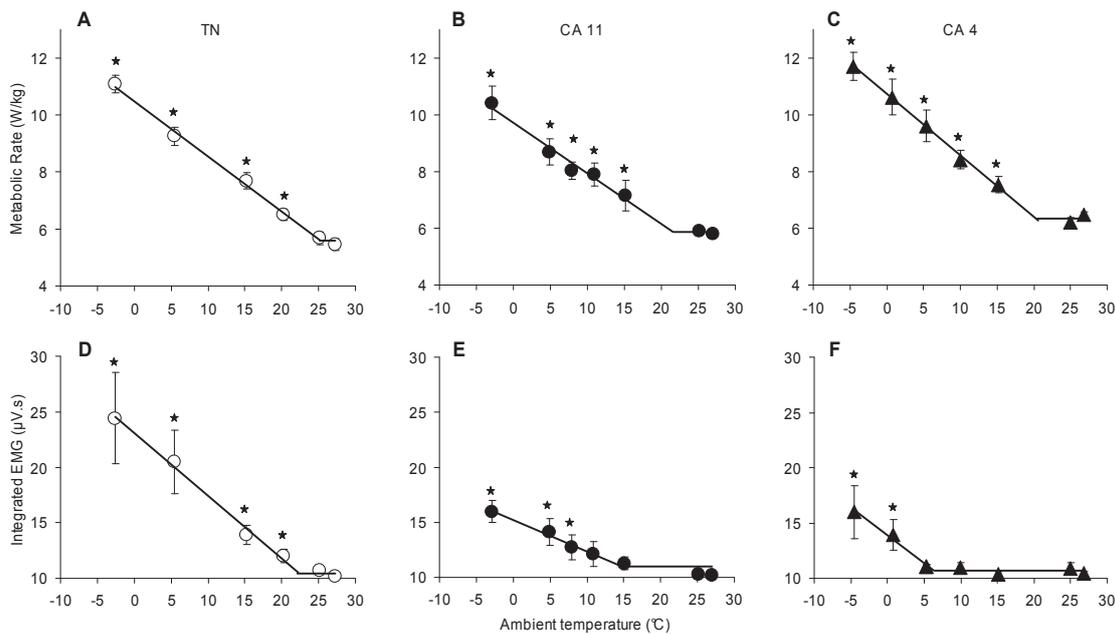


Fig. 2. The relation between whole-animal metabolic rate (MR; W/kg) or integrated muscle electrical activity (EMG; $\mu\text{V}\cdot\text{s}$) and ambient temperature (T_a ; $^\circ\text{C}$) in thermoneutral control ducklings (TN; open symbols) and in birds that were cold-acclimated at 11°C (CA11; filled circles) or 4°C (CA 4; filled triangles). Regression lines for MR versus T_a : A) in TN ducklings in cold T_a : $y = -0.19x + 10.48$ ($R^2 = 0.9943$) and in thermoneutral zone $y = 5.57$ intersect at 25.3°C , the lower critical temperature (LCT); B) in CA11 ducklings in cold T_a $y = -0.18x + 9.72$ ($R^2 = 0.9716$) and in thermoneutral zone $y = 5.85$ intersect at 22.4°C ; C) in CA4 ducklings in cold T_a $y = -0.22x + 10.72$ ($R^2 = 0.99$) and in thermoneutral zone $y = 6.33$ intersect at 19.5°C . Regression lines for integrated EMG activity versus T_a : D) in TN ducklings in cold T_a $y = -0.06x + 2.31$ ($R^2 = 0.99$) intersect basal level line ($y = 1.00$) at 22.9°C , the shivering threshold temperature (STT); E) in CA11 ducklings in cold T_a $y = -0.03x + 1.52$ ($R^2 = 0.9749$) intersect basal level line ($y = 1.10$) at 13.0°C ; E) in CA4 ducklings in cold T_a $y = -0.05x + 1.39$ ($R^2 = 0.98$) intersect basal level line ($y = 1.08$) at 6.0°C . Values are means \pm s.e.m. of 5-8 ducklings per group. * $P < 0.05$ significantly different from values measured in the thermoneutral zone ($T_a = 27^\circ\text{C}$).

Mitochondrial metabolism

Table 2 reports respiratory characteristics of skeletal muscle mitochondria isolated from control or cold-acclimated ducklings. Rates of oxygen consumption during maximal ADP-stimulated (state 3), resting (state 4oligo) and FCCP-induced uncoupled (state 3unc) states were significantly increased by 37□ on average in CA4 ducklings. Interestingly, these rates of oxygen consumption were less affected in CA11 birds. Indeed, FCCP-induced maximal

oxygen consumption rate was 22□ higher in CA11 ducklings than in thermoneutral birds, whereas a slight but not statistically significant 15□ increase ($P \square \square \square 6$) was noted in state 3 respiration. Finally, the state 3-to-state 4oligo ratio (thermoneutral control □5.9 □□5; CA11 □6.3 □□3; CA4 □ 5.9 □ □5) and the maximal oxygen consumption of mitochondrial cytochrome-c oxidase were not significantly altered by cold acclimation (**Table 2**).

Table 1. Effect of cold acclimation upon critical temperatures, resting metabolic rate and non-shivering thermogenic capacity

	Control ducklings		Cold-acclimated ducklings	
	reared at 25°C (n=8)	reared at 11°C (n=5)	reared at 11°C (n=5)	reared at 4°C (n=6)
LCT (°C)	25.3 ± 0.8	22.4 ± 2.5	22.4 ± 2.5	19.5 ± 1.2 *
STT (°C)	22.9 ± 1.6	13.0 ± 1.7 * [□]	13.0 ± 1.7 * [□]	6.0 ± 1.4 * ^{†□}
RMR (ml/kg)	5.6 ± 0.2	5.8 ± 0.3	5.8 ± 0.3	6.3 ± 0.1 *
NST (ml/kg)	0.7 ± 0.2	1.7 ± 0.5 *	1.7 ± 0.5 *	2.8 ± 0.2 * [†]

Values are means ± s.e.m. The number of independent determinations is given into brackets. The lower critical temperature (LCT), the shivering threshold temperature (STT), the resting metabolic rate (RMR) and the rate of non-shivering thermogenesis were measured as described in Materials and methods. * $P < 0.05$, significantly different from TN; † $P < 0.05$, significantly different from CA11; [□] $P < 0.05$, significantly different from LCT within the same group.

In non-phosphorylating conditions, the mitochondrial membrane potential was significantly higher in CA4 ducklings (207 ± 4 mV, $P < 0.05$) than in thermoneutral control (193 ± 4 mV) or CA11 (195 ± 2 mV) birds. This result indicates that the higher rate of resting oxygen consumption (state 4oligo) observed in CA4 ducklings (Table 2) was mainly due to an increase in the oxidation of succinate rather than a change in inner membrane proton conductance.

The relationships between the rates of ATP synthesis and oxygen consumption were linear in muscle mitochondria working at different steady-state rates of ATP production, regardless of experimental group (Fig. 4). In accordance with the respiratory parameters reported above, maximal rates of ATP synthesis and oxygen consumption, the highest points to the right of the linear relations tended to be higher in CA11 ducklings (+22% and +14%, respectively), and significantly ($P < 0.05$) increased in CA4 ducklings (+55% and +41%, respectively) when

compared to thermoneutral birds. However, the mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency (ATP/O) calculated from the ratio between the ATP synthesized and the oxygen consumed during the state 3, in the presence of $5 \mu\text{M}$ ADP (arrows in Fig. 4) were not significantly different between groups, displaying an average value of 1.31 ± 0.03 . This is truly underlined by the fact that relations concerning both cold-acclimated groups were superimposed to that of the thermoneutral group, showing that 26 days of cold exposure did not alter the thermodynamic efficiency of mitochondrial ATP synthesis. Hence, at any given rate of oxygen uptake, between maximal phosphorylating respiration (state 3) and basal non-phosphorylating respiration (state 4), ATP synthesis rate was the same in cold-acclimated and thermoneutral ducklings.

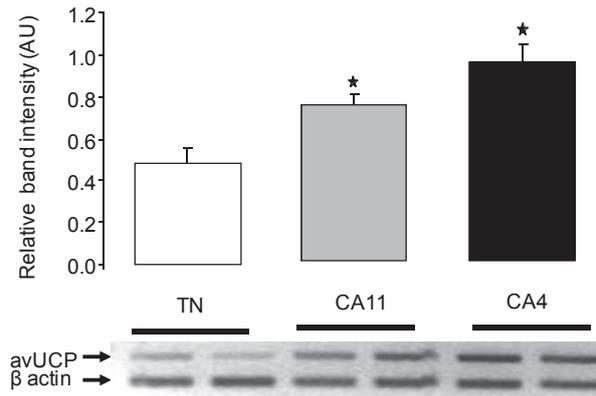


Fig. 3. Relative abundance of avian UCP mRNA in gastrocnemius muscle from thermoneutral control ducklings (white bar), and birds that were cold acclimated at 11°C (gray bar) or 4°C (black bar). Transcript levels were standardized with mRNA level of β -actin gene. Values are expressed in arbitrary units (AU) as means \pm s.e.m. for four independent skeletal muscle preparations. A representative gel is shown. * $P < 0.05$ compared with thermoneutral controls.

Table 2. Respiratory parameters of skeletal muscle mitochondria respiring on succinate.

Mitochondrial oxygen consumption	Control ducklings	Cold-acclimated ducklings	
	reared at 25°C	reared at 11°C	reared at 4°C
State 3	359 \pm 26	414 \pm 24	495 \pm 32 *
State 4	62 \pm 3	66 \pm 2	86 \pm 5 *†
State 3unc	378 \pm 22	459 \pm 24 *	502 \pm 32 *
Cytochrome-c oxidase	1010 \pm 84	1153 \pm 59	1189 \pm 107

Rates of oxygen consumption are expressed in nmol O/min.mg of protein and were measured in isolated muscle mitochondria in the presence of 5 mM succinate plus 5 μ M rotenone as described in Materials and methods. State 3, ADP-stimulated respiration measured in the presence of 500 μ M ADP; state 4, basal non-phosphorylating respiration measured in the presence of 2 μ g/mL oligomycin; State 3unc, FCCP-induced maximal respiration measured in the presence of 2 μ M, cytochrome-c oxidase, oxygen consumption measured with 2 mM ascorbate/0.5 mM TMPD in the presence of oligomycin, 3 μ M myxothiazol and FCCP. Values are means \pm s.e.m. for 6 animals per group. * $P < 0.05$ significantly different from control conditions. † $P < 0.05$ significantly different from 11°C cold-acclimated ducklings.

DISCUSSION

The current work clearly indicates that the capacity for NST depends on the ambient temperature at which ducklings were acclimated. This increase in metabolic heat production was paralleled by an upregulation of avian UCP, linking the expression of skeletal muscle avian UCP with the capacity for non-shivering heat production. In support of this data, two independent studies have previously

reported that after 7 days, avian UCP mRNA levels was 20% or 60% increased in chickens reared at 20°C (Collin et al., 2003a) or 4°C (Ueda et al., 2005), respectively. In the former study, cold-induced over-expression of avian UCP in skeletal muscle was associated with a concomitant increase in mass-specific metabolic rate of the birds. In addition, the expression of avian UCP was also up-

regulated in chronically glucagon-treated ducklings (Raimbault et al., 2001), an avian model showing increased NST (Barré et al., 1987). Altogether, these results would sustain the early hypothesis regarding the function of avian UCP that this protein is involved in the regulation of adaptative muscle thermogenesis (Raimbault et al., 2001).

Avian UCP belongs to the UCP class of the mitochondrial transporter family, in which UCP1, the prime UCP discovered some 30 years ago, is clearly involved in mammalian brown adipose tissue NST. As its homologous mammalian uncoupling proteins (Echtay et al., 2002), avian UCP increases mitochondrial inner membrane conductance when activated in native mitochondria (Talbot et al., 2003) or ectopically expressed in yeast (Vianna et al., 2001; Criscuolo et al., 2005). This uncoupling activity suggests that avian UCP may have a physiological thermogenic activity through the regulation of the efficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation. The oxidative phosphorylation represents the biochemical process that couples the transfer of electrons from substrates to oxygen with the production of ATP, the main form of useable energy that organisms can allocate to fitness-related entities including maintenance, growth, reproduction, foraging and ultimately survival. The energy released when electrons are passed down the respiratory chain is used to pump protons across the membrane, creating an electrochemical proton gradient that is then used by ATP synthase to synthesise ATP. By increasing membrane proton conductance, avian UCP should decrease the efficiency of oxidative phosphorylation process, thereby diverting the energy from

ATP synthesis to thermogenesis. In line with this idea, avian UCP level increased in situation where energy efficiency is decreased such as in triiodothyronine-treated chicken (Collin et al., 2003b), whereas it was reported decreased in hypothyroid chickens (Collin et al., 2003b) or in long-term fasted penguins (Rey et al., 2008) when energy efficiency would increase. Interestingly, a chicken line selected for its low efficiency of food utilization for growth displayed a higher level of avian UCP mRNA in their skeletal muscle than a chicken line divergently selected for its high food efficiency (Raimbault et al., 2001; Ojano-Dirain et al., 2007).

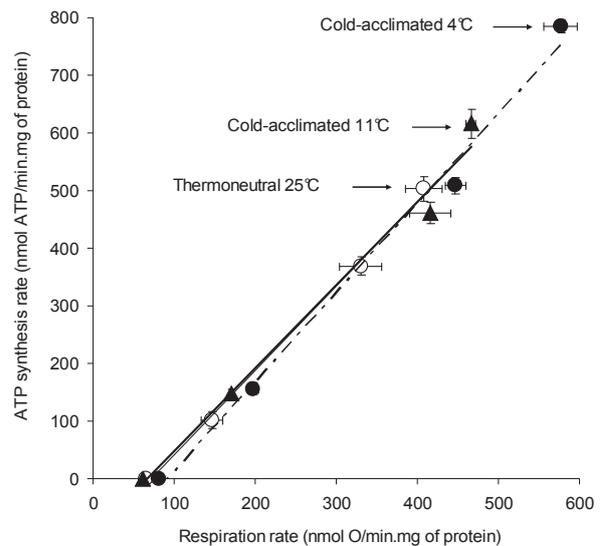


Fig. 4. Effect of cold acclimation on oxidative phosphorylation efficiency. The skeletal muscle mitochondria from thermoneutral control (open symbols) or cold-acclimated ducklings (closed symbols) were incubated in respiratory buffer supplemented with 20 mM glucose, 1.5 U/mL hexokinase, 5 mM succinate and 5 μ M rotenone as described in Materials and Methods. Oxygen consumption and ATP synthesis rates were measured in the presence of increasing concentrations of ADP (from 0 to 500 μ M). Values are means \pm s.e.m. of six independent preparations.

However, there are some arguments raising some doubts about such physiological thermogenic function of avian UCP. From a molecular point of view it appears that by virtue of its high sequence homology (~ 70%) and its mRNA expression in skeletal muscles (Raimbault et al., 2001; Vianna et al., 2001; Talbot et al., 2003), avian UCP closely resembles mammalian UCP3, the biological function of which is clearly not heat production. From a cellular point of view, heterologous expression of UCP3 in yeast can induce a mitochondrial uncoupling phenotype that is mainly an artifact, being neither inhibited by nucleotides nor activated by the known activators fatty acids and superoxide (Harper et al., 2002). In this condition, uncoupling data reported in yeast expressing avian UCP might be interpreted with caution (Vianna et al., 2001; Criscuolo et al., 2005). From a biochemical point of view, avian UCP clearly displays a purine nucleotide-sensitive uncoupling activity in non-phosphorylating mitochondria (Talbot et al., 2003). However, like the mammalian UCPs (Echtay et al., 2002), avian UCP requires activation by superoxide before its proton conductance can be seen (Talbot et al., 2003), which suggests that avian UCP would not be activated in phosphorylating mitochondria, when ATP is synthesized and superoxide production largely decreased. This is in accordance with previous results showing an increased ATP production in fully phosphorylating active skeletal muscle mitochondria (in the presence of high concentration of adenine nucleotides) isolated from cold-acclimated ducklings (Roussel et al., 1998). Nonetheless, it is obvious that the proton leak reactions and the ATP synthase

compete for the same driving force. Hence, the question arises whether the avian UCP-induced proton conductance would significantly increase under submaximal activity of mitochondria, when flux through the ATP synthase decreases. To test this hypothesis, we measured oxygen consumption and ATP synthesis at submaximal oxidative phosphorylation rates. In our experimental conditions, we found no alteration of the energetic efficiency of skeletal muscle mitochondria (Figure 4). Hence, avian UCP may not be involved in heat production through mitochondrial uncoupling, like the mammalian UCP1 in brown adipose tissue. Nevertheless, histochemical arguments have previously suggested that muscle mitochondria were loose-coupled in situ in all fibers of cold-acclimated ducklings (Duchamp et al., 1992). Therefore we cannot rule out that intracellular components (pH, fatty acids, reactive oxygen species) might change during cold exposure and ultimately activate the avian uncoupling protein within cells. This hypothesis will require further investigation.

The present study shows that the intensity of mitochondrial oxidative phosphorylation rate increased in proportion with the harshness of cold at which ducklings were exposed, while the coupling efficiency and the innate membrane conductance of mitochondria remained unaffected. Hence, skeletal muscle NST would rather be sustained either by increasing ATP breakdown through the futile cycling of calcium across the reticulum sarcoplasmic membrane for example (Dumontail et al., 1995) or by decreasing mitochondrial ATP efficiency through the oxidation of $\Delta^{\Delta^{\Delta^2}}$ -linked

substrates such as fatty acyl-carnitine (Clerc et al., 2007). The latter hypothesis would link avian UCP gene expression with the mobilization of fat reserves and the increased potential of skeletal muscle to oxidize fatty acid when birds are exposed to low temperatures (Barré et al., 1986; Benistant et al., 1998; Bedu et al., 2002). Further insight, avian UCP can also have a role in the control of radical oxidative species production (Abe et al., 2006; Rey et al., 2010b) when skeletal muscle mitochondria oxidize fatty acids (St Pierre et al., 2002; Seifert et al., 2008). In recent years, increasing evidence suggests that avian UCP seems to be related to oxidative stress, which triggers the mitochondrial activity (Talbot et al., 2003, 2004) and possibly the gene expression of avian UCP in skeletal muscle (Rey et al., 2010a). In conclusion, the present study reports that avian UCP gene expression correlates with the capacity of skeletal muscle for NST. In the absence of mitochondrial loose coupling, avian UCP is broadly related to increased capacity of the mitochondrial oxidative phosphorylation (Walter and Seebacher, 2009). Whether avian UCP plays a role in heat production through mitochondrial

loose coupling when mitochondria produced ATP in situ within muscle cells remains unclear and still awaits clear demonstration.

LIST OF SYMBOLS AND ABBREVIATIONS

CA11 □ cold-acclimated at 11°C

CA4 □ cold-acclimated at 4°C

□CT □ lower critical temperature

NST □ non-shivering thermogenesis

RMR □ resting metabolic rate

STT □ shivering threshold temperature

T_a □ ambient temperature

avUCP □ avian uncoupling protein

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Université de Lyon and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). □.T. was in receipt of a French Research Council fellowship.

REFERENCES

- Abe, T., Mujahid, A., Sato, K., Akiba, Y. and Toyomizu, M.** (2006). Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens. *FEBS Lett.* **580**, 4815-4822.
- Barré, H., Cohen-Adad, F., Duchamp, C. and Rouanet, J. L.** (1986). Multilocular adipocytes from muscovy ducklings differentiated in response to cold acclimation. *J. Physiol.* **375**, 27-38.
- Barré, H., Cohen-Adad, F. and Rouanet, J. L.** (1987). Two daily glucagon injections induce nonshivering thermogenesis in Muscovy ducklings. *Am. J. Physiol.* **252**, R616-R620.
- Barré, H., Geloën, A., Chatonnet, J., Dittmar, A. and Rouanet, J. L.** (1985). Potentiated muscular thermogenesis in cold-acclimated muscovy duckling. *Am. J. Physiol.* **249**, R533-R538.
- Bedu, E., Chainier, F., Sibille, B., Meister, R., Dallevet, G., Garin, D. and Duchamp, C.** (2002). Increased lipogenesis in isolated hepatocytes from cold-acclimated ducklings. *Am. J. Physiol.* **283**, R1245-R1253.
- Benistant, C., Duchamp, C., Cohen-Adad, F., Rouanet, J. L. and Barré, H.** (1998). Increased in vitro fatty acid supply and cellular transport capacities in cold-acclimated ducklings (*Cairina moschata*). *Am. J. Physiol.* **275**, R683-R690.
- Brand, M. D.** (1995). Measurement of mitochondrial protonmotive force. In *Bioenergetics. A practical approach* (ed. C. Brown and C. Cooper), pp. 39-62. Oxford IR Press.
- Chaffee, R. R. and Roberts, J. C.** (1971). Temperature acclimation in birds and mammals. *Annu. Rev. Physiol.* **33**, 155-202.
- Clerc, P., Rigoulet, M., Leverve, X. and Fontaine, E.** (2007). Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 158-166.
- Collin, A., Buyse, J., van As, P., Darras, V. M., Malheiros, R. D., Moraes, V. M. B., Reyns, G. E., Taouis, M. and Decuypere, E.** (2003a). Cold-induced enhancement of avian uncoupling protein expression, heat production, and triiodothyronine concentrations in broiler chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* **130**, 70-77.
- Collin, A., Taouis, M., Buyse, J., Ifuta, N. B., Darras, V. M., van As, P., Malheiros, R. D., Moraes, V. M. B. and Decuypere, E.** (2003b). Thyroid status, but not insulin status, affects expression of avian uncoupling protein mRNA in chicken. *Am. J. Physiol.* **284**, R771-R777.
- Criscuolo, F., Gonzalez-Barroso, M. D., Le Maho, Y., Ricquier, D. and Bouillaud, F.** (2005). Avian uncoupling protein expressed in yeast mitochondria prevents endogenous free radical damage. *Proc. Biol. Sci.* **272**, 803-810.
- Depocas, F. and Hart, J. S.** (1957). Use of the Pauling oxygen analyzer for measurement of oxygen consumption of animals in open-circuit systems and in a short-lag, closed-circuit apparatus. *J. Appl. Physiol.* **10**, 388-392.
- Duchamp, C. and Barré H.** (1993). Skeletal muscle as the major site of nonshivering thermogenesis in cold-acclimated ducklings. *Am. J. Physiol.* **265**, R1076-R1083.
- Duchamp, C., Cohen-Adad, F., Rouanet, J. L. and Barré, H.** (1992). Histochemical arguments for muscular non-shivering thermogenesis in muscovy ducklings. *J. Physiol.* **457**, 27-45.

- Duchamp, C., Marmonier, F., Denjean, F., Lachuer, J., Eldershaw, T. P., Rouanet, J. L., Morales, A., Meister, R., Benistant, C., Roussel, D. et al.** (1999). Regulatory, cellular and molecular aspects of avian muscle nonshivering thermogenesis. *Ornis Fennica* **76**, 151-165.
- Dumonteil, E., Barré, H. and Meissner, G.** (1995). Expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport proteins in cold-acclimated ducklings. *Am. J. Physiol.* **269**, C955-C960.
- Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A., Pickering, S. et al.** (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**, 96-99.
- Harper, J. A., Stuart, J. A., Jekabsons, M. B., Roussel, D., Brindle, K. M., Dickinson, K., Jones, R. B. and Brand, M. D.** (2002). Artfactual uncoupling by uncoupling protein 3 in yeast mitochondria at the concentration found in mouse and rat skeletal muscle mitochondria. *Biochem. J.* **361**, 49-56.
- Hissa, R.** (1988). Controlling mechanisms in avian temperature regulation—a review. *Acta Physiol. Scand.* **132**, 1-148.
- Johnston, D. W.** (1971). The absence of brown adipose tissue in birds. *Comp. Biochem. Physiol.* **40A**, 1107-1108.
- Lang, G. and Michal, G.** (1974). D-glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate. In *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. U. Bergmeyer), pp. 1238-1242. New York Academic Press.
- Lusk, G.** (1924). Animal calorimetry, analysis of the oxidation of mixtures carbohydrate and fat, a correction. *J. Biol. Chem.* **59**, 41-42.
- Mujahid, A., Ueda, M., Akiba, Y. and Toyomizu, M.** (2005). Expression of avian UCP and ANT in skeletal muscle of cold-exposed laying and Meat-type chickens. *J. Poult. Sci.* **42**, 230-237.
- Ojano-Dirain, C., Toyomizu, M., Wing, T., Cooper, M. and Bottje, W. G.** (2007). Gene expression in breast muscle and duodenum from low and high feed efficient broilers. *Poult. Sci.* **86**, 372-381.
- Raimbault, S., Dridi, S., Denjean, F., Lachuer, J., Couplan, E., Bouillaud, F., Bordas, A., Duchamp, C., Taouis, M. and Ricquier, D.** (2001). An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem. J.* **353**, 441-444.
- Rey, B., Halsey, L. G., Dolmazon, V., Rouanet, J. L., Roussel, D., Handrich, Y., Butler, P. J. and Duchamp, C.** (2008). Long-term fasting decreases mitochondrial avian UCP-mediated oxygen consumption in hypometabolic king penguins. *Am. J. Physiol.* **295**, R92-R100.
- Rey, B., Spee, M., Belouze, M., Girard, A., Prost, J., Roussel, D. and Duchamp, C.** (2010a). Oxygen recovery up-regulates avian UCP and ANT in newly hatched ducklings. *J. Comp. Physiol. B* **180**, 239-246.
- Rey, B., Roussel, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rouanet, J.L., Desplanches, D., Sibille, B., Servais, S., Duchamp, C.** (2010b). Up-regulation of avian uncoupling protein in cold-acclimated and hyperthyroid ducklings prevents reactive oxygen species production by skeletal muscle mitochondria. *BMC Physiol.* **10**, 5e.
- Rolfe, D. F. S., Hulbert, A. J. and Brand, M. D.** (1994) Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **1118**, 405-416.

- Roussel, D., Lhenry, F., Ecochard, L., Semporé, B., Rouanet, J. L. and Favier, R.** (2000). Differential effects of endurance training and creatine depletion on regional mitochondrial adaptations in rat skeletal muscle. *Biochem. J.* **350**, 547-553.
- Roussel, D., Rouanet, J. L., Duchamp, C. and Barré, H.** (1998). Effects of cold acclimation and palmitate on energy coupling in duckling skeletal muscle mitochondria. *FEBS Lett.* **439**, 258-262.
- Scholander, P. F., Hock, R., Walters, W., Johnson, F. and Irving, L.** (1950). Heat regulation in some arctic and tropical mammals and birds. *Biol. Bull.* **99**, 237-258.
- Seifert, E. L., Bézaire, V., Estey, C. and Harper, M. E.** (2008). Essential role for uncoupling protein-3 in mitochondrial adaptation to fasting but not in fatty acid oxidation or fatty acid anion export. *J. Biol. Chem.* **283**, 25124-25131.
- Skulachev, V. P. and Maslov, S. P.** (1960). The role of nonphosphorylating oxidation in temperature regulation. *Biochemistry (Moscow)* **25**, 1058-1064.
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. and Brand, M. D.** (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* **277**, 44784-44790.
- Talbot, D. A., Duchamp, C., Rey, B., Hanuise, N., Rouanet, J. L., Sibille, B. and Brand, M. D.** (2004). Uncoupling protein and ATP/ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins. *J. Physiol.* **558**, 123-125.
- Talbot, D. A., Hanuise, N., Rey, B., Rouanet, J. L., Duchamp, C. and Brand, M. D.** (2003). Superoxide activates a ADP-sensitive proton conductance in skeletal muscle mitochondria from king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 983-988.
- Toyomizu, M., Ueda, M., Sato, S., Seki, Y., Sato, K. and Akiba, Y.** (2002). Cold-induced mitochondrial uncoupling and expression of chicken UCP and ANT mRNA in chicken skeletal muscle. *FEBS Lett.* **529**, 313-318.
- Ueda, M., Watanabe, K., Sato, K., Akiba, Y. and Toyomizu, M.** (2005). Possible role for avUCP-1 α in the control of expression of fiber type, along with avUCP and avANT mRNAs in the skeletal muscles of cold-exposed chickens. *FEBS Lett.* **579**, 11-17.
- Vianna, C. R., Hagen, T., Zhang, C. Y., Bachman, E., Boss, O., Gereben, B., Moriscot, A. S., Lowell, B. B., Bicudo, J. E. P. W. and Bianco, A.** (2001). Cloning and functional characterization of an uncoupling protein homolog in hummingbirds. *Physiol. Genomics* **5**, 137-145.
- Walter, I. and Seebacher, F.** (2009). Endothermy in birds underlying molecular mechanisms. *J. Exp. Biol.* **212**, 2328-2336.

Etude 2

La thermogenèse sans frisson chez le caneton de Barbarie : une perspective écologique pour les oiseaux nidifuges.

(En préparation)

RESUME DE L'ETUDE N°2

La thermogenèse sans frisson chez le caneton de Barbarie : une perspective écologique pour les oiseaux nidifuges

Non Shivering Thermogenesis in the Muscovy duck (Cairina moschata): an ecological perspective for precocial bird

Dès l'éclosion, les oiseaux semblent capables de réguler leur température interne très précocement (**Nichelmann et Tzschentke, 2002** ; revue dans **Hohtola et Visser, 1998**). Chez la plupart des espèces aviaires, le frisson thermique est décrit comme le premier mécanisme thermogène mis en place lors d'une exposition au froid. Même chez le poussin de manchot royal, connu pour développer une thermogenèse sans frisson (NST) lorsqu'il est à terre durant l'hiver austral, il a été montré qu'aux stades de vie précoces, les poussins produisaient de la chaleur via une activité contractile (**Duchamp et al., 2002**). Cependant, de par leurs différences morphologiques avec les oisillons nidicoles, les oiseaux nidifuges, aptes à quitter le nid dès l'éclosion semblent développer plus précocement des mécanismes thermogènes. Le canard de Barbarie présente le double avantage d'être un oiseau nidifuge et d'être capable de développer une NST aviaire, lorsqu'il est soumis à une exposition au froid prolongée. D'après les résultats de l'étude précédente, montrant une plasticité de la NST en fonction de la température d'acclimatation, il nous est paru intéressant d'étudier la mise en place de ce phénomène en fonction de la durée d'acclimatation.

Cette étude avait donc pour objectif de caractériser la mise en place et l'évolution des capacités de NST au cours d'une acclimatation au froid de durée variable chez un oiseau nidifuge, le caneton de Barbarie.

Méthodes

Animaux

Deux groupes de canetons de Barbarie mâles (pédigrée R31, INRA) ont été utilisés au cours de cette étude. Le premier était élevé à thermoneutralité (25°C, TN) et le deuxième était acclimaté à 4°C (CA) pendant 5 semaines. Ils étaient exposés à une photopériode

hivernale (8h jour/ 16h nuit) et avaient accès à la nourriture et à l'eau de boisson de façon *ad libitum*. L'étude a été menée sur des canetons d'âges différents et donc de durées d'acclimatation différentes, de 2 semaines à 5 semaines d'exposition (2-wk – 5-wk).

Principale méthode utilisée

Mesure du métabolisme par calorimétrie indirecte et enregistrement du frisson

Le caneton était installé dans une chambre métabolique thermorégulée et son métabolisme *in vivo* était évalué par calorimétrie indirecte à partir de l'analyse des gaz (O₂ consommé et CO₂ produit) expirés. La température ambiante diminuait progressivement par palier pour obtenir une courbe de thermogenèse. L'activité électromyographique était enregistrée pour chaque palier de température ambiante grâce à des électrodes implantées dans le muscle gastrocnémien du caneton.

Principaux résultats et conclusion

Nos résultats ont montré d'une part une augmentation de la capacité de thermogenèse sans frisson avec la durée d'exposition au froid et d'autre part, de façon surprenante, il apparaît que les canetons élevés à thermoneutralité possédaient de façon innée une capacité de thermogenèse sans frisson qui disparaît au cours de la croissance.

Cette étude remet en cause le principe établi d'une NST supplantant la thermogenèse de frisson au cours du temps. Il semblerait que les canetons de Barbarie soient capables de produire de la chaleur via la NST dès leur plus jeune âge et qu'ils préfèrent par la suite allouer cette énergie à la croissance, s'ils ne sont pas soumis à un stress thermique.

were fed *ad libitum* with commercial mash (Moulin Guenard, 33100MI, Connas France) and had free access to water. From the age of 1 week, one experimental group (CA for cold acclimated) of 10 ducklings were caged for 3, 4 or 5 weeks at cold temperature (10°C). Each CA duckling was used for all during the experiment. In the same time, the control group of 10 ducklings was reared at thermoneutrality (20°C). To respect the primal condition that TN ducklings had never been thermally stressed, we were obliged to use different TN ducklings at each week of experimentation. The photoperiod was constant (light:dark = 11:11) to reproduce winter light conditions. Body weight was recorded daily, between 03 AM and 11.30 AM. The present investigation was conducted in accordance with the guiding principles of the French Department of Animal and Environmental Protection for the care and use of laboratory animals.

Metabolic rate

Metabolic rate was measured by indirect calorimetry using open-circuit gas analyser system connected to a computerised recording system as already used in ducklings (Barré et al., 1985; Teulier et al., 2010). Ducklings were fasted overnight prior to be positioned in a thermostatic chamber. Conductive heat loss on the ground surface was minimized by a polypropylene bed.

Ambient temperature (T_a) was controlled and continuously measured with copper-constantan thermocouples inside the thermostatic chamber. Air flow rates through the chamber (ranging from 0 to 1 l.min⁻¹, depending of bird body mass) were measured using a platinum volumeter, and converted to standard values (STPD,

Standard Temperature and Pressure, dry). The fractional concentrations of oxygen were measured using a Servomex 1100 paramagnetic gas analyzer (Taylor Instrument Analytics Ltd, Sussex, UK). Carbon dioxide concentrations were measured using a Servomex 1000 infrared gas analyzer. The O_2 analyser was calibrated with pure nitrogen gas and atmospheric air assuming 20.9% oxygen. The CO_2 analyser was calibrated with pure nitrogen gas and a known mixture of 0.0001% CO_2 . Mass specific rates of O_2 consumption and CO_2 production were calculated according to the equation of Depocas and Hart (1957). The caloric equivalent for O_2 was determined from the respiratory quotient using Lusk tables (1924).

Shivering

Shivering activity was assessed using integrated electromyogram (EMG) activity of the *gastrocnemius* leg muscle. EMG was recorded using three monopolar electrodes insulated except for the tips (Stabilohm 110 Ni 100 and Cr 100, 0.1 mm diameter) acutely inserted into the muscle 1 mm apart. The EMG signal was collected by an acquisition interface (M3B-CE, Biopac System Inc., Santa Barbara, CA, USA) and integrated with Biopac Student Lab 4.0 v.3.00 software (Biopac System Inc., Santa Barbara, CA, USA). Measurement of the integrated signal value was made at rest over long periods of 10 minutes. Portions of those integrated recordings containing artefacts due to occasional movements of ducklings were eliminated by simultaneous monitoring of bird using a webcam.

Experimental procedure

NST was determined following published procedure (Teulier et al., 2010). Basically metabolic rate (MR) and EMG were simultaneously measured at T_a ranging from 10°C to -10°C. MR and EMG were determined during 30 min that followed an initial 10 min adjustment period to obtain metabolic steady state and thermal equilibrium at a given T_a .

The lower critical temperature (LCT) was determined as the T_a eliciting the first increase in metabolic rate, while the shivering threshold temperature (STT) was determined as the T_a eliciting the first increase in EMG activity. Both threshold temperatures were calculated as previously described (Duchamp et al, 1989; Teulier et al., 2010). The NST capacity was estimated by the shift between MR corresponding to the STT and RMR, measured at thermoneutrality.

Thermal conductance

Thermal conductance of ducklings of each group may be estimated by the slope of the

linear model describing the relation between MR and T_a at a high slope indicating a high thermal conductance.

Statistical analysis

Relations between integrated EMG activity and T_a , and metabolic rate and T_a were expressed by two linear regression lines (Scholander et al., 1950; Barré et al., 1985) that intersect at the shivering threshold temperature (STT) and lower critical temperature (LCT), respectively. To draw these regression lines, we determined at which ambient temperature EMG activity or metabolic rate became significantly different from basal values, using a paired-ANOVA test. These values and those measured at lower ambient temperature were then integrated in a second linear regression line distinct from the basal linear regression line.

Values are means ± s.e.m. When not detailed, the statistical significance of observed variations was assessed using one-way ANOVA. Differences between means were subsequently tested by t-test.

Table 1. Effect of cold acclimation and age on body mass (BM), resting metabolic rate (RMR), critical temperatures (LCT for Lower Critical Temperature and STT for Shivering Threshold Temperature) and NST capacity

	TN ducklings				CA ducklings			
	2-wk (8)	3-wk (7)	4-wk (8)	5-wk (6)	2-wk (8)	3-wk (8)	4-wk (8)	5-wk (7)
BM (kg)	0.000010	0.000000	1.300030	1.000000	0.000000	0.000030	1.000000	1.000000
RMR (W)	3.00010	0.10010	0.00030	0.30000	3.10010	0.00010	0.00000	0.00030
LCT (°C)	0.0000	0.001.1	0.3.0000	1.00000	1.00000	0.001.0	1.00000	0.001.00
STT (°C)	1.00000	1.03000	0.1.001.3	1.01000	1.00000	13.001.00	1.0001.000	13.10000
ΔT (°C)	3.0000	0.0000	0.0000	0.00000	0.001.0	0.00030	0.30000	0.001.00

Values are means ± S.E.M. 2w, 3w, 4w and 5w represent number of weeks of specific rearing temperature exposure. The number of independent determinations is given in parentheses. The RMR is measured within the thermoneutral zone. LCT, STT and NST were measured as described in the Material and Methods. Statistical analysis (ANOVA and t-test post-hoc) significantly different (****); *, significantly different from 2-wk (****); †, significantly different from 3-wk (****); ‡, significantly different from TN duckling of same age (****).

Results

Body mass and growth rate

Ducklings were weighted every day in order to determine effect of cold exposure on their growth rate. As expected (Teulier et al., 2010), long-term cold exposure slowed the growth rate of ducklings. Body masses of CA ducklings were significantly lower after 4 and 5 weeks of cold exposure than those of TN ducklings (Table 1).

Metabolic response to cold

Resting Metabolic Rate (RMR)

In all experimental groups, resting metabolic rate (RMR) was measured at thermoneutrality (T_a ranging from 20°C to 24°C). Energy expenditure increased with age and was not different between groups while CA ducklings weighed less than thermoneutral counterpart (see table 1). Fig.1A shows that the mass specific RMR of ducklings decreased in relation with age (R_{TN} and R_{CA}) and were on the whole significantly higher in CA than in TN birds.

Thermal conductance

As shown in Fig.1B, age-related decrease in mass specific RMR could partially be explained by a decrease in thermal conductance with age. However, there was no difference in thermal conductance between CA and TN ducklings ($p > 0.05$).

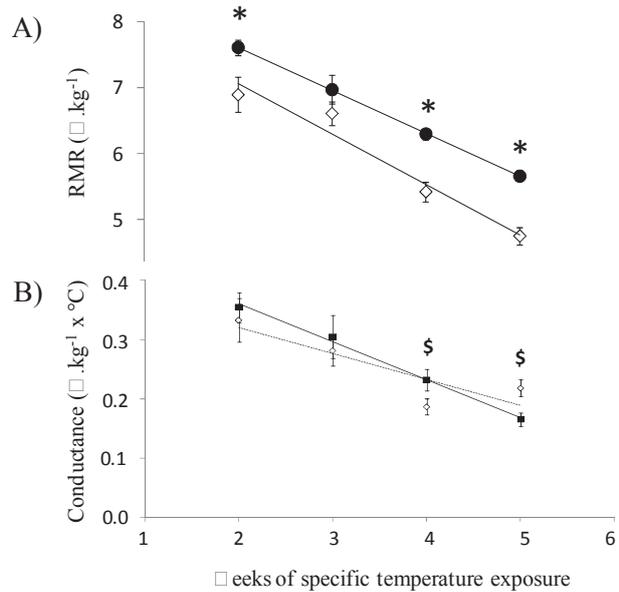


Fig.1. Metabolic responses to cold. A) Correlation between resting metabolic rate (RMR, in kcal.kg⁻¹) and age in TN (open symbols) and CA (filled symbols) ducklings. RMR was admitted as mean of MR measured for T_a ranging 20°C to 24°C, in the thermoneutral zone. For TN group $y = -0.001x + 7.4$, $R^2 = 0.99$. For CA group $y = -0.001x + 7.8$, $R^2 = 0.99$. RMR of CA group is significantly different from TN group at the same age. B) Thermal conductance as a function of time in Muscovy ducklings of different ages. 2w, 3w, 4w and 5w represent number of weeks of specific rearing temperature exposure. TN ducklings are represented by open symbols and CA ducklings by filled symbols. Characteristics of regression lines for TN (dotted line) $y = -0.001x + 0.32$, $R^2 = 0.99$ and for CA (black line) $y = -0.001x + 0.36$, $R^2 = 0.99$. Values are means \pm S.E.M from 10 ducklings per age. * when not visible, error bars are within the symbols. \$ $p < 0.05$. Conductance is significantly different from 2 and 3 weeks.

Non-shivering activity

The relationship between MR and T_a was expressed by two linear regression lines that intersect at the LCT according to Scholander et al. (Scholander et al., 1950). At temperature lower than the LCT, MR increases linearly as T_a decreased (Fig.2). LCT was neither affected by the growth nor by the duration of cold exposure (Table 1). In the whole, LCT was however significantly higher in TN (19.5°C) than in CA (18.5°C,

p000) group (Table 1). EMG activity of *gastrocnemius* muscle was measured to obtain the onset temperature of shivering mechanisms. Integrated EMG activity showed a continuous basal activity of 10-11% in all experimental groups (Fig.2). As described for MR, the relationship between EMG activity and T_a was expressed by two linear regression lines that intersect at the STT. Above this critical temperature EMG activity was constant (p000) while below this critical temperature, EMG activity increased linearly as T_a decreased (Fig. 2). The STT are reported in Table 1. In TN ducklings, STT did not change with age whereas in CA ducklings, STT decreased in relation to age (Table 1).

Non Shivering Thermogenesis (NST) is demonstrated by a shift between LCT and STT (Barré et al., 1985). In all groups of same age, LCT was significantly higher than STT (p000), except for 1-wk and 3-wk old TN ducklings (p0010 and p0000, respectively) (Table 1). These results reveal the existence of a measurable NST in all groups, except for 1 and 3-wk old TN ducklings. The capacity of NST was calculated as previously reported (Teulier et al., 2010), the onset pattern of which appeared significantly between TN and CA ducklings (Fig.3). On one hand, TN ducklings surprisingly exhibited an NST capacity at 1 and 3-wk of thermoneutrality, which as ducklings grow up to become insignificant in 1-wk of age (Fig.3). On the other hand, NST capacities of CA ducklings was not different from that of TN ducklings during the two first weeks of exposure to specific temperature, but was positively correlated with the duration of cold exposure. Hence, the NST

activity of CA ducklings increased from 1-wk to 3-wk of cold exposure, becoming higher than in TN ducklings after 3-wk of cold (Fig.3). Surprisingly, NST capacity was decreased in CA group after 1-wk of cold exposure, but remained 0000 higher than that of TN birds of the same age (Fig.3).

Discussion

In this study we investigate the ontogeny of thermogenic mechanism in a precocial bird, the muscovy duck that is known to develop muscular NST when chronically exposed to cold. The main exciting result consists in the demonstration of the existence of a spontaneous NST in early post-hatching period that is observable in CA but also in TN muscovy ducklings. According to Nichelmann and Tzschentke (Nichelmann and Tzschentke, 2002), at 00 days post-hatching, precocial ducklings are able to increase their metabolic heat production. And surprisingly, the thermoregulatory mechanism of NST seems to be efficient at 3 weeks post hatch in both groups. 0ucklings reared at thermoneutrality exhibited the same capacity of NST as cold-acclimated ducklings (Fig. 3). This result is in accordance with 0ekstein and 0olman's results (Wekstein and Zolman, 1969) showing that newly hatched chicks were able to increase their metabolic rate without shivering activity. Then the NST capacity of TN decreased as exposure to thermoneutrality last long and at 0 weeks post-hatching, NST capacity was significantly decreased by 000 to become insignificant one week later. In contrast, the NST of CA progressively increased with cold exposure duration to reach a maximum after 0weeks of cold. Indeed,

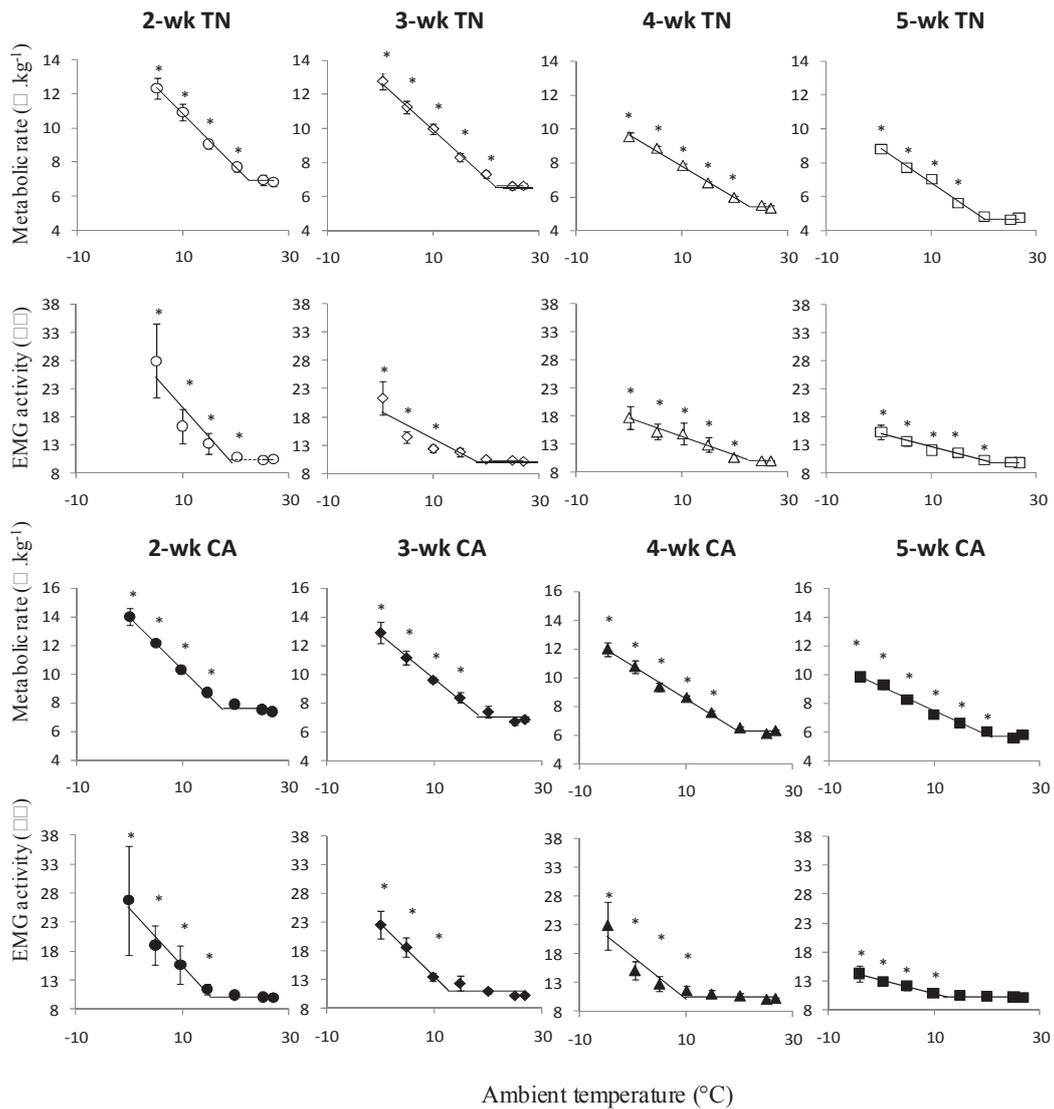


Fig.2. Metabolic rate and integrated EMG activity in relation to ambient temperature in Muscovy ducklings of various ages reared at Thermoneutrality (TN, open symbols) or cold acclimated (CA, filled symbols). 2-wk, 3-wk, 4-wk and 5-wk represent number of weeks of specific rearing temperature exposure. Values are means \pm S.E.M. from 10 ducklings per age. Asterisks not visible, error bars are within the symbols. *p < 0.05, MR or EMG significantly different from values measured at T_a .

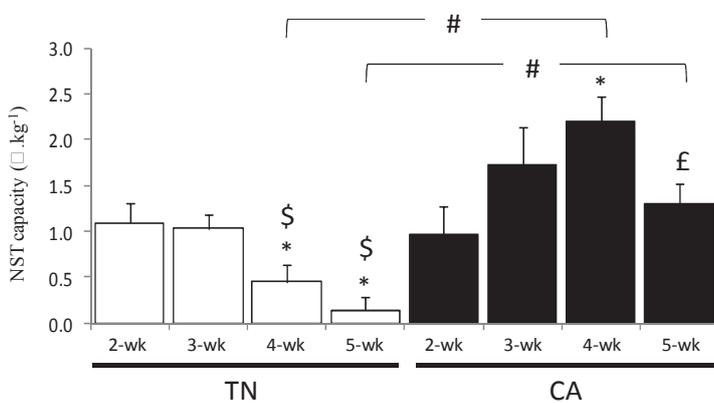


Fig.3. NST capacity in TN (open histograms) and CA (filled histograms) ducklings at various ages. Values are means \pm S.E.M. from 10 ducklings per age. 2-wk, 3-wk, 4-wk and 5-wk represent number of weeks of specific rearing temperature exposure. #, NST capacity significantly different from NST capacity calculated for 2-wk of specific rearing temperature. \$, NST capacity significantly different from NST capacity calculated for 3-wk of TN ducklings. *, NST capacity significantly different from NST capacity calculated for 2-wk of CA group. £, NST capacity significantly different between TN and CA group for same age

NST capacity was increased by 300% in CA ducklings compared to TN ducklings of the same age. This increase is in accordance with results of a recent study (Teulier et al., 2010), which have demonstrated an increase of NST capacity by 300% after 4 weeks of cold-acclimation. Nevertheless, in a previous study, Barré et al. (Barré et al., 1985) have obtained a NST 3 fold higher than in the present study after 3 weeks of cold exposure ($0.3 \text{ W} \cdot \text{kg}^{-1}$ vs. $1.0 \text{ W} \cdot \text{kg}^{-1}$). These discrepancies may rely on the large differences in the body mass between the two protocols: after 3 weeks of cold exposure, mean body mass of our CA ducklings was 0.043 kg compared to 0.033 kg in Barré's study (Barré et al., 1985). Indeed a lower body mass would lead a less favorable surface to volume ratio which would enhance heat exchange with the environment and so increase the harshness of cold. In endotherms, mass specific metabolic rate is allometrically related to body size (review in Hulbert et al., 2007), i.e. small birds had relatively higher mass specific metabolic rate than large birds. This argument could partially account for the decreasing NST capacity of CA ducklings after 4 weeks of cold exposure. Indeed, although NST was 3 fold greater in 4-wks CA ducklings compared to age-matched TN ducklings, its intensity was surprisingly lower than that after 3 weeks of cold (Fig.3). This lower NST intensity could also be explained by a considerably decreased thermal conductance in these older ducklings. Another non exclusive explanation would be technical. Indeed, the low activity of shivering in 4-wk CA ducklings might make the statistical determination of STT more difficult. This problem was already encountered by

Marjoniemi and Hohtola for other bird species (Marjoniemi and Hohtola, 2000).

Perspectives and significance

From an ecological point of view, this work highlights another difference between altricial and precocial birds. It is clearly admitted that altricial nestlings are able to allocate more energy to growth than precocial birds, because thermoregulation is displayed by parental care. In this condition, the energy requirements of endothermy become very expensive for energy budget in growing organisms which have to allocate a substantial amount of energy to sustain their body temperature (Dunn, 1980). In such a way, it is not so surprising that growing in the cold would negatively impact the growth as shown in the present study (Table 1) and elsewhere (Teulier et al., 2010) for muscovy ducklings. According to previous studies on the ontogeny of thermoregulation in altricial (*Agelaius phoeniceus*) and semi altricial (*Aptenodytes patagonicus*) birds (Olson, 1994; Duchamp et al., 2002), shivering seems to be the first thermogenic mechanism to sustain increase of heat production (review in Hohtola and Visser, 1998). But in precocial species, physiological basis of thermoregulatory mechanisms are still debated. The existence of NST should not be generalized to all bird species; in the Japanese quail, Marjoniemi and Hohtola have clearly showed a lack of NST (Marjoniemi and Hohtola, 2000). But our results, and others (Nichelmann and Tzschentke, 2002) demonstrate the existence of NST in ducklings reared at thermoneutrality. Because of their lack of nestling period, precocial birds could be exposed to a cold stress; they are already to

increase heat production, immediately after hatching (**Nichelmann and Tzschentke, 2002**). Besides, this period is known to induce an increase of the avian uncoupling protein (avUCP) expression, putatively involved in antioxidant reactions (Rey et al., 2004) and in thermogenic processes (review in **Mozo et al., 2005**), as suggested by the correlation between avUCP relative expression and NST capacity already shown in a recent study (**Teulier et al., 2010**). It is obvious that expression profile of avUCP during cold exposure could provide more proofs of putative thermogenic functions of this protein.

In conclusion, our results show that muscovy ducklings, never put on a cold stress, can develop at early stage of post-hatch development NST capacity. A

thermogenic process that is maintained and enhanced when birds are exposed to cold for a while. Hence, contrary to the general idea NST will not replace shivering during the development of regulatory thermogenesis in cold exposed birds (**Heldemaier et al., 1989**), but rather it seems to be already operative in the youngest, at least in ducklings.

Aknowledgments

This work was supported by a grant from the Université de Lyon and the centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). L.T was is receipt of a French Research Council fellowship.

REFERENCES

- Arieli, A., Breman, A. and Meltzer, A.** (1988). Cold thermogenesis in the summer-acclimatized and cold-acclimated domestic fowl. *Comp. Biochem. Physiol.* 103C, 41-44.
- Barré, H., Cohen-Adad, F., Duchamp, C. and Rouanet, J. L.** (1988). Multilocular adipocytes from muscovy ducklings differentiated in response to cold acclimation. *J. Physiol.* 375, 33-37.
- Barré, H., Geloën, A., Chatonnet, J., Dittmar, A. and Rouanet, J. L.** (1988). Potentiated muscular thermogenesis in cold-acclimated muscovy duckling. *Am. J. Physiol.* 249, R33-R37.
- Chaffee, R. R. and Roberts, J. C.** (1971). Temperature acclimation in birds and mammals. *Annu. Rev. Physiol.* 33, 109-124.
- Depocas, F. and Hart, J. S.** (1952). Use of the Pauling oxygen analyzer for measurement of oxygen consumption of animals in open-circuit systems and in a short-lag, closed-circuit apparatus. *J. Appl. Physiol.* 10, 333-340.
- Duchamp, C., Cohen-Adad, F., Rouanet, J. L. and Barré, H.** (1988). Histochemical arguments for muscular non-shivering thermogenesis in muscovy ducklings. *J. Physiol.* 457, 22-27.
- Duchamp, C., Barré, H., Delage, D., Rouanet, J.L., Cohen-Adad, F., Minaire, Y.** (1988) Nonshivering thermogenesis and adaptation to fasting in king penguin chicks. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 257, R111-R114.
- Dunn, E.H.** (1988). On the variability in energy allocation of nestlings birds. *The Auk*, 97, 1-11.
- El-Halawani, M.E., Wilson, W.O., and Burger, R.E.** (1988). Cold-acclimation and the role of catecholamines in body temperature regulation in male leghorns. *Poultry Sci.* 49, 1-33.
- Heldmaier, G., Klaus, S., Wiesinger, H., Friedrichs, U. and Wenzel, M.** (1988). Cold acclimation and thermogenesis. In: *Living in the Cold*, edited by A. Malan, and B. Canguilhem. Montrouge, France: Libbey Eurotext. 2, 33-37.
- Hissa, R.** (1988). Controlling mechanisms in avian temperature regulation—a review. *Acta Physiol. Scand.* 132, 1-11.
- Hohtola, E.** (1988). Facultative and obligatory thermogenesis in young birds—a cautionary note. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 131, 33-37.
- Hohtola E.** (1988) Shivering thermogenesis in birds and mammals. In: *Life in the Cold: Evolution, Mechanisms, Adaptation, and Application. 12th International Hibernation Symposium*, edited by Barnes BM and Carey HV. Fairbanks, AL—Institute of Arctic Biology, University of Alaska
- Hohtola, E. and Visser, G. H.** (1988). Development of locomotion and endothermy in altricial and precocial birds. In *Avian Growth and Development: Evolution Within the Altricial-Precocial Spectrum* (ed. J. M. Starck and R. E. Ricklefs) Oxford: Oxford University Press. 100-108.
- Johnston, D. W.** (1971). The absence of brown adipose tissue in birds. *Comp. Biochem. Physiol.* 40A, 111-114.

- Lusk, G.** (1944). Animal calorimetry, analysis of the oxidation of mixtures carbohydrate and fat, a correction. *J. Biol. Chem.* **59**, 114-118.
- Marjonemi, K, and Hohtola E.** (1984) Does cold acclimation induce nonshivering thermogenesis in juvenile birds? *J. Comp. Physiol. B* **170**, 333-338
- Nichelmann, M. and Tzschentke, B.** (1984). Ontogeny of thermoregulation in precocial birds *Comp. Biochem. Physiol. A* **131**, 111-113.
- Olson, J.H.** (1966). The ontogeny of shivering thermogenesis in the red-winged blackbird (*Agelaius phoeniceus*). *J. Exp. Biol.* **191**, 223-231
- Rintamäki, H., Saarela, A., Marjakangas, A., and Hissa R.** (1983). Summer and winter temperature regulation in the black grouse *Lyrurus Tetrix*. *Physiol. Zool.* **56**, 111-118
- Saarela, S. and Vakkuri, O.** (1984). Photoperiod-induced changes in temperature-metabolism curve, shivering threshold and body temperature in the pigeon. *Experientia*, **38**, 333-335
- Scholander, P. F., Hock, R., Walters, W., Johnson, F. and Irving, L.** (1944). Heat regulation in some arctic and tropical mammals and birds. *Biol. Bull.* **99**, 37-44
- Untergasser, G., and Hayward, J.S.** (1962). Development of thermoregulation in ducklings. *Can. J. Zool.* **50**, 133-138
- Teulier, L., Rouanet, J.L., Letexier, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rey, B., Duchamp, C. and Roussel, D.** (1991). Cold-acclimation-induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian $UCP1$ but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency. *J. Exp. Biol.* **213**, 223-231
- Wekstein, D.R. and Zolman, J.F.** (1966). Ontogeny of heat production in chicks. *Fed. Proc.* **28**, 133-138

Etude 3

Brûler des lipides pour rester au chaud : une adaptation métabolique des manchots royaux nécessaire pour la vie marine.

(En préparation)

RESUME DE L'ETUDE N°3

Brûler des lipides pour rester chaud, une adaptation métabolique des manchots royaux nécessaire pour la vie marine.

King penguins burn fat to keep warm, a metabolic adaptation to life in cold sea water

Dans les précédentes études, nous avons pu mettre en évidence une plasticité phénotypique des adaptations métaboliques chez le caneton de Barbarie en réponse à une exposition expérimental au froid d'intensité et de durée variable.

Qu'en est-il lors d'une réelle adaptation en milieu naturel thermiquement défavorable ?

De nombreuses études effectuées au sein du laboratoire ont pris pour modèle le manchot royal. Au cours de sa vie, cet oiseau semi aquatique est particulièrement soumis à des conditions climatiques rigoureuses. En effet, au stade poussin, lorsqu'il reste à terre, il doit faire face à la rudesse de l'hiver austral et développe une thermogenèse sans frisson en réponse à une diminution de la température ambiante (**Duchamp et al., 1989**). Un autre moment clé de la vie du manchot royal est son passage en mer. Le pouvoir conducteur élevé de l'eau (environ 20 fois plus élevé que l'air) associé à la température froide de l'océan austral (environ 4°C) nécessitent des modifications métaboliques pour réguler la température interne (**Barré et Roussel, 1986**). De plus, le passage en mer est accompagné d'une intense activité musculaire liée au caractère nourricier de ces longs voyages aquatiques (**Putz, 2002**). L'adaptation à la vie marine passe donc par deux nouvelles contraintes énergétiques importantes : une thermogenèse accrue et une activité physique soutenue. Ces deux conditions physiologiques particulières sont connues pour entraîner une modification du métabolisme, axée sur une utilisation accrue des lipides comme source énergétique principale. (**Jenni et Jenni-Eiermann, 1998 ; Vaillancourt et al., 2005**).

Il était donc naturel de s'intéresser au métabolisme lipidique du manchot royal, qui accumule ces deux contraintes lors de son adaptation à la vie marine. Notre travail s'est donc porté sur l'évolution du métabolisme *in vivo* suite à une perfusion de lipides exogènes chez des manchots royaux juvéniles déjà adaptés à l'eau versus des oiseaux jamais allés en mer.

Méthodes

Animaux

28 manchots royaux juvéniles en fin de mue (*Aptenodytes patagonicus*) ont été capturés sur l'île de la Possession (Archipel de Crozet) au cours de l'été austral 2008-2009. Deux groupes ont été formés : les juvéniles jamais allés en mer (NI, *never immersed*), capturés au fond de la colonie et les juvéniles déjà adaptés à la vie marine (SA, *sea-adapted*), récupérés sur la plage à la sortie de l'eau.

Principales méthodes utilisées

Cathétérisme

Deux cathéters étaient placés dans la veine de chaque aileron un jour avant la mesure du métabolisme pour limiter le stress dû à la manipulation. Le premier servait à la perfusion des solutions et le deuxième permettait de prélever le sang.

Métabolisme in vivo

Les manchots étaient placés dans un caisson thermostaté (à thermoneutralité, 10°C) et portaient un masque en polyéthylène relié à des analyseurs de gaz (O₂ et CO₂), nous permettant de mesurer le métabolisme *in vivo* des oiseaux.

Perfusion, prélèvements sanguins

La solution saline (NaCl 0,9%) ou la suspension de triglycérides (Intralipide 20%, Fresenius Kabi AB, Sweden) étaient perfusées pendant 30 min à raison de 1 mL.min⁻¹. Les prélèvements sanguins étaient effectués à des temps précis dans le but d'obtenir la cinétique d'apparition/disparition des triglycérides (TG), du glycérol (GLY) et des acides gras non estérifiés (NEFA) plasmatiques grâce à des kits commerciaux. (cf § II.4. p.61)

Principaux résultats et conclusion

Nous avons pu montrer un effet différent de la perfusion de lipides sur le métabolisme *in vivo* entre les groupes, sans modification de la cinétique d'hydrolyse des lipides en acides gras et glycérol. Cela suggère que les manchots SA sont capable de plus oxyder les substrats lipidiques dans le but de réguler leur température interne lors de leur voyage en mer.

**King penguins burn fat to keep warm,
a metabolic adaptation to marine life**

Loïc Teulier, Jérémy Tornos, Jean-Louis Rouanet, Marion Lecoadic, Virginie Dolmazon,
Benjamin Rey, Claude Duchamp, Damien Roussel*

Université de Lyon, CNRS, UMR5123, Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, F-69622 Villeurbanne, France

***Corresponding author:** Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, CNRS UMR 5123, UCBLyon1, 43 Bld 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne cedex, France.

Tel.: +33 472 43 16 64; fax: +33 472 43 11 72. E-mail address: damroussel@yahoo.fr

Short title: Lipid-induced thermogenesis in sea-adapted king penguin

Key words: lipids, infusion, king penguin, *in vivo* metabolic rate

SUMMARY

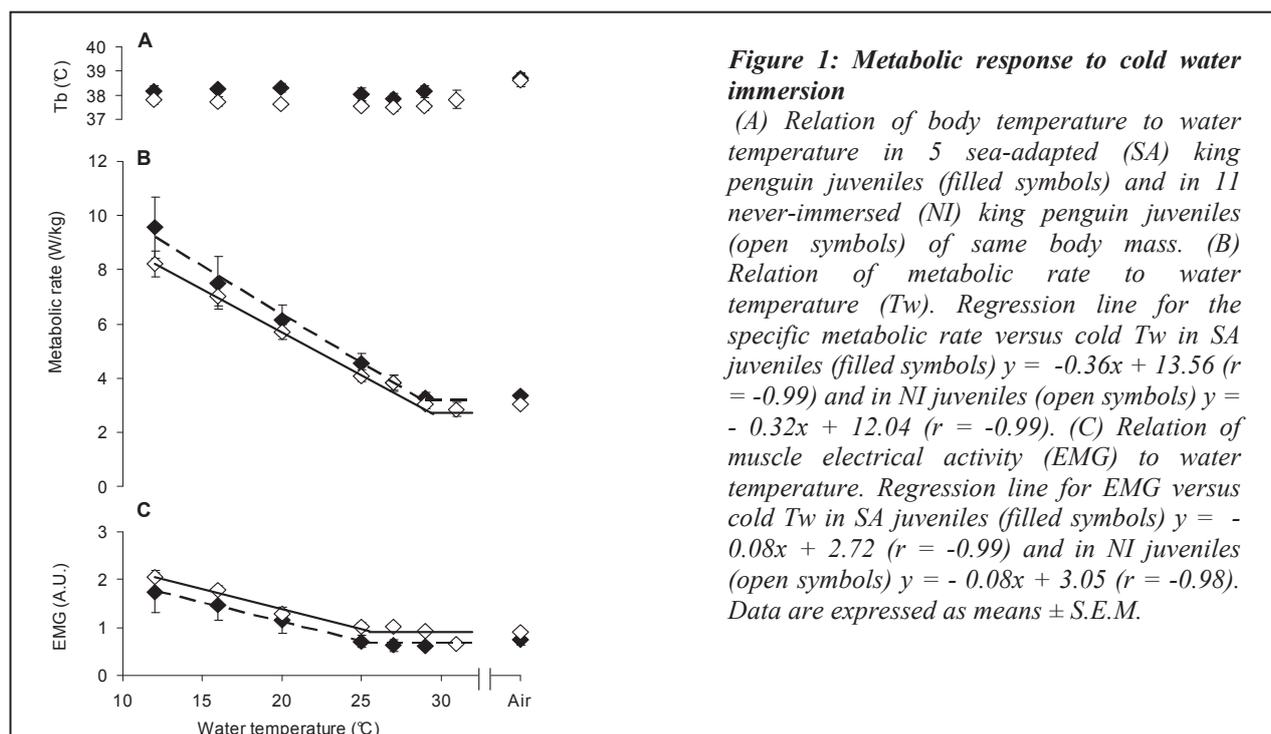
Because of its marine life in subantarctic zones, the semi-altricial seabird king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) faces energetic constraints, such as long distance swimming in cold water (Pütz, 2002; Charassin and Bost, 2001). For juveniles, transition from shore where they stayed from hatching, to ocean where they will forage, constitutes a massive cold stress. Therefore they must activate thermogenic mechanisms, i.e. shivering or non shivering thermogenesis (Barré et al., 1986; Duchamp et al., 1989) to counter heat loss, induced by the intense cooling power of water. These thermogenic processes require metabolic adaptations that need large fuel substrate supply. Lipids, which are the main nutritional intakes of king penguins (Cherel et al, 1996; Raclot et al., 1998) are mostly implied into thermogenic mechanisms in birds (Benistant et al., 1998; Vaillancourt et al., 2005; Talbot et al., 2004). The aim of this study was to characterize the metabolic transition between shore and marine life in king penguin. After showing a metabolic increase induced by immersion in cold water and by artificial lipid supplementation in never immersed (NI) and sea adapted (SA) penguin juveniles, we highlighted an increased capacity of lipid oxidations induced by marine life, suggesting that king penguins burn fat to keep warm in cold water.

RESULTS AND DISCUSSION

Metabolic response to cold water immersion

To define the thermoregulatory responses of king penguin juveniles in water, esophageal body temperature (T_b), metabolic rate (MR) and electromyogram activity of the pectoral muscle were simultaneously measured for water temperature (T_w) values ranging from 31 to 12°C. In the range of T_w studied, T_b remained stable in water and were not significantly different between NI and SA juveniles (**Fig. 1A**). Although movements were restrained in the metabolic tank and despite the intense cooling power of water, king penguin juveniles efficiently maintain a high and constant T_b in cold water. This also indicates that the NI juvenile penguin which had spent all his childhood on shore and never faces the intensive energetic challenge required to maintain a high body temperature when immersed in cold water is already set to be a complete semiaquatic seabird endotherm.

As shown in figure 1B, fully immersed juveniles maintained their body temperature constant by increasing their MR below a lower critical temperature (LCT). The relationships between MR and T_w are usually expressed by two linear regression lines that intersect at the LCT (**Scholander et al., 1950**). The LCT was not significantly different between groups ($LCT_{NI} = 29.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $LCT_{SA} = 27.6 \pm 2.1^\circ\text{C}$), and the MR remained constant from LCT to at least 31°C ($RMR_{NI} = 2.9 \pm 0.2 \text{ W/kg}$ and $RMR_{SA} = 3.2 \pm 0.2 \text{ W/kg}$, not significant), a temperature range considered to be in the thermoneutral zone. Such high LCT and narrow thermoneutral zone in water have previously been reported in different penguin species (**Barré and Roussel, 1986; Dumonteil et al., 1994**) and highlight how much life in the cold subantarctic seawater (temperature range of $5\text{-}9^\circ\text{C}$) is an intensive energetic challenge for penguins which are shivering below a water temperature of 27°C . Consequently, king penguin juveniles must sustain their metabolic rate between 3 to 4



fold above RMR in order to maintain endothermy in the cold marine environment (as calculated from the regression lines in **Figure 1B**). This would represent a daily energy expenditure of 10-11 W/kg, i.e. 7,200 to 8,200 kJ of energy expended per juvenile while resting at sea.

It has previously been estimated that the daily metabolic rate of adult free-living king penguins at sea requires 6-8 W/kg (**Kooyman and Davis, 1982; Culik et al., 1996; Froget et al., 2004**). The higher energy requirements of king penguin juveniles in water could be due to a lower body mass and then a less favorable surface-to-volume ratio which would enhance heat exchange with the environment (**Barré and Roussel, 1986**). In the present study, juveniles weighed an average of 8.3 ± 0.3 kg whereas in the above cited studies, birds weighed between 11 and 13 kg. Such a body mass difference would enhance thermal conductance by 20-30% in juveniles. Additionally, the measure of oxygen consumption in juveniles wearing a respiratory mask and confined in a metabolic tank could also cause stress-related variations in energy expenditure of individuals. As stress increases heart rate, an “additional heart rate” can be used as an indicator of the stress level in wild animals (**Groscolas et al., 2010**). The mean heart rate of captive and undisturbed king penguin averaged 62 $\text{beats}\cdot\text{min}^{-1}$ (**Groscolas et al., 2010**). In the present study, heart rate values averaged 80 ± 5 $\text{beats}\cdot\text{min}^{-1}$ and 75 ± 7 $\text{beats}\cdot\text{min}^{-1}$ in resting NI and SA juveniles, respectively. This “additional heart rate” of 13-18 $\text{beats}\cdot\text{min}^{-1}$ indicates that confinement in the respirometer caused stress in juveniles. If we assume an energy pulse of 36.4 $\text{J}\cdot\text{beat}^{-1}$ for king penguins (**Groscolas et al., 2010**), this experimental stress would

overestimate metabolic rate by 0.9-1.2 W/kg, explaining 20 to 40% of the higher metabolic rate of juveniles compared with free-living king penguins. The third explanation, but not the least, could be the ability of deep diving hypothermia performed by adult king penguins while foraging at sea (**Handrich et al., 1997 nature; Schmidt et al., 2006**). Such physiological adjustments associated with diving behavior would slow metabolism and thus lower the daily energy requirements of king penguins. On the whole, even though stress resulting from confinement induced an overestimation of the metabolic rate in birds, the daily energy expenditure difference between juveniles and adults would also imply the existence of physical (insulation reinforcement) and metabolic adaptations to the life in cold sea water.

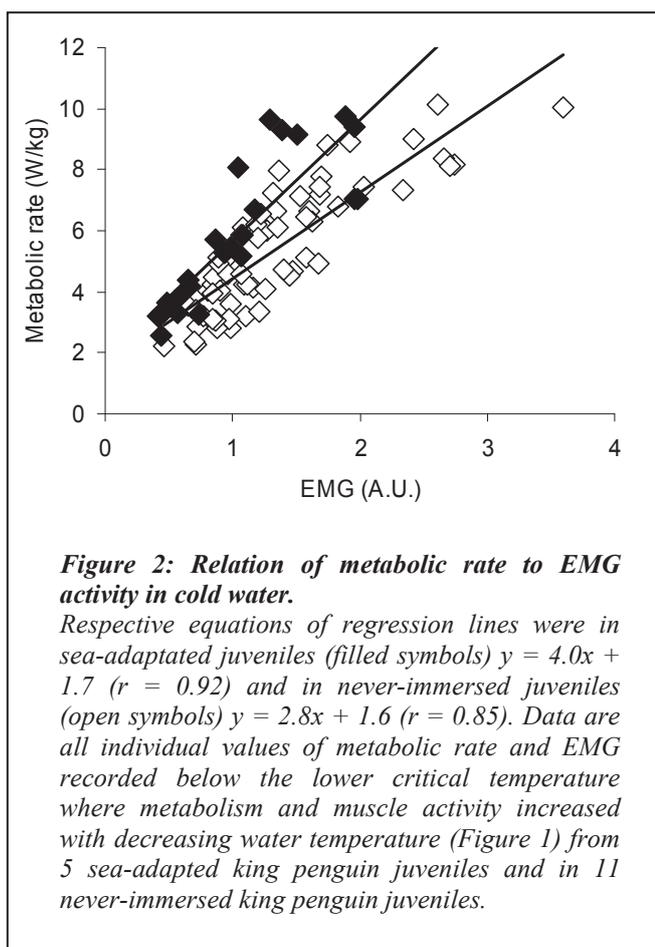
In bird, skeletal muscle is the major tissue involved in the metabolic adjustment to cold exposure, contributing to 70-80% of the regulatory thermogenesis either through an increased contractile activity (shivering or muscular activity) or in some bird species, including king penguin chicks, through non-shivering metabolic heat production (non-shivering thermogenesis) (**Hissa, 1988; Duchamp et al., 1989; Duchamp and Barré, 1993**). On shore, king penguin chicks develop non-shivering thermogenesis after cold-acclimatization (**Duchamp et al., 1989**). To test whether non-shivering thermogenesis capacity was enhanced in juveniles that had accomplished their passage from shore to marine life, we recorded EMG activity of pectoral muscle in both NI and SA penguins. EMG activity (Fig. 1C) increased linearly as T_w fell below the shivering threshold temperature (STT). STT were not significantly different

between NI and SA juveniles ($STT_{NI} = 25.3 \pm 0.7^\circ\text{C}$ and $STT_{SA} = 24.9 \pm 2.0^\circ\text{C}$). Regardless of the experimental groups, STT was $3.6 \pm 0.6^\circ\text{C}$ lower than LCT ($P < 0.05$), indicating that within this range of T_w , regulatory thermogenesis was independent of shivering. Hence, at the shivering threshold, juvenile penguins displayed a capacity for non-shivering thermogenesis that was not significantly different between experimental groups ($NST_{NI} = 1.3 \pm 0.2 \text{ W/kg}$ and $NST_{SA} = 1.3 \pm 0.4 \text{ W/kg}$, i.e., 40-45% above RMR). Although this capacity for NST in juveniles is nearly twice as high as in king penguin chicks (**Duchamp et al., 1989**), the present results highlights the fact that passage from shore to cold sea water did not enhance non-shivering heat production mechanisms in king penguin juveniles. From these results, it can be estimated that endothermy at sea would be mainly sustained by muscle activities (shivering and/or swimming) when the NST capacity would only represent less than 20% of the regulatory thermogenesis induced by cold sea water. Additionally, it is important to note that the respiratory quotient (RQ) remained stable during all the immersion protocol time, and was not significantly different between groups ($RQ_{NI} = 0.71 \pm 0.02$ and $RQ_{SA} = 0.70 \pm 0.01$). The low RQ values further indicate that king penguin juveniles relied on lipids to fuel the increased metabolic and skeletal muscle activities while immersed into cold water.

Further insight, both NI and SA juveniles exhibit a linear correlation of shivering with MR below LCT (**Fig. 2**), with the slopes of the regression lines being significantly higher in SA juveniles than in NI birds (+40%, $P < 0.05$). This indicates that below LCT, the increase of MR with the rise of EMG activity proceeds

faster in SA than in NI juveniles, as if the thermogenic efficiency of shivering was better in penguins that accomplished their passage to marine life. In turn, this data further suggests that the energy cost of muscular activity would be higher in sea-adapted juveniles. In line with this hypothesis, it has been previously reported that long-term cold exposure increased the energy cost of locomotion in endotherms lacking brown adipose tissue, such as in ducklings (**Duchamp et al., 1999**), in short-tailed opossums (**Schaeffer et al., 2005**) or in adult goats (**Schaeffer et al., 2001**). On the whole, our data suggest that the passage to an intensive life of swimming in cold water would induce a metabolic adjustment toward a relative inefficiency of muscular contractile activity, suggesting an uncoupled state in muscle energetic. The molecular basis of such muscle plasticity might be sustained by the muscular expression of some mitochondrial uncoupling proteins. Indeed, cold-induced rise in the cost of terrestrial locomotion (**Duchamp et al., 1999; Schaeffer et al., 2005**) can be associated with a muscular upregulation of avian UCP in cold-acclimated ducklings (**Raimbault et al., 2001; Rey et al., 2010**) or UCP3 in cold-exposed opossums (**Schaeffer et al., 2005**). In juvenile penguins, the passage from shore to marine life also induces an increased expression and activity of avian UCP (**Talbot et al., 2004**). Although avian UCP behaves as a true uncoupler when adequately activated (**Talbot et al., 2003; Rey et al., 2010**), we provide evidences that the primary physiological function of avian UCP is not thermogenesis otherwise NST capacity should have been greater in SA juveniles. In recent years, increasing evidence suggests that avian UCP might be broadly related to an increased oxidative

capacity of mitochondrial oxidative phosphorylation (Walter and Seebacher, 2009; Teulier et al., 2010). In line with this observation, it is suggested that, as its closest mammalian homologue UCP3 (Seifert et al., 2008), avian UCP would be implicated in the energetic handling of lipid substrates, heat production becoming a byproduct of its uncoupling activity rather than a physiological function.



Metabolic response to triglyceride infusion

To test the above hypothesis *in vivo*, we measured the metabolic effect of lipids infusion in NI and SA juveniles. To make sure that perfusion protocol was without any effect on metabolic rate, we first infused saline solution in each individual 2h before to start the infusion of

triglycerides (Fig. 3A). No change in metabolic rate was observed in both NI and SA juveniles. After the end of saline infusion, there was a long period of time (more than an hour) during which metabolic rate remained at basal level. We used this post-saline infusion values to calculate a mean resting metabolic rate in air in both NI and SA juveniles ($RMR_{NI} = 2.7 \pm 0.1$ W/kg and $RMR_{SA} = 2.9 \pm 0.1$ W/kg). On the whole, the infusion of triglycerides *in vivo* increased the metabolic rate of both NI and SA juveniles (Figure 3). In NI juveniles, triglycerides induced a transient increase in MR that peaked at 3.0 ± 0.1 W/kg (+11% above RMR, $P < 0.05$) 10 min after the start of the perfusion and returned to its basal level 45 min after the end of the infusion (Figure 3A). In SA juveniles, triglycerides triggered a rapid and sustained increase in MR that peaked at 3.6 ± 0.3 W/kg (+21% above RMR, $P < 0.05$) and remained significantly elevated 2h30 after the end of the infusion (3.2 ± 0.1 W/kg, +9% above RMR, $P < 0.05$). Calculations of areas under the curve were used to estimate the total thermogenic response of experimental groups to lipid infusion. The integrated values clearly show that triglyceride-induced increase in MR was more than 4 times higher in SA juveniles than in NI penguins (Fig. 3B). Such difference in the effect of lipid infusion upon MR cannot be ascribed to difference in energy requirement since all birds were experimented at thermoneutrality (10°C), in air with the same nutritional status. Whether lipids were differently metabolized by these birds is a question we tried to clarify by measuring plasma metabolite levels before, during and after the triglycerides infusion. Figure 4 shows that lipids infusion led to an expected

increase in plasma concentration of triglycerides (Fig. 4A), which was also associated with a concomitant increased in plasma non-esterified fatty acids (Fig. 4B) and glycerol (data not shown). These kinetics indicate that the infused triglycerides was hydrolyzed into their molecular constituents, i.e. fatty acids and glycerol. After an initial rise, the plasma concentration of all three metabolites decreased and returned to basal level 1h after the end of perfusion (Fig. 4). On the whole, the kinetic patterns of these metabolites were similar between penguin groups, indicating that lipids were similarly metabolized by NI and SA juveniles. Thus, king penguin juveniles acquire adaptive thermogenesis during their journeys at sea, a metabolic adjustment that was unraveled by a rise in plasma lipid levels. This finding is of physiological importance, since lipids are

the obvious substrates to fuel increased regulatory thermogenesis (Talbot et al., 2004, present study) and endurance metabolism in birds (Weber, 2009).

It is obvious that this lipid-induced extra metabolic rate in resting juveniles cannot be solely ascribed to skeletal muscle. For instance, liver is another metabolic active organ that could also mediate part of this lipid dependent increase in whole body oxygen consumption. Indeed, there are arguments in the literature suggesting that increased serum non-esterified fatty acids might negatively impact the efficiency of liver mitochondrial oxidative phosphorylation (Scholz et al., 1984; Roussel et al., 2004), leading to an increase in the energetic cost of mitochondrial ATP production. Nevertheless, by virtue of its large contribution to body mass and its high oxidative capacity, skeletal muscle is

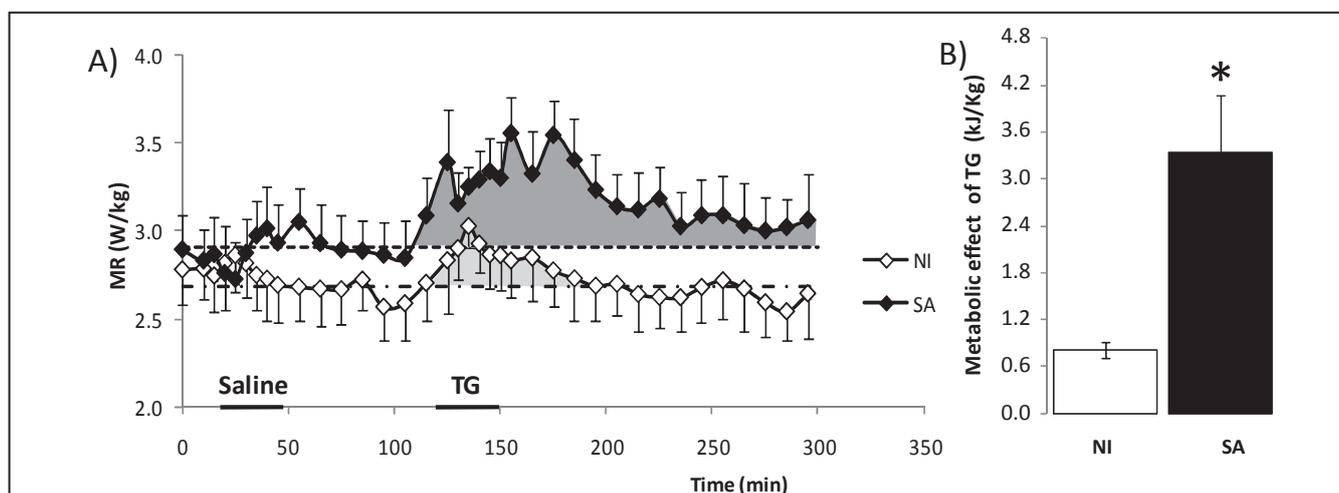
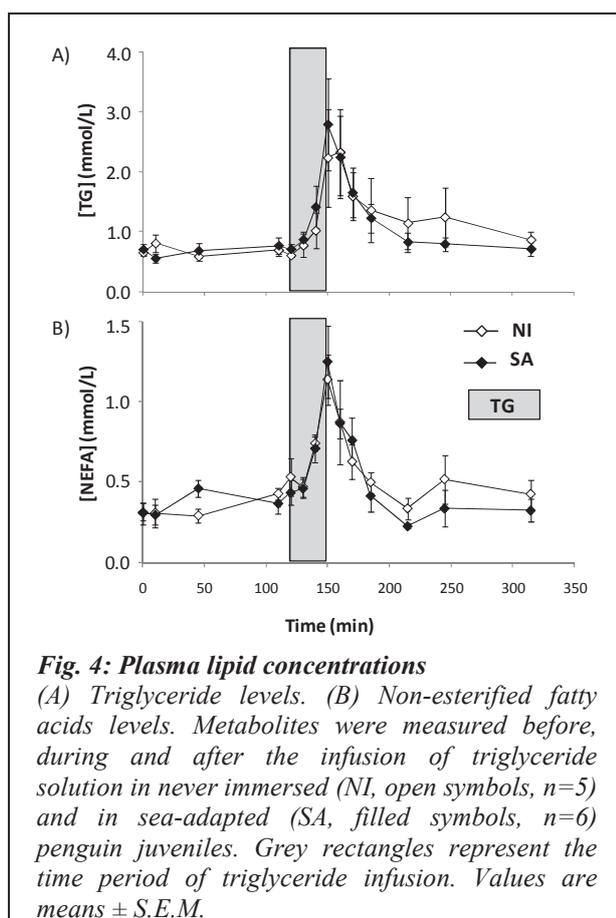


Figure 3: Metabolic response to triglyceride infusion.

(A) Evolution of metabolic rate during 320 min in never immersed (NI, open symbols, $n=5$) and in sea-adapted (SA, filled symbols, $n=6$) king penguin juveniles. At time 15 min, saline solution was infused during 30 min. After 80 min of post saline infusion, triglyceride (TG) solution was infused at time 125 min for 30 min. (B) Histograms represent the global effect of TG infusion on the metabolic rate of NI (open bar) and SA (filled bar) juveniles. For more details see "Experimental procedures" paragraph. Values are means \pm S.E.M. * $p<0.05$ significantly different from NI.



already adapted to uptake large amount of fatty acids and supply considerable metabolic heat from their oxidization. Therefore, it is likely that the present effect of lipids upon MR would mainly be due to whole animal muscle energetics. In this condition, it is particularly interesting to note that the higher effect of lipid-induced increase in MR was found in SA juveniles, which exhibited an upregulation of avian UCP in their skeletal muscles compared with NI birds (Talbot et al., 2004). Since avian UCP activity requires superoxides (Talbot et al., 2003; Rey et al., 2010), that fatty acids oxidation induces radical oxidative species production (St Pierre et al., 2002; Seifert et al., 2008), we suggest that a higher level of avian UCP would explain, at least in part, the higher thermogenic effect of lipids found in SA juveniles.

This study clearly demonstrates that king penguins mainly rely upon skeletal muscle activity to maintain their endothermy while at sea. Our results also indicate the existence of metabolic adaptation to marine life in king penguin juveniles that arises from an increase of thermogenic capacity under lipid stimulation. We suggest that this lipid dependence of regulatory thermogenesis would induce an inefficiency of muscular contractile activity. In conclusion, king penguins would stay warm into cold sea water by burning fat and swim for inefficiency.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

The present study was conducted on the Crozet archipelago (Possession Island) at the French Alfred Faure Station (46°25' S, 51°45' E) during two successive austral summers (2007-2008 and 2008-2009). According to the Agreed Measures for the Preservation of Antarctic Fauna, the project received the agreement of the French Committee for Antarctic Research (Programme 131) and conformed to the Agreed Measures for the Conservation of Antarctic and Sub-Antarctic fauna.

Animals

Juvenile king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) of both sexes, in the final stage of moulting and therefore not adapted to marine life, were captured on the nearby breeding colony at Baie du Marin. Care was taken to select birds that had not completed their moult and stand far from any water access (e.g. river or sea). Once their moult completed, these birds were used and constituted the never immersed group (NI). A second group of

juvenile birds of both sexes was caught directly on the beach, outside the breeding site. These birds had completed moulting and accomplished their passage to marine life, they formed the sea-adapted group (SA). All birds were kept in an outside enclosure, weighed every day and fed twice daily on Atlantic mackerel (up to 1 kg/day) to maintain a constant bodyweight for 3 days. Thereafter they were fasted 48 hours before experiment. By this way, penguins were deemed to be in controlled nutritional status. On completion of the study the penguins were released at the site of their capture.

Metabolic rate

Metabolic rate was measured by indirect calorimetry, using an open-circuit system previously described for measurement in penguins (Barré and Roussel, 1986). Briefly, penguins were placed in thermostated chamber with the head enclosed in a transparent respiratory hood connected to the open-circuit system for measurement of O₂ consumption and CO₂ production. During measurements, airflow through the respirometer, humidity, temperature and atmospheric pressure were monitored every 20 sec. All flows were corrected to Standard Temperature and Pressure Dry conditions (see Barré and Roussel for more details). Protocol A, penguins were fully immersed using a thermostatic chamber consisting of an insulated 70-liter polythene tank as previously described (Barré and Roussel, 1986). Water temperature (T_w) within the chamber was monitored using a digital set-point potentiometric temperature controller coupled with a heater-cooler exchanger and a water-circulating pump. Protocol B, penguins were placed at 10°C in a

thermostated respirometer chamber and allowed to rest for 5 to 8 hours.

Shivering and Temperature measurement (Protocol A)

The protocol A was devoted to the measurement of non-shivering thermogenic activity during immersion. Sixteen animals were included in this study. Eleven terrestrial juveniles with an average body mass of 8.2 ± 0.3 kg constituted the never-immersed group (NI), five other juveniles with an average body mass of 8.5 ± 0.7 kg constituted the sea-adapted group (SA). Body masses were not significantly different between groups. For this purpose, metabolic rate and electromyogram (EMG) signal were simultaneously measured at constant water temperature (ranging from 31°C to 12°C) over 15 min that followed an initial 60 min adjustment period to obtain metabolic steady state and thermal equilibrium at a given water temperature. Shivering was measured as EMG activity of the pectoral muscle. The EMG signal received from three monopolar electroded insulated except for the tips (Stabilohm 110, Ni 80% and Cr 20%, 0.12 mm diameter) and acutely inserted into the muscle 10 mm apart was monitored on MP30B-CE, Biopac System and recorded with Biopac Student Lab Pro v.3.6.7 software (Santa Barbara, CA, USA) as previously described (Teulier et al., 2010). Before the polythene tank was fulfilled with water, EMG and metabolic rate were recorded in the air. Body (esophageal) temperature (T_b) was measured using copper-constantan thermocouples connected to a Leeds and Northrup 12-channel recording potentiometer.

Catheterization, Triglyceride infusion and Plasma assays (Protocol B)

The protocol B was devoted to the study of the effect of triglyceride infusion on metabolic rate. Twenty animals were included in this study. Ten terrestrial juveniles with an average body mass of 9.1 ± 0.3 kg constituted the never-immersed group (NI), ten other juveniles with an average body mass of 9.2 ± 0.2 kg constituted the sea-adapted group (SA). Body masses were not significantly different between groups. The day before experiment, two silicone-polyethylene vascular catheters were implanted under local anesthesia in the marginal vein of the flipper in both sides. One vascular catheter (Braun Introcath 20G $\frac{1}{4}$, 1.1×32 mm) was connected to a continuous infusion apparatus (Kd Scientific, model 100, serial 931, USA) and used for saline or drug infusion. The second catheter (BD Insyte-W 16GA 1.17 IN, 1.7×45 mm) was used for blood sampling. Note that 12 cm of silastic extended with 2.5 meters of Portex fine bore polythene tube was introduced into the catheter to lessen the impact of vasoconstriction during blood sampling. Once equipped, the bird was positioned in the thermostatic chamber, at thermoneutrality (10°C) for the night. On the day of experiment, and after an initial 60-min adjustment period, metabolic rate was continuously recorded over two successive experimental periods: a 110-min saline period (consisted of a 30-min 0.9% NaCl infusion and a 80-min post-saline periods) followed by a 150-min triglycerides period (consisted of a 30-min triglycerides infusion (Intralipid 20%, Fresenius Kabi AB, Sweden) and a 120-min post-triglyceride periods). Control experiments were also conducted with

glycerol (2.2 g/100 mL) in place of triglycerides in nine individuals (5 NI and 4 SA), no effect of glycerol infusion upon metabolic rate was found (data not shown). Infusion rate was 1 mL/min. Blood aliquots of 700 μL were taken at different time point, centrifuged at 3,500 g for 5 min at 4°C and the resulting plasma samples stored at -80°C . Plasma triglyceride, glycerol and non-esterified fatty acid concentrations were spectrophotometrically determined by using commercially available kits from Biomérieux (triglycerides), Randox (glycerol) or Wako chemicals (non-esterified fatty acids).

Statistical analysis

Relations between integrated EMG activity and T_w , or metabolic rate and T_w were expressed by two linear regression lines (Scholander et al., 1950; Barré et al., 1985) that intersect at the shivering threshold temperature (STT) or at the lower critical temperature (LCT), respectively. To draw these regression lines, we statistically determined by a paired-ANOVA test at which ambient temperature EMG activity or metabolic rate became significantly different from basal values, respectively. These values and those measured at lower T_w were then integrated in a second linear regression line distinct from the basal linear regression line. Values are means \pm s.e.m. When not detailed, the statistical significance of observed variations was assessed using one-way ANOVA. Differences between means were subsequently tested by t-test.

Acknowledgments

This work was funded by grants from CNRS and Institut Paul Emile Victor. L.T. was in receipt of a French Research Council fellowship.

REFERENCES

1. Pütz, K. (2002). Spatial and temporal variability in the foraging areas of breeding king penguins. *The Condor*. 104, 528-538.
2. Charrassin, J. B. and Bost, C. A. (2001). Utilization of the oceanic habitat by king penguins over the annual cycle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 221, 285-297
3. Barré, H., and Roussel, B. (1986). Thermal and metabolic adaptation to first cold-water immersion in juvenile penguins. *Am. J. Physiol.* 251, R456-R462.
4. Duchamp, C., Barré, H., Delage, D., Rouanet, J.L., Cohen-Adad, F., and Minaire, Y. (1989). Nonshivering thermogenesis and adaptation to fasting in king penguin chicks. *Am. J. Physiol.* 257, R744-R751.
5. Cherel, Y., Ridoux, V. and Rodhouse, P. G. (1996). Fish and squid in the diet of king penguin chicks, *Aptenodytes patagonicus*, during winter at sub-antarctic Crozet Islands. *Marine Biology*. 126, 559-570.
6. Raclot, T., Groscolas, R. and Cherel, Y. (1998). Fatty acid evidence for the importance of myctophid fishes in the diet of king penguins, *Aptenodytes patagonicus*. *Marine Biology*. 132, 523-533.
7. Bénistant, C., Duchamp, C., Cohen-Adad, F., Rouanet, J. L. and Barre, H. (1998). Increased in vitro fatty acid supply and cellular transport capacities in cold-acclimated ducklings (*Cairina moschata*). *Am. J. Physiol.* 275, R683-90.
8. Vaillancourt, E., Prud'homme, S., Haman, F., Guglielmo, C. G. and Weber, J. M. (2005). Energetics of a long-distance migrant shorebird (*Philomachus pugnax*) during cold exposure and running. *J. Exp. Biol.* 208, 317-25.
9. Talbot, D.A., Duchamp, C., Rey, B., Hanuise, N., Rouanet, J.L., Sibille, B., and Brand, M.D. (2004). Uncoupling protein and ATP/ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins. *J. Physiol.* 558, 123-135.
10. Scholander, P.F., Hock, R., Walters, W., Johnson, F., and Irving, L. (1950). Heat regulation in some arctic and tropical mammals and birds. *Biol. Bull.* 99, 237-258.
11. Dumonteil, E., Barré, H., Rouanet, J.L., Diarra, M., and Bouvier, J. (1994). Dual core and shell temperature regulation during sea acclimatization in Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*). *Am. J. Physiol.* 266, R1319-R1326.
12. Kooyman, G.L., Davis, R.W., Croxall, J.P., and Costa, D.P. (1982). Diving depths and energy requirements of king penguins. *Science* 217, 726-727.
13. Culik, B.M., Pütz, K., Wilson, R.P., Allers, D., Lage, J., Bost, C.A., and Le Maho, Y. (1996). Diving energetics in king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Exp. Biol.* 199, 973-983.
14. Froget, G., Butler, P.J., Woakes, A.J., Fahlman, A., Kuntz, G., Le Maho, Y., and Handrich, Y. (2004). Heart rate and energetics of free-ranging king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Exp. Biol.* 207, 3917-3926.
15. Groscolas, R., Viera, V., Guerin, N., Handrich, Y., and Côté, S.D. (2010). Heart rate as a predictor of energy expenditure in undisturbed fasting and incubating penguins. *J. Exp. Biol.* 213, 153-160.
16. Handrich, Y., Bevan, R.M., Charrassin, J.B., Butler, P.J., Pütz, K., Woakes, A.J., Lage, J., and Le Maho, Y. (1997). Hypothermia in foraging king penguins. *Nature* 388, 64-67.

17. Schmidt, A., Alard, F., and Handrich, Y. (2006). Changes in body temperatures in king penguins at sea: the result of fine adjustments in peripheral heat loss? *Am. J. Physiol.* 291, R608-R618.
18. Hissa, R. (1988). Controlling mechanisms in avian temperature regulation: a review. *Acta Physiol. Scand.* 132, 1-148.
19. Duchamp, C., and Barré, H. (1993). Skeletal muscle as the major site of nonshivering thermogenesis in cold-acclimated ducklings. *Am. J. Physiol.* 265, R1076-R1083.
20. Duchamp, C., Marmonier, F., Denjean, F., Lachuer, J., Eldershaw, T.P.D., Rouanet, J.L., Morales, A., Meister, R., Bénistant, C., Roussel, D., and Barré, H. (1999). Regulatory, cellular and molecular aspects of avian muscle nonshivering thermogenesis. *Ornis Fenn.* 76, 151-165.
21. Schaeffer, P.J., Villarin, J.J., Pierotti, D.J., Kelly, D.P., and Lindstedt, S.L. (2005). Cost of transport is increased after cold exposure in *Monodelphis domestica*: training for inefficiency. *J. Exp. Biol.* 208, 3159-3167.
22. Schaeffer, P.J., Hokanson, J.F., Wells, D.J., and Lindstedt, S.L. (2001). Cold exposure increases running $\text{Vo}_{2\text{max}}$ and cost of transport in goats. *Am. J. Physiol.* 280, R42-R47.
23. Raimbault, S., Dridi, S., Denjean, F., Lachuer, J., Couplan, E., Bouillaud, F., Bordas, A., Duchamp, C., Taouis, M., and Ricquier, D. (2001). An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem. J.* 353, 441-444.
24. Rey, B., Roussel, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rouanet, J.L., Desplanches, D., Sibille, B., Servais, S., and Duchamp, C. (2010). Up-regulation of avian uncoupling protein in cold-acclimated and hyperthyroid ducklings prevents reactive oxygen species production by skeletal muscle mitochondria. *BMC Physiol.* 10, 5.
25. Talbot, D.A., Hanuise, N., Rey, B., Rouanet, J.L., Duchamp, C., and Brand, M.D. (2003). Superoxide activates a GDP-sensitive proton conductance in skeletal muscle mitochondria from king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 983-98.
26. Walter, I., and Seebacher, F. (2009). Endothermy in birds: underlying molecular mechanisms. *J. Exp. Biol.* 212, 2328-2336.
27. Teulier, L., Rouanet, J.L., Letexier, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rey, B., Duchamp, C., and Roussel, D. (2010). Cold-acclimation-induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency. *J. Exp. Biol.* 213, 2476-2482.
28. Seifert, E.L., Bézaire, V., Estey, C., and Harper, M.E. (2008). Essential role for uncoupling protein-3 in mitochondrial adaptation to fasting but not in fatty acid oxidation or fatty acid anion export. *J. Biol. Chem.* 283, 25124-25131.
29. Weber, J.M. (2009). The physiology of long-distance migration: extending the limits of endurance metabolism. *J. Exp. Biol.* 212, 593-597.
30. Scholz, R., Schwabe, U., and Soboll, S. (1984). Influence of fatty acids on energy metabolism. 1. Stimulation of oxygen consumption, ketogenesis and CO_2 production following addition of octanoate and oleate in perfused rat liver. *Eur. J. Biochem.* 141, 223-230.

31. Roussel, D., Dumas, J.F., Simard, G., Malthiery, Y., and Ritz, P. (2004). Kinetics and control of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria after dexamethasone treatment. *Biochem. J.* 382, 491-499.
32. St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., and Brand M.D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277, 44784-44790.

Quatrième partie

Discussion générale

&

Perspectives

Mon travail de thèse avait pour but de caractériser les adaptations métaboliques participant à la thermogénèse de régulation en réponse à une contrainte thermique froide de longue durée. Dans l'optique de répondre en partie à cette question très générale, nous nous sommes concentrés sur deux espèces d'oiseaux, l'une sauvage et soumise à des conditions naturelles relativement froides – le Manchot Royal (*Aptenodytes patagonicus*), et l'autre domestique et donc soumise artificiellement à des températures basses en laboratoire – le caneton de Barbarie (*Cairina moschata*).

Le point commun de ces deux espèces qui nous intéressait est l'existence d'un processus thermogène indépendant de la contraction musculaire. Il s'agit de la thermogénèse sans frisson (NST pour *Non shivering Thermogenesis*), mécanisme décrit chez ces deux espèces depuis les années 1980 (**Barré et al., 1985 ; Duchamp et al., 1989 ; revue dans Duchamp et al., 1999**). Ces deux modèles nous ont permis de comparer les adaptations métaboliques lors d'une acclimatation au froid (induite de façon artificielle et contrôlée) et lors d'une adaptation à un stress thermique froid important (transition de la vie terrestre à la vie marine).

Par une approche intégrée, exploitant de nombreux champs d'investigation de la physiologie, du métabolisme *in vivo* à la biologie moléculaire, nous avons participé à la caractérisation de la thermogénèse sans frisson. Bien connu chez les mammifères, ce mécanisme de thermogénèse facultative est encore largement débattu chez l'oiseau. Nous avons donc essayé de replacer nos résultats dans un contexte éco-physiologique en apportant quelques suggestions quant au rôle fonctionnel de cette NST chez certaines espèces aviaires, en particulier via un potentiel mécanisme UCP dépendant (**Criscuolo et al., 2005a**).

Dans un premier temps, je rappellerai les principaux résultats de nos études. Les figures représentées ici ne sont que des illustrations des résultats obtenus et présentés plus rigoureusement dans chaque étude.

I. Rappel des principaux résultats

Pour tenter de comprendre les différents mécanismes entrant dans la thermogenèse de régulation, les études expérimentales composant ma thèse sont divisées en deux grands axes [Figure 4.1] :

- la caractérisation de l'ontogenèse et de la régulation de la thermogenèse sans frisson chez un oiseau en croissance en fonction d'une acclimatation contrôlée (**Etudes 1 et 2**).
- l'étude des processus métaboliques soutenant une demande accrue en substrats énergétiques, nécessaire à la production de chaleur induite pour lutter contre un stress froid (**Etude 3**)

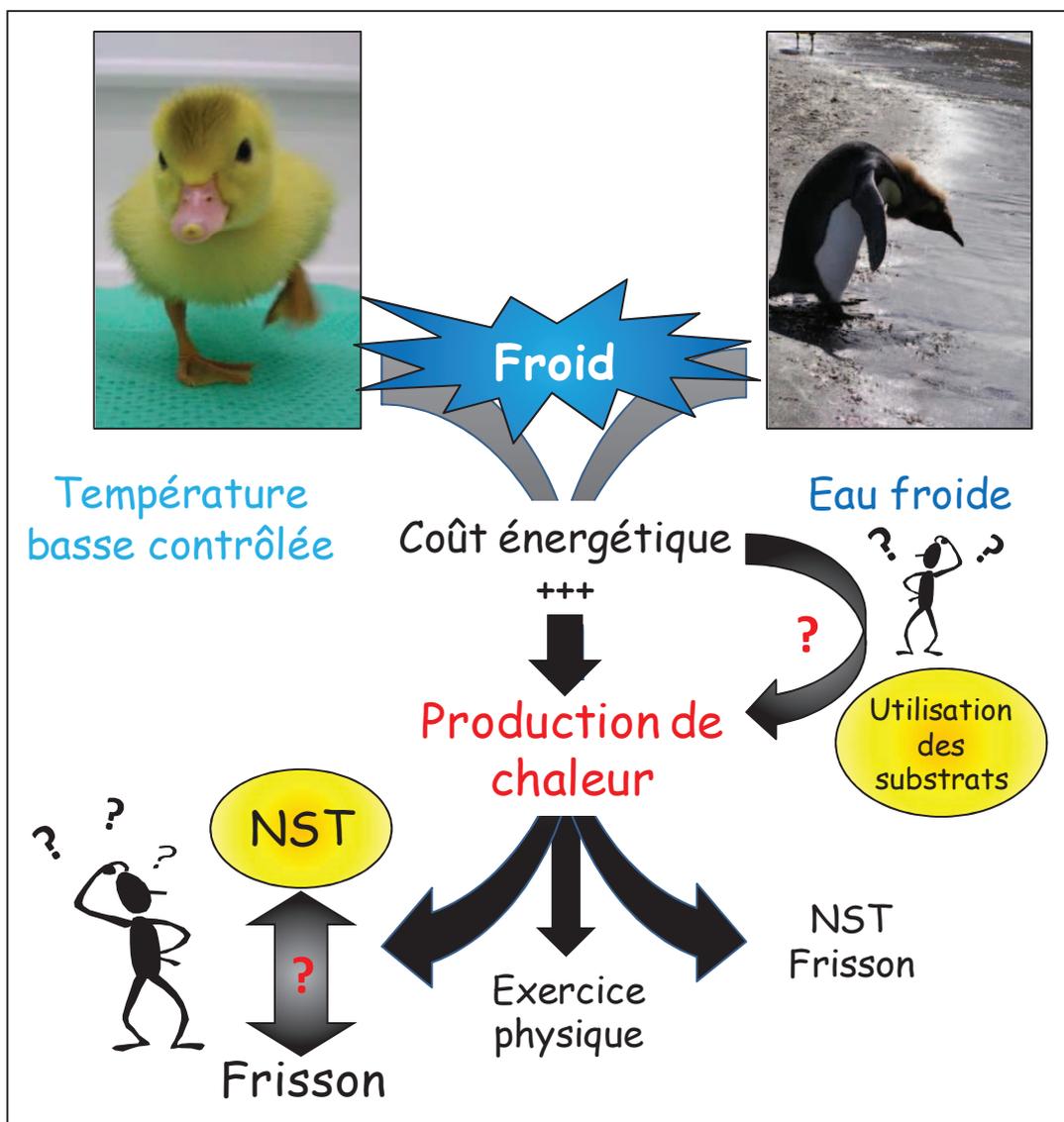


Figure 4.1: Rappel schématique des différentes études replacées dans leur contexte scientifique. Le caneton de Barbarie et le Manchot Royal sont deux oiseaux couramment utilisés au laboratoire pour étudier les mécanismes de thermogenèse de régulation (NST et Frisson).

1. La NST, un mécanisme adaptatif répondant à une plasticité phénotypique

a. Une capacité d'ajustement de la NST en fonction de l'intensité du stress thermique

Dans nos deux premières études, nous avons démontré que la thermogenèse sans frisson résultait d'une plasticité phénotypique finement régulée. En effet, que ce soit en réponse à des variations de température (**Etude 1**) ou de durée d'acclimatation (**Etude 2**), les canetons sont capables d'ajuster leur capacité de NST en fonction de l'intensité du froid auquel ils sont soumis [Figure 4.2-B].

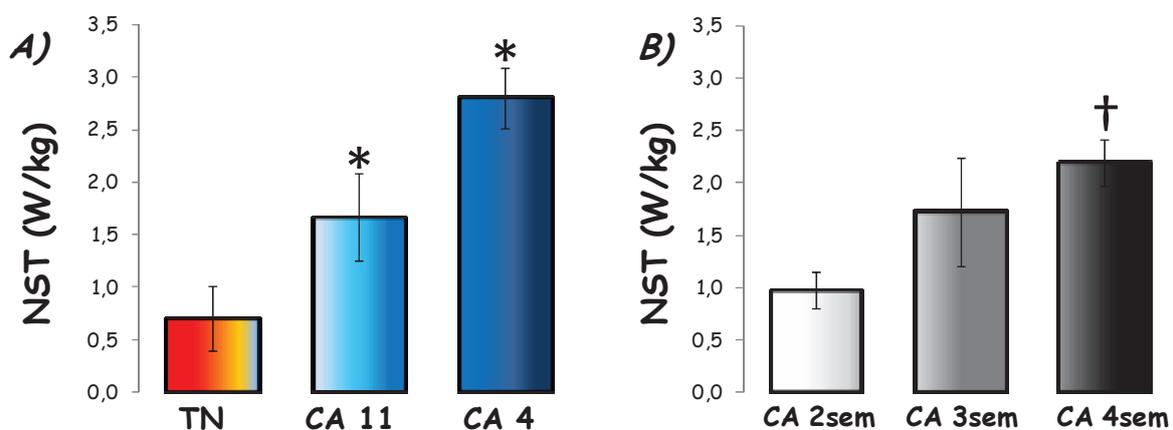


Figure 4.2 : Relation entre capacité de NST et intensité du froid auquel les canetons ont été exposés. En A) Résultats tirés de l'Etude 1. Représentation de la NST en fonction des groupes de canetons élevés à thermoneutralité (TN), à 11°C (CA 11) et à 4°C (CA 4) pendant 4 semaines. En B), Résultats tirés de l'Etude 2. La NST est représentée en fonction de la durée d'acclimatation à 4°C (CA 2sem : 2 semaines, CA 3sem : 3 semaines, CA 4sem : 4 semaines d'acclimatation).

* : significativement différent de TN ($p < 0.05$) ; † : significativement différent de CA-2w ($p < 0.05$).

b. Une régulation de la NST à thermoneutralité

Au cours de la deuxième étude, nous nous sommes intéressés à l'ontogenèse de la thermogenèse sans frisson. En accord avec notre hypothèse de départ, nous avons retrouvé une mise en place progressive de la NST chez les canetons acclimatés au froid en fonction de l'âge (**Etude 2** et **figure 4.2-B**). Cependant, contre toute attente, nous avons démontré l'existence d'une thermogenèse sans frisson chez des canetons âgés de 3 semaines, élevés à thermoneutralité (TN). Cette capacité de NST était équivalente à celle développée par les canetons acclimatés au froid (CA) depuis une semaine. Cependant avec l'âge, elle disparaissait chez les canetons TN [Figure 4.3], alors qu'elle augmentait chez les CA [Figure 4.2-B].

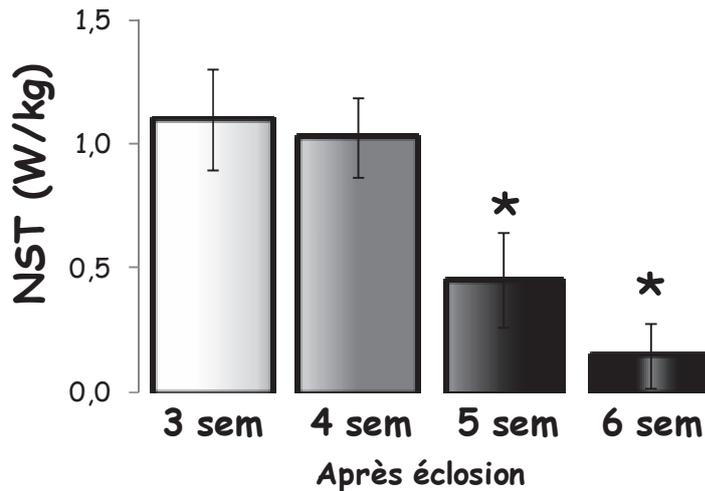


Figure 4.3 : Relation entre NST et âge chez des canetons élevés à thermoneutralité. Résultats tirés de l'étude 2 présentant l'évolution des capacités de NST chez des canetons élevés à 25°C âgés de 3 à 6 semaines.

* : significativement différent de 3 sem et de 4 sem ($p < 0.05$).

2. Corrélation de l'expression de l'UCP aviaire avec la température d'acclimatation

Ces différentes capacités de NST développées par les canetons ont pu être corrélées à différents niveaux d'expression relative de l'UCP aviaire, ce qui suggère fortement son implication dans les mécanismes thermogènes. Effectivement, l'abondance relative des transcrits de l'UCP aviaire au niveau musculaire était inversement proportionnelle à la température d'acclimatation [Figure 4.4-A]. De plus même si elle a été calculée à partir des moyennes, la relation « capacité de NST développée par les canetons TN, CA11 et CA4 en fonction de l'expression relative de l'avUCP » était linéaire [Figure 4.4-B].

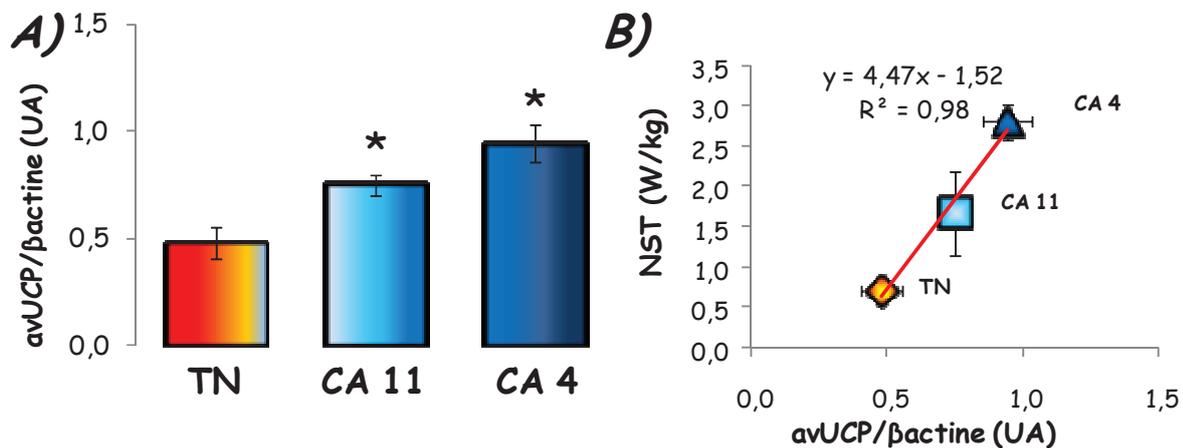


Figure 4.4 : Expression relative de l'UCP aviaire dans le muscle squelettique des canetons en fonction de la température d'acclimatation (A) et illustration de la corrélation entre UCP aviaire et NST en fonction de la température d'acclimatation (B). L'expression relative de l'UCP aviaire est calculée par le rapport entre avUCP et β -actine, considérée comme le gène de référence.

* : significativement différent de TN ($p < 0.05$).

Contrairement à celle du caneton de Barbarie, la mise en place de la thermogenèse de régulation chez le manchot royal est mieux décrite. En effet, Duchamp et ses collaborateurs ont montré la mise en place progressive des mécanismes de thermogenèse de régulation suivant les étapes de développement du poussin (Duchamp et al., 2002) illustrée par la **figure 4.5**. Une étape clé de la vie du manchot royal nous a plus particulièrement intéressés. Il s'agit de la transition métabolique entre la vie terrestre et la vie marine, représentant un challenge énergétique majeur!

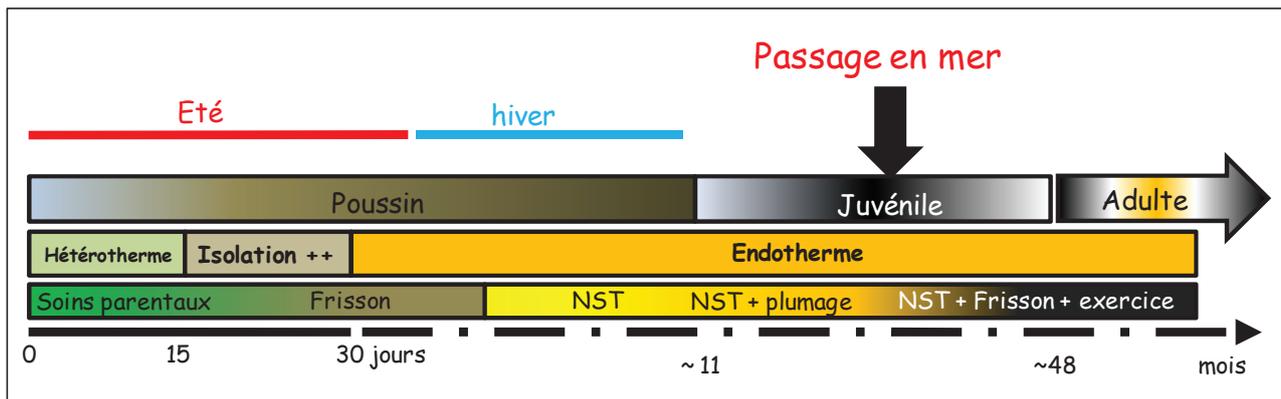


Figure 4.5 : Description de la mise en place des mécanismes de régulation thermique du manchot royal. D'après Duchamp et al., 1989 ; Duchamp et al., 2002 .

Nous avons cherché à caractériser les mécanismes métaboliques impliqués dans l'apport accru en substrats énergétiques, nécessaires à une augmentation de production de chaleur.

3. Le métabolisme lipidique, au cœur de la réponse adaptative

La troisième étude s'appuie sur des résultats antérieurs montrant une augmentation de la production de chaleur (thermogenèse de régulation) et une augmentation des acides gras libres lors du passage en mer chez le manchot royal juvénile (Talbot et al., 2004). D'après la littérature, les lipides sont impliqués dans le découplage mitochondrial et clairement identifiés comme étant les substrats principaux soutenant une augmentation du métabolisme due à une activité thermogène et/ou physique intenses (Vaillancourt et al., 2005 ; Weber, 2009). Nous avons donc induit artificiellement un apport en lipides (en perfusant une suspension de triglycérides) pour observer ses effets sur le métabolisme *in vivo* chez des manchots avant et après la mise en place des ajustements métaboliques induits par la vie marine. Pour valider le fait que les triglycérides perfusés étaient bien métabolisés, nous avons établi la cinétique de concentration plasmatique des TG, glycérol et acides gras, similaire chez les deux groupes expérimentaux. Cela suggérait que les manchots, adaptés ou non à la vie marine, étaient capables de cataboliser les métabolites

lipidiques à vitesse équivalente. Cependant l'étude cinétique ne nous renseignait pas sur le devenir de ces métabolites, ces derniers pouvant être redirigés vers la voie de la lipogenèse pour constituer des réserves énergétiques ou être utilisés comme substrat énergétique via une stimulation de processus oxydatifs. D'où l'intérêt de regarder l'effet de la perfusion sur le métabolisme *in vivo*. Nos résultats montrent un effet stimulant de la perfusion de TG sur le métabolisme de repos chez les manchots adaptés à la vie marine [Figure 4.6]. Ce phénomène n'étant pas observé chez le groupe témoin et se produisant à des QR très bas (0,70), on peut en tirer la conclusion suivante : l'adaptation à la vie marine induit une augmentation des capacités d'oxydation lipidique.

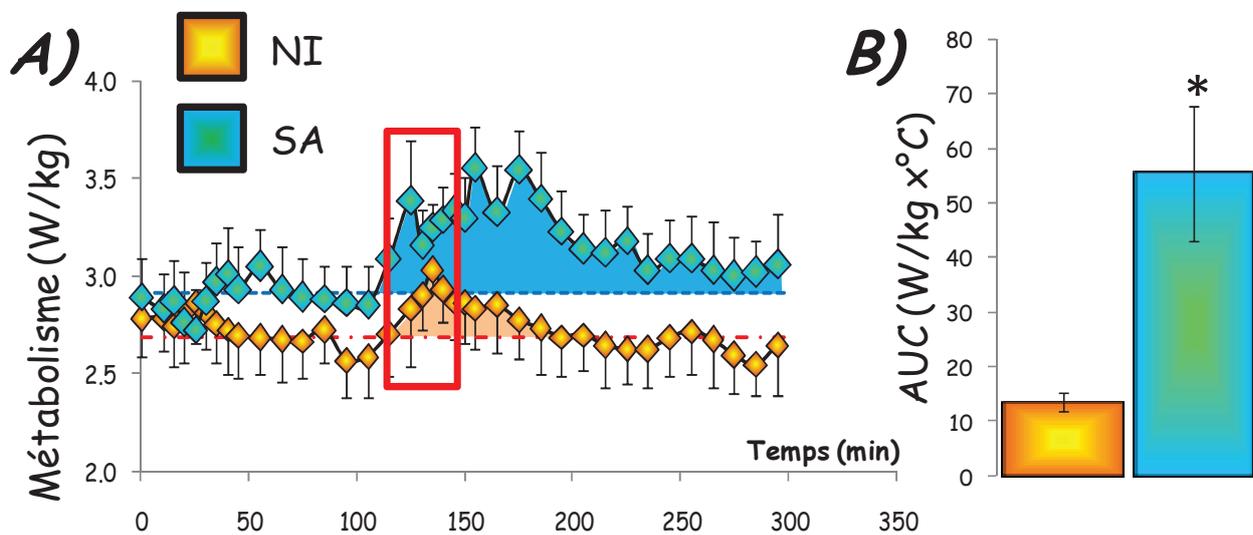


Figure 4.6 : Effet de la perfusion de triglycérides sur le métabolisme *in vivo* de manchots royaux juvéniles. Le rectangle rouge représente la perfusion de triglycérides. NI : Never Immersed, SA : Sea-Adapted, AUC : Area Under Curve.

* : significativement différent de NI ($p < 0.05$)

Chacun de ces résultats se retrouve dans les articles publiés ou soumis constituant les études expérimentales présentées dans ma thèse. En conséquence, ces résultats ont déjà été discutés de façon approfondie. De fait, dans la partie suivante intitulée « Discussion générale », nous allons développer une vision plus intégrative des mécanismes de thermorégulation, et principalement de la NST.

II. Discussion générale

1. Vers une vision plus intégrée de la thermogénèse sans frisson

a. Existence encore controversée chez les Oiseaux

Bien que nos résultats prouvent encore une fois l'existence d'un mécanisme thermogène indépendant de la contraction musculaire chez le caneton de Barbarie, on ne peut pas généraliser son existence à toutes les espèces. En effet, la bibliographie fait toujours preuve d'un scepticisme autour de l'existence de cette NST chez l'Oiseau (revue dans **Hohtola, 2004**). L'auteur explique que le frisson thermique n'a pas, comme on pourrait le penser, un effet délétère sur les fonctions de relation (locomotion et nutrition). Il cite en ce sens plusieurs études suggérant d'une part, que les animaux adaptés au froid peuvent parfois frissonner pour réguler leur température interne et d'autre part que le frisson n'empêche pas la locomotion. De fait, l'argument misant sur l'aspect plus « confortable » de la NST par rapport au frisson ne semble pas satisfaisant. De plus, il indique que chez les pigeons, il n'y pas de NST car il n'y pas de différence entre la température critique inférieure et la température d'apparition du frisson. Il explique cette différence par la manière de mesurer le frisson dans les études précédentes menées au laboratoire. En effet, il était uniquement mesuré à partir du muscle gastrocnémien chez le caneton et non sur le pectoral comme c'était le cas chez le pigeon. Cependant, **Barré et collaborateurs** ont réalisé ces mesures et n'ont pas montré de différence entre les groupes musculaires (**Barré et al., 1985**). De plus, chez les oisillons nidifuges et notamment chez le canard, la chaleur produite provient principalement des muscles des pattes, plus matures que le pectoral (**Choi et al., 1993**, cité dans **Visser et Ricklefs, 1995**). Enfin chez le caneton de Barbarie, la NST a de nombreuses fois fait l'objet de publications de notre laboratoire. Depuis plus de 20 ans, la répétitivité des résultats obtenus (voir **tableau 4.1**) réfute tout de même l'hypothèse que le frisson est le seul mécanisme producteur de chaleur chez les oiseaux. Les autres études menées sur la thermorégulation aviaire prennent tout de même en compte l'existence de la NST, notamment pour expliquer une production de chaleur plus importante chez les canetons par rapport aux poussins de dinde et poule après éclosion (**Nichelmann et Tzschentke, 2002**).

Cette dernière étude montre d'ailleurs une capacité thermogène présente chez les 3 espèces nidifuges de façon précoce (avant même l'éclosion), ce qui nous a amené à nous poser la question suivante : la NST n'aurait-elle pas un rôle important à jouer dans la mise en place de l'homéothermie chez les Oiseaux nidifuges ? Cela soulève l'interrogation sur la signification éco-physiologique d'un tel mécanisme thermogène...

	D.A (sem)	MC (kg)	TCI (°C)	Tf (°C)	RMR (W.kg ⁻¹)	NST (W.kg ⁻¹)	% augmentation	Réf
TN	3	0,75	22,6	19,0	6,27	0,85	+550%	Barré et al., 1985
CA		0,45	22,3	8,1	9,32	5,53		
TN	4	1,19	25,3	22,9	5,60	0,70	+300%	Etude 1
CA		1,25	19,5	6,0	6,30	2,80		
TN	5	0,96	23,7	19,7	6,53	0,98	+430%	Barré et al., 1986
CA		0,92	23,7	2,5	7,58	5,26		
TN	2	0,47	22,4	19,6	6,90	1,10	NS	
CA		0,41	17,8	15,0	7,60	0,97		
TN	3	0,78	22,2	18,3	6,61	1,03	+67%	Etude 2
CA		0,72	20,0	13,2	6,97	1,72		
TN	4	1,38	23,2	21,0	5,42	0,45	+386%	
CA		1,09	19,9	10,7	6,29	2,19		
TN	5	1,75	19,8	19,1	4,75	0,15	+766%	
CA		1,45	20,8	13,1	5,66	1,30		

Tableau 4.1. Effet de la durée d'acclimatation sur différents paramètres physiologiques. Les canetons CA étaient acclimatés à 4°C. D.A : durée d'acclimatation ; MC : masse corporelle ; TCI : température critique inférieure ; Tf : température d'apparition du frisson ; RMR : métabolisme de repos (Resting Metabolic Rate) ; NST ; Non Shivering Thermogenesis ; Réf : références bibliographiques.

b. Une stratégie nécessaire pour les oiseaux nidifuges...

Il est reconnu depuis longtemps que la NST est présente chez certains mammifères nouveau-nés (revue dans **Jansky, 1973**). En condition environnementale défavorable, la NST joue alors un rôle prépondérant dans la survie des petits, car les soins prodigués par les parents ne sont pas aussi performants que chez les Oiseaux. Cependant à l'intérieur de ce groupe, comme explicité dans les rappels bibliographiques (cf. **Intro § II.3**), il existe une dichotomie marquée entre espèces nidicoles et nidifuges. Chez ces derniers, qui éclosent duvetés et capables d'assumer la plupart des fonctions de relation dès l'éclosion, les soins parentaux voués à une protection thermique ne sont pas aussi développés. Ceci est d'autant plus vrai chez les Anatidés et les Gallinacés qui sont caractérisés par une couvée généralement nombreuse (**Winkler et Walters, 1983**). De fait, l'oisillon doit arriver à réguler sa température corporelle de façon autonome. Couramment décrit dans la bibliographie (**Marjoniemi et Hohtola, 1999**), le frisson semble être le mécanisme prépondérant de thermorégulation précoce. Pourtant, d'après notre deuxième étude, les canetons de Barbarie âgés de 20 jours et élevés à thermoneutralité possèdent une capacité de NST non négligeable. Cette thermogenèse sans frisson disparaît ensuite progressivement au cours de la croissance. Ce résultat étonnant, car démontrant pour la première fois le caractère précoce de la NST, illustre à nouveau les notions de compromis dans la théorie des traits

d'histoire de vie (revue dans **Zéra et Harshman, 2001**) et plus particulièrement le compromis entre croissance et thermorégulation en terme d'allocation d'énergie (**Dunn, 1980 ; Brown et Downs, 2002**) [figure 4.7]. Effectivement, dès les premières semaines post éclosion, qu'ils soient acclimatés au froid ou non, les canetons sont capables de développer une NST, qui s'amplifiera au cours d'une exposition prolongée au froid au détriment de la croissance.

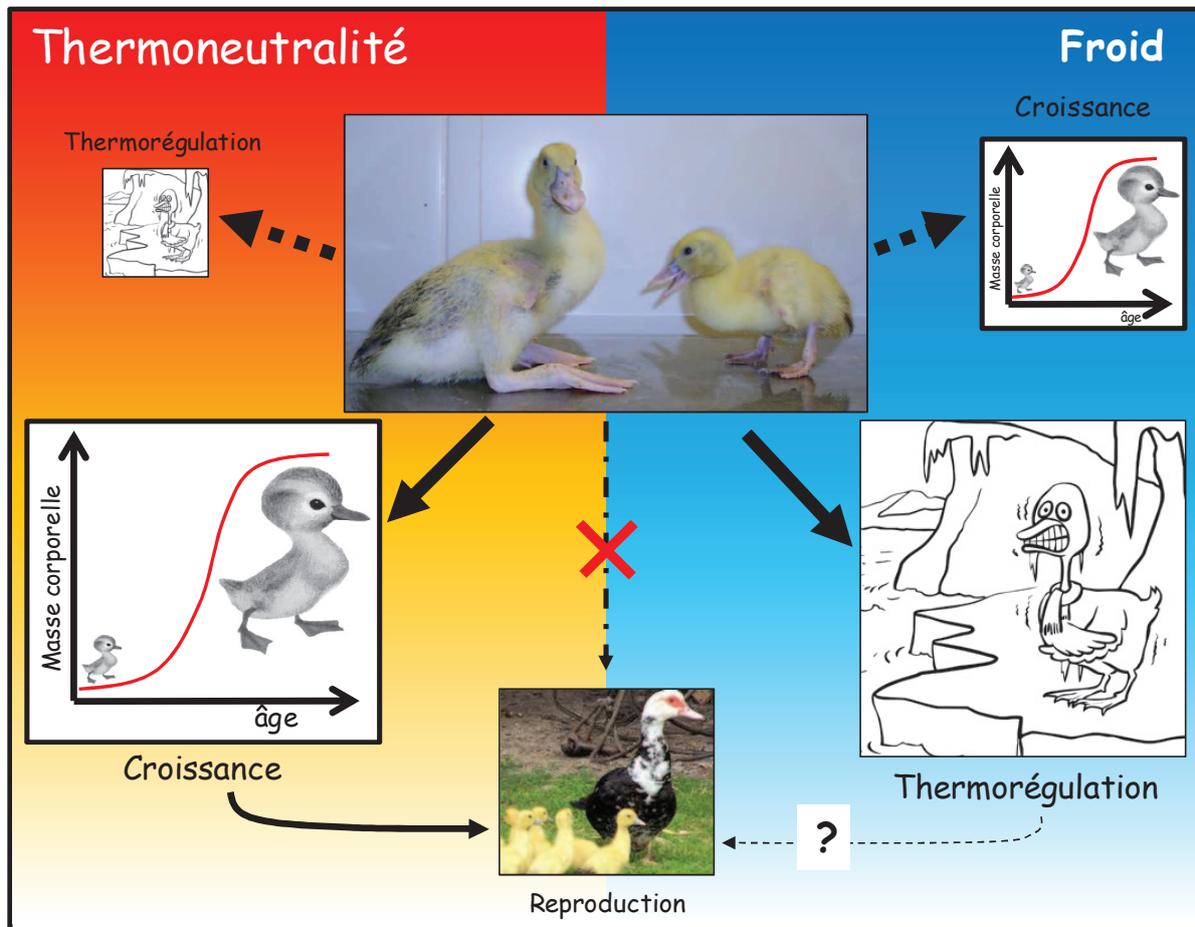


Figure 4.7 : Illustration de la théorie des traits d'histoire de vie d'un caneton. Budget énergétique à allouer à trois composantes différentes : Croissance, survie (thermorégulation) et reproduction. Chez le caneton élevé à thermoneutralité, la principale dépense énergétique est due à la croissance. Plus tard, il allouera un budget énergétique conséquent pour la reproduction. Par contre chez le caneton élevé au froid, le pool d'énergie dédié à la survie, c'est-à-dire à la thermorégulation (ici, à la NST), est considérable. Le caneton va faire un compromis entre sa croissance et sa survie immédiate. Il est d'ailleurs possible que ce compromis entrainera une capacité moindre à se reproduire.

c. ...mais délaissée par les oiseaux nidicoles aux premiers temps après éclosion.

Il est clairement admis que les oisillons nidicoles ne possèdent pas les mêmes capacités de thermogénèse. Pour la plupart d'entre eux, la régulation précoce de leur température corporelle est d'abord due aux soins parentaux les premiers jours de vie. Un frisson est cependant visible à partir de 2-3 jours (revue dans **Hohtola et Visser, 1998**). Cependant, cette activité musculaire précoce suffit-elle à maintenir constante la température corporelle lors d'une exposition à des températures froides dès l'éclosion? Si l'on prend l'exemple de notre modèle d'étude, le manchot royal, la réponse est négative. En effet, durant les quinze premiers jours de sa vie, même si le frisson apparaît dès le premier jour, le poussin de manchot royal est incapable de maintenir sa température interne sans s'abriter sous la plaque incubatrice de l'adulte. Cette inefficacité du frisson est notamment due à une immaturité des tissus musculaires chez ces oiseaux (**Duchamp et al., 2002**) commune aux oisillons nidicoles (revue dans **Hohtola et Visser, 1998**). Mais à partir d'une quinzaine de jours, le jeune poussin acquiert une capacité d'homéothermie endothermique grâce à deux paramètres concomitants : une amélioration du pouvoir isolant de son duvet et un frisson thermique plus efficace [**Figure 4.5**]. Un troisième paramètre va lui permettre d'être de plus en plus autonome thermiquement : le rapport surface/volume va évoluer de façon favorable pour limiter les échanges de chaleur (par conduction, convection et radiation) avec l'environnement. Cette modification morphologique est d'autant plus efficace que la croissance est rapide (**Duchamp et al., 2002 ; Raccurt et al., 2008**), ce qui est le cas des oiseaux nidicoles (**Ricklefs, 1979** cité dans **Tortosa et Castro, 2003**). Rappelons que l'acquisition d'un duvet et un taux de croissance élevé sont deux composantes entraînant une dépense énergétique majeure (**Pearson, 1998 ; Dawson et al., 2005**), ce qui nécessite des besoins nutritionnels importants. De fait, le comportement nourricier (possibilités et capacités de trouver de la nourriture) des parents est indispensable et peut rapidement devenir une contrainte limitante. Ainsi chez le manchot pygmé (*Eudyptula minor*) vivant au sud de l'Australie et en Nouvelle-Zélande et par conséquent, non soumis à la rudesse du climat antarctique, **Chiaradia** et **Nisbet** ont montré un taux de croissance affecté par l'absence de ressource alimentaire et par les performances de « foraging » des parents (**Chiaradia et Nisbet, 2006**). Cette contrainte énergétique due à la moindre disponibilité en nourriture, couplée à un stress thermique important entraîne nécessairement un déséquilibre de la balance énergétique. Ce déséquilibre s'exprime chez le poussin de manchot royal, contraint à jeuner lors de l'hiver austral (**Chérel et Le Maho, 1985**, cité dans **Chérel et al., 1987**) par un hypométabolisme (**Duchamp et al., 1989**), reflétant l'activation de mécanismes de mise en réserve et de limitation des dépenses. Le poussin est néanmoins obligé d'allouer

un certain budget énergétique pour maintenir sa température interne constante via une thermogénèse sans frisson (**Duchamp et al., 1989**).

d. NST versus Frisson : une question de coût ?

Le fait qu'en période de jeûne chronique, le manchot arrive à développer une capacité de NST, nous renseigne sur le coût énergétique potentiel de ce processus par rapport à celui engendré par le frisson.

D'après la théorie des traits d'histoire de vie, tout compromis est régi par la loi du cout-bénéfice (revue dans **Zera et Harshman, 2001**). Si l'on considère la NST et le frisson comme un continuum et non comme deux mécanismes s'excluant l'un l'autre, on peut penser que l'animal peut préférer le frisson lors d'une exposition aigue et réguler sa température interne via la NST lors d'une exposition chronique. Cela sous-entend que l'animal va développer la stratégie la moins « couteuse » sur le long terme. Ainsi cela pourrait en partie expliquer la capacité du poussin de manchot royal à développer une NST alors qu'il est à jeun depuis le début de l'hiver.

e. Une mise en place induite par les caractéristiques climatiques ?

Un autre paramètre peut influencer la mise en place de la NST. Il s'agit des fluctuations thermiques de l'environnement. En effet, elles peuvent être soit prévisibles en fonction des saisons (régions polaires) ou du cycle nyctéméral (régions désertiques) soit aléatoires (régions tempérées où la température ambiante peut varier de manière stochastique au cours d'une même saison).

Par analogie avec les stratégies de lutte contre le froid développées par certains ectothermes (**Voituron et al., 2002**), décrites selon deux principales théories - la surfusion et la tolérance au gel [**figure 4.8**], on peut se demander si l'induction des mécanismes thermogènes ne serait pas liée au style de variations climatiques rencontrées par l'oiseau.

Si on replace ces deux mécanismes thermogènes (frisson et NST) dans un contexte plus écologique et qu'on considère le mécanisme de NST aviaire comme une réalité physiologique, c'est-à-dire existant chez un certain nombre d'espèces, une question peut se poser : pourquoi et comment ces deux procédés cohabitent-ils à l'échelle individuelle ? L'hypothèse la plus vraisemblable serait que le frisson soit plus couteux mais plus rapide à s'activer que la NST qui nécessite une période d'induction. En d'autres termes, il existerait un compromis entre coût énergétique et réactivité pour savoir quel mécanisme utiliser.

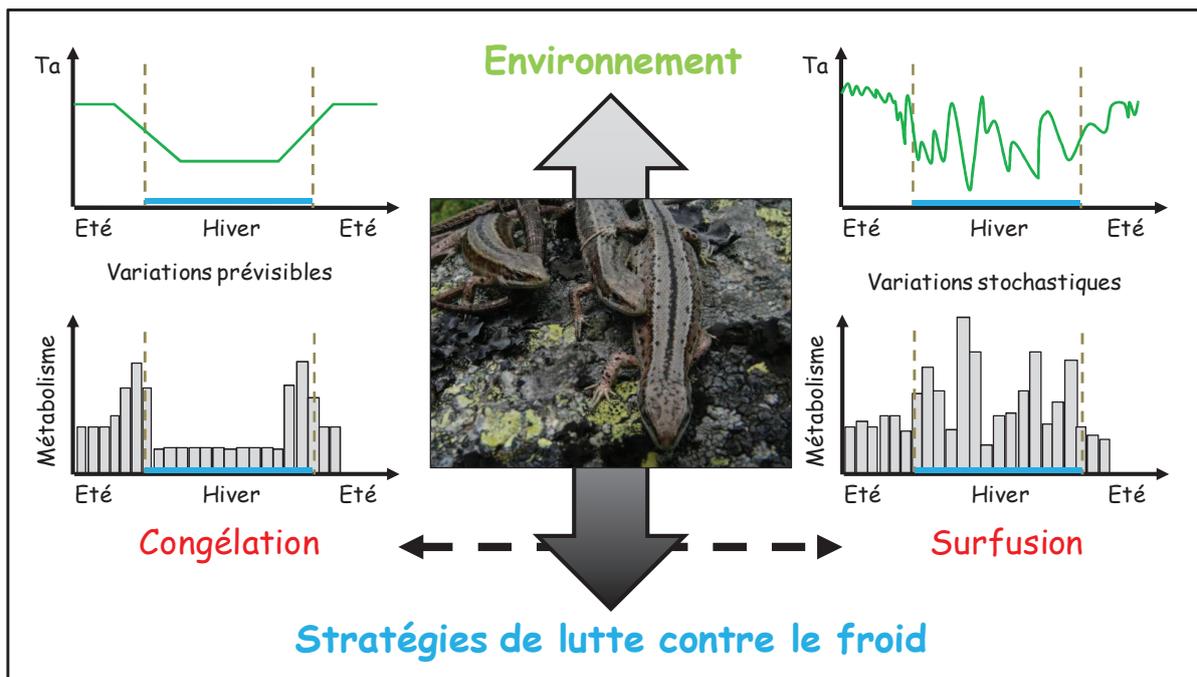


Figure 4.8 : Illustration de la relation « environnement-stratégie choisie » chez le lézard vivipare (*Lacerta vivipara*) lors d'une exposition au froid. Les deux stratégies ont des avantages et des inconvénients. Le principal avantage de la congélation est qu'à long terme, elle est plutôt économique en termes de budget énergétique. Seules les étapes d'induction et de décongélation entraînent une forte dépense énergétique. Par contre une fois congelé, l'animal est très vulnérable. Au contraire, la surfusion permet à l'ectotherme, en abaissant sa température de congélation, d'éviter la prise en glace de ses fluides corporels pendant toute la période hivernale. Cependant cette stratégie nécessite un apport énergétique conséquent.

Les résultats de notre première étude corroborent cette hypothèse. En effet, les canetons ajustent leur capacité de NST en fonction de la température à laquelle ils sont exposés. Ils commencent à frissonner une fois la température ambiante plus basse que leur température d'acclimatation. On peut en effet considérer la période d'acclimatation comme une condition climatique stable et l'exposition aigüe comme un événement climatique aléatoire pour lequel le frisson est la meilleure stratégie.

2. L'UCP aviaire : au cœur des mécanismes de thermorégulation

Comme décrit dans les rappels bibliographiques, le caractère unique de l'UCP aviaire entraîne toujours un débat scientifique sur le ou les rôles potentiels de cette protéine.

Mon travail de thèse avait notamment pour but de caractériser l'implication de l'UCP aviaire dans les mécanismes de thermorégulation, notamment dans la thermogenèse sans frisson.

a. L'UCP aviaire : un petit pas vers un rôle thermogène...

Les résultats de la première étude (**Etude 1**) montrent une corrélation entre l'expression relative de l'UCP aviaire et la capacité de NST. De plus, la comparaison de nos résultats (**Etude 2**) avec une étude récente montrant une surexpression de l'UCP aviaire deux jours après éclosion (**Rey et al., 2010b**), permet d'étayer un peu plus l'hypothèse d'une implication de cette protéine dans la thermogenèse sans frisson. Cependant le rôle précis de l'UCP aviaire reste encore flou. En effet, on ne peut conclure sur un rôle strictement thermogène de cette protéine. Au niveau mitochondrial on ne montre pas d'effet de l'acclimatation sur le rendement énergétique. Seules les capacités d'oxydation et de phosphorylation étaient augmentées au froid. Il faut tout de même rappeler que l'UCP aviaire n'était pas activée *in vitro* car on était en présence de BSA (qui piège les acides gras) et de succinate et roténone, conditions connues pour réduire fortement la production de radicaux libres. Des mesures en présence d'acide gras et d'ions superoxyde, c'est-à-dire dans des conditions favorisant une stimulation de l'UCP aviaire, pourraient éventuellement valider son implication dans un mécanisme de découplage thermogène. La critique possible du choix de l'étude *in vitro* entraîne un paradoxe énergétique : celui de la coexistence entre processus consommateur d'énergie et découplage mitochondrial. En d'autres termes, comment une mitochondrie découplée par l'activité UCP aviaire peut soutenir des mécanismes ATP dépendants tels que le métabolisme cellulaire ou les cycles futiles (**Dumonteil et al., 1993**)? De plus, il est connu que les UCPs sont inactivées par la présence de nucléotides di- et tri-phosphates (GTP, GDP, ATP, ADP) présents dans la cellule en conditions physiologiques.

Outre la question sur l'état activé ou non de l'UCP aviaire *in situ*, on pourrait par une approche au niveau génique, ajouter un argument suggérant une fonction thermogène. Ainsi, le rôle thermogène de l'UCP1 chez les mammifères a clairement été identifié lors d'expériences d'acclimatation sur des souris KO-UCP1. Ces dernières n'arrivaient pas à maintenir leur température corporelle constante et ne résistaient pas à une exposition chronique au froid (**Golozoubova et al., 2001**). Ce résultat montre que seule l'UCP1 permet une thermogenèse sans frisson chez les mammifères, les autres UCPs (UCP2 et 3) n'ayant pas permis la survie de ces souris au froid. Logiquement, il serait intéressant d'invalider le gène codant pour l'UCP aviaire chez des canetons et voir s'ils sont toujours capables de développer une NST. Si le résultat est négatif, cela consoliderait l'hypothèse d'une implication dans la thermogenèse sans frisson mais ne constituerait pas à lui seul la preuve concrète d'un rôle strictement thermogène.

b. ... mais un grand pas vers une implication importante dans la thermogenèse de régulation !!

En effet, le froid est une situation connue pour induire de nombreuses modifications physiologique. Considérer la production de chaleur comme seule conséquence est une vision limitée de l'ensemble des changements phénotypiques s'opérant lors de l'adaptation au froid.

Outre les modifications morphologiques (duvet et plumage, rapport surface/volume) et physiologiques (anastomoses artério-veineuses, circuits à contre-courant), la thermorégulation adaptative induit une augmentation du métabolisme. D'une part une exposition chronique au froid entraîne une élévation du métabolisme de repos, augmenté à thermoneutralité chez les oiseaux CA comparés aux TN (**Etude 1, 2 et 3**). D'autre part une diminution progressive de la température ambiante induit une augmentation du métabolisme elle aussi progressive. Cela traduit une activité soutenue des chaînes respiratoires mitochondriales et une mobilisation importante des substrats lipidiques, d'où une production accrue de radicaux libres (**St-Pierre et al., 2002**). C'est d'ailleurs le cas chez les manchots royaux juvéniles après adaptation à la vie marine. Ils augmentent leur capacité à oxyder les lipides, qui se traduit notamment par une augmentation du métabolisme *in vivo* (**Etude 3**). Cette modulation du métabolisme lipidique peut être mise en relation avec la surexpression de l'UCP aviaire précédemment observée chez cette espèce (**Talbot et al., 2004**).

L'UCP aviaire se retrouve donc au centre des mécanismes associés à la thermogenèse de régulation [**Figure 4.9**]. Le froid induit une augmentation du métabolisme *in vivo* correspondant à une production de chaleur (soit par frisson thermique soit par NST induite par un découplage mitochondrial potentiellement UCP dépendant) et donc une dépense d'énergie, comblée par une consommation accrue de substrats d'origine lipidique. L'UCP aviaire peut jouer plusieurs rôles au niveau du métabolisme lipidique (cf. § **Intro IV.2.c**) notamment pour limiter les effets délétères de la peroxydation lipidique et de la production de radicaux libres de l'oxygène (**Rey et al., 2010a,b**).

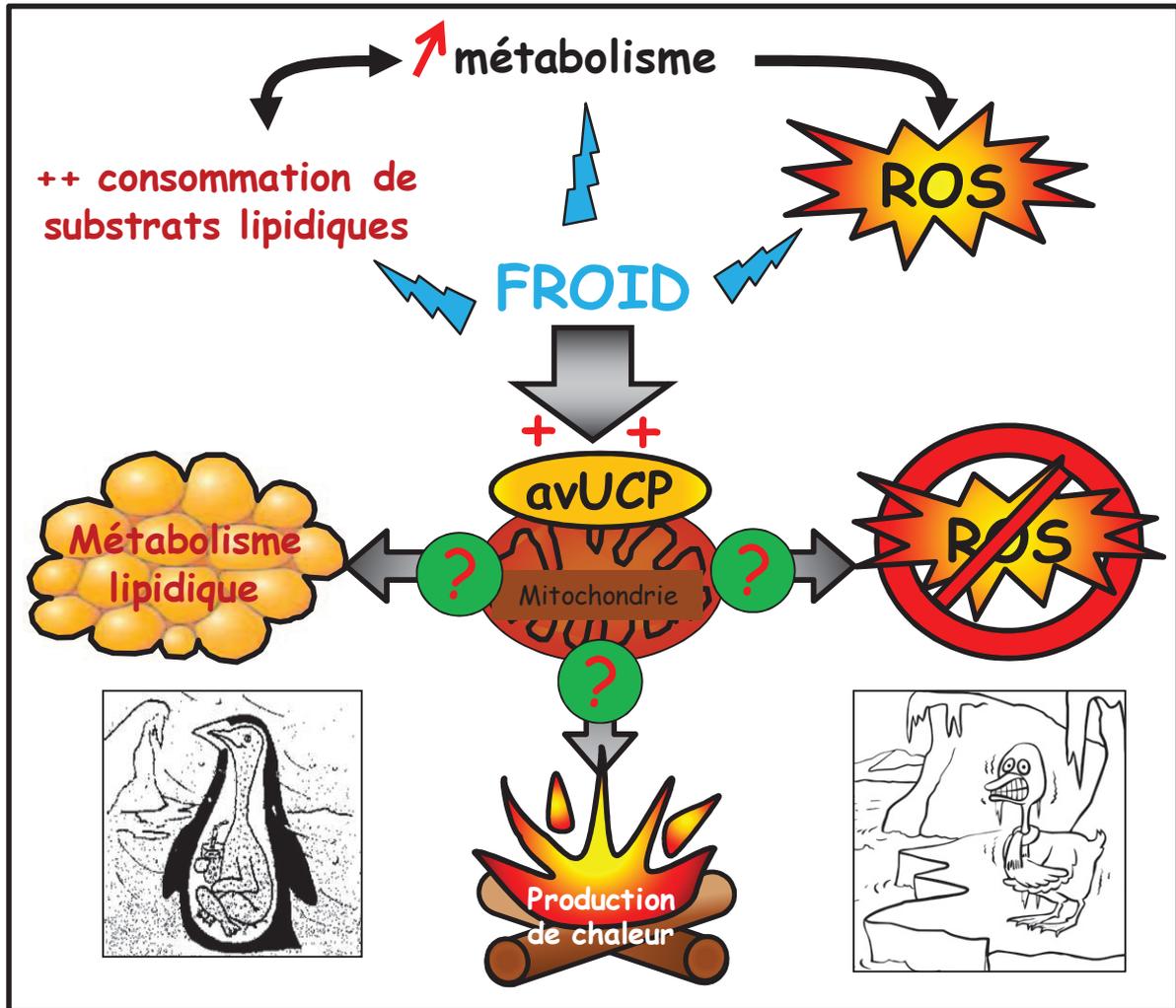


Figure 4.9 : Illustration des différents rôles potentiels de l'UCP aviaire en réponse à un stress froid. Pour résumer ce qui est explicité dans la partie IV de l'introduction, d'une part une exposition au froid (chronique ou aiguë) induit une augmentation de l'expression de l'UCP aviaire pourrait avoir 3 rôles potentiels : une fonction antiradicalaire, une fonction dans le métabolisme lipidique et une fonction thermogène.

III. Perspectives

Au cours des différentes études décrites dans ce manuscrit, nous avons pu observer, caractériser et démontrer un certain nombre de résultats répondant à la thématique très générale des adaptations métaboliques mises en place lors d'une contrainte thermique froide. Nous avons pu confirmer la dichotomie entre deux principaux mécanismes de thermogénèse, la **thermogénèse de frisson** nécessitant un travail mécanique de contraction musculaire et la **thermogénèse sans frisson** induite par des processus d'ordre métabolique.

Cependant bon nombre des questions soulevées durant ces trois années de thèse restent encore sans réponse.

On peut classer ces interrogations en fonction de leur faisabilité au sein du laboratoire et de leur nature plus ou moins intégrées.

1) A quel âge les canetons arrivent-ils à développer des capacités de NST ? La NST est-elle vraiment efficace dès le plus jeune âge ?

Nous avons effectivement observé une NST dès 3 semaines après éclosion. Mais les canetons sont-ils capables de thermoréguler encore plus précocement ? Pour répondre à cette question nous avons pour projet concret de continuer l'étude 2 en nous intéressant aux jeunes âges (2 jours, 8 jours et 15 jours). Cela nous permettra de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse de l'existence d'une NST efficace dès l'éclosion.

2) L'expression de l'UCP aviaire est-elle corrélée avec les capacités de thermogénèse sans frisson développées au cours du temps ?

Au cours de l'étude 2, nous avons pu prélever des biopsies musculaires de canetons aux différents âges. Nous avons essayé de réaliser une quantification relative de l'expression de l'UCP aviaire par le protocole de RT-PCR semi quantitative utilisée dans l'étude 1. Cependant, nous nous sommes trouvés confrontés à une contrainte technique : l'expression des gènes de référence généralement utilisés (β actine, Cyclophylène, GAPdH) variait de façon significative en fonction des conditions expérimentales. Nous projetons donc prochainement de réaliser une étude génique par PCR quantitative en temps réel.

3) La NST est-elle réellement plus avantageuse en termes de coût énergétique que le frisson lors d'une exposition chronique ?

L'hypothèse vraisemblable est que, oui, la NST est moins coûteuse que le frisson thermique à long terme. Pour cela, il serait intéressant de mesurer les capacités de thermogénèse chez des canetons placés en condition de jeûne. Un protocole expérimental est en préparation. Deux groupes de canetons (CA à 4°C et TN à 25°C) âgés de 5 semaines seront mis à jeun pendant 10 jours à 10°C. On s'attend que les canetons TN frissonnent et les canetons CA utilisent leur capacité de NST. Les canetons seront pesés quotidiennement et leur métabolisme ainsi que leur activité EMG sera mesurée tous les jours pendant deux heures. Si l'hypothèse est validée, les canetons TN devraient perdre plus de poids que les canetons acclimatés.

4) La NST est-elle un phénomène présent chez la plupart des espèces aviaires ?

Bien qu'on ne puisse pas généraliser à l'ensemble des espèces aviaires, il semble invraisemblable que seules les espèces *Cairina moschata* et *Aptenodytes patagonicus* soient capables de générer de la chaleur par NST. De fait, un projet intéressant mais néanmoins difficile à mettre en place pourrait être de comparer la capacité de NST développée par plusieurs espèces d'oiseaux, nidicoles et nidifuges, vivant dans des environnements différents.

De plus, des études à la fois à l'échelle intra-spécifique et inter-spécifique permettraient de discriminer les aspects génétiques des aspects environnementaux de la NST via des espèces à répartition géographique étendue. Par l'intermédiaire de transplantations croisées (animaux nordiques maintenus à des latitudes faibles et animaux méridionaux maintenus à de hautes latitudes) suivies sur plusieurs saisons, il serait possible de déterminer la plasticité phénotypique des oiseaux concernant leurs capacités de NST.

Bibliographie

Bibliographie

A-

Abe, T., Mujahid, A., Sato, K., Akiba, Y. and Toyomizu, M. (2006). Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens. *FEBS Lett* **580**, 4815-22.

Andreyev, A., Bondareva, T. O., Dedukhova, V. I., Mokhova, E. N., Skulachev, V. P., Tsofina, L. M., Volkov, N. I. and Vygodina, T. V. (1989). The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. *Eur J Biochem* **182**, 585-92.

Arieli, A., Berman, A. and Meltzer, A. (1979). Cold thermogenesis in the summer-acclimatized and cold-acclimated domestic fowl. *Comp Biochem Physiol* **63C**, 7-12.

Aulie, A. and Steen, J. B. (1976). Thermoregulation and muscular development in cold exposed willow ptarmigan chicks (*Lagopus lagopus* L.). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* **55**, 291-5.

Aulie, A. and Toien, O. (1988). Threshold for shivering in aerobic and anaerobic muscles in bantam cocks and incubating hens. *J Comp Physiol B* **158**, 431-5.

B-

Barazzoni, R. and Nair, K. S. (2001). Changes in uncoupling protein-2 and -3 expression in aging rat skeletal muscle, liver, and heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E413-9.

Barré, H. (1984). Recherche sur la thermogenèse de régulation chez l'oiseau - Etude expérimentale chez le poussin de manchot royal et le caneton de Barbarie. Doctorat d'état. Paris: Pierre et Marie Curie, Paris 6.

Barré, H., Berne, G., Brebion, P., Cohen-Adad, F. and Rouanet, J. L. (1989). Loose-coupled mitochondria in chronic glucagon-treated hyperthermic ducklings. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **256**, R1192-9.

Barré, H., Chatonnet, J., Le Maho, Y. and Valatx, J. L. (2001). Physiologie énergétique, pp. 399: Editions Belin.

Barré, H., Cohen-Adad, F., Duchamp, C. and Rouanet, J. L. (1986a). Multilocular adipocytes from muscovy ducklings differentiated in response to cold acclimation. *J Physiol* **375**, 27-38.

Barré, H., Cohen-Adad, F. and Rouanet, J. L. (1987). Two daily glucagon injections induce nonshivering thermogenesis in Muscovy ducklings. *Am J Physiol* **252**, E616-20.

- Barré, H., Nedergaard, J. and Cannon, B.** (1986b). Increased respiration in skeletal muscle mitochondria from cold-acclimated ducklings: uncoupling effects of free fatty acids. *Comp Biochem Physiol B* **85**, 343-8.
- Barre, H. and Rouanet, J. L.** (1983). Calorigenic effect of glucagon and catecholamines in king penguin chicks. *Am J Physiol* **244**, R758-63.
- Bedu, E.** (2002). Adaptations du métabolisme hépatique chez le caneton en croissance au froid. PhD. Université Claude Bernard Lyon 1.
- Bénistant, C.** (1997). Transport plasmatique et cellulaire des acides gras chez les oiseaux développant une thermogénèse sans frisson. PhD. Université Claude Bernard Lyon 1.
- Bénistant, C., Duchamp, C., Cohen-Adad, F., Rouanet, J. L. and Barre, H.** (1998). Increased in vitro fatty acid supply and cellular transport capacities in cold-acclimated ducklings (*Cairina moschata*). *Am J Physiol* **275**, R683-90.
- Benton, M. J.** (1990). Phylogeny of the major tetrapod groups: morphological data and divergence dates. *J Mol Evol* **30**, 409-24.
- Benton, M. J. and Donoghue, P. C.** (2007). Paleontological evidence to date the tree of life. *Mol Biol Evol* **24**, 26-53.
- Bicudo, J. E., Vianna, C. R. and Chaui-Berlinck, J. G.** (2001). Thermogenesis in birds. *Biosci Rep* **21**, 181-8.
- Block, B. A.** (1994). Thermogenesis in muscle. *Annu Rev Physiol* **56**, 535-77.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P. and Giacobino, J. P.** (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* **408**, 39-42.
- Bradshaw, W. E. and Holzapfel, C. M.** (2006). Climate change. Evolutionary response to rapid climate change. *Science* **312**, 1477-8.
- Brand, M. D.** (2005). The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem Soc Trans* **33**, 897-904.
- Brand, M. D. and Esteves, T. C.** (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab* **2**, 85-93.
- Brand, M. D., Pakay, J. L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D. C., Brookes, P. S. and Cornwall, E. J.** (2005). The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J* **392**, 353-62.
- Brand, M. D., Turner, N., Ocloo, A., Else, P. L. and Hulbert, A. J.** (2003). Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem J* **376**, 741-8.
- Brookes, P. S., Buckingham, J. A., Tenreiro, A. M., Hulbert, A. J. and Brand, M. D.** (1998). The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **119**, 325-34.
- Brown, M. and Downs, C. T.** (2002). Development of homeothermy in hatchling crowned plovers *Vanellus coronatus*. *Journal of Thermal Biology* **27**, 95-101.

C-

- Cannon, B. and Nedergaard, J.** (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**, 277-359.
- Chainier, F.** (2000). Effets des acides gras alimentaires sur l'énergétique mitochondriale du caneton de Barbarie. Comparaison avec l'effet de l'acclimatation au froid. PhD. Université Claude Bernard Lyon 1.
- Chainier, F., Roussel, D., Georges, B., Meister, R., Rouanet, J. L., Duchamp, C. and Barre, H.** (2000). Cold acclimation or grapeseed oil feeding affects phospholipid composition and mitochondrial function in duckling skeletal muscle. *Lipids* **35**, 1099-106.
- Charrassin, J. B. and Bost, C. A.** (2001). Utilisation of the oceanic habitat by king penguins over the annual cycle. *Mar Ecol Prog Ser* **221**, 285-297.
- Cherel, Y., Ridoux, V. and Rodhouse, P. G.** (1996). Fish and squid in the diet of king penguin chicks, *Aptenodytes patagonicus*, during winter at sub-antarctic Crozet Islands. *Marine Biology* **126**, 559-570.
- Cherel, Y., Stahl, J. and Le Maho, Y.** (1987). Ecology and physiology of fasting in king penguin chicks. *The Auk* **104**, 254-262.
- Cherel, Y., Verdon, C. and Ridoux, V.** (1993). Seasonal importance of oceanic myctophids in king penguin diet at Crozet Islands. *Polar Biol* **13**, 355-357.
- Chiaradia, A. and Nisbet, I. C. T.** (2006). Plasticity in parental provisioning and chick growth in Little Penguins *Eudyptula minor* in years of high and low breeding success. *Ardea* **94**, 257-270.
- Choi, I., Ricklefs, R. E. and Shea, R. E.** (1993). Skeletal muscle growth, enzyme activities and the development of thermogenesis : a comparison between altricial and precocial birds. *Physiol Zool* **66**, 455-473.
- Collin, A., Cassy, S., Buyse, J., Decuypere, E. and Damon, M.** (2005). Potential involvement of mammalian and avian uncoupling proteins in the thermogenic effect of thyroid hormones. *Domest Anim Endocrinol* **29**, 78-87.
- Collin, A., Swennen, Q., Skiba-Cassy, S., Buyse, J., Chartrin, P., Le Bihan-Duval, E., Crochet, S., Duclos, M. J., Joubert, R., Decuypere, E. et al.** (2009). Regulation of fatty acid oxidation in chicken (*Gallus gallus*): interactions between genotype and diet composition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **153**, 171-7.
- Collin, A., Taouis, M., Buyse, J., Ifuta, N. B., Darras, V. M., Van As, P., Malheiros, R. D., Moraes, V. M. and Decuypere, E.** (2003). Thyroid status, but not insulin status, affects expression of avian uncoupling protein mRNA in chicken. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E771-7.
- Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T. and Wilson, M. T.** (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **30**, 280-5.
- Costanzo, J. P., Lee, R. E., Jr. and Lortz, P. H.** (1993). Physiological responses of freeze-tolerant and -intolerant frogs: clues to evolution of anuran freeze tolerance. *Am J Physiol* **265**, R721-5.
- Criscuolo, F., Gonzalez-Barroso Mdel, M., Bouillaud, F., Ricquier, D., Miroux, B. and Sorci, G.** (2005a). Mitochondrial uncoupling proteins: new perspectives for evolutionary ecologists. *Am Nat* **166**, 686-99.

Criscuolo, F., Gonzalez-Barroso Mdel, M., Le Maho, Y., Ricquier, D. and Bouillaud, F. (2005b). Avian uncoupling protein expressed in yeast mitochondria prevents endogenous free radical damage. *Proc Biol Sci* **272**, 803-10.

Culik, B. M., Putz, K., Wilson, R. P., Allers, D., Lage, J., Bost, C. A. and Le Maho, Y. (1996). Diving energetics in king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *J Exp Biol* **199**, 973-83.

D-

Damon, M. and Collin, A. (2006). Quel est le rôle des protéines découplantes mitochondriales chez les mammifères et les oiseaux? *INRA Prod. Anim* **19**, 287-304.

Dawson, C., Vincent, J. F. V., Jeronimidis, G., Rice, G. and Forshaw, P. (1999). Heat transfer through Penguin Feathers. *J Theor Biol* **199**, 291-295.

Dawson, R. D., Lawrie, C. C. and O'Brien, E. L. (2005). The importance of microclimate variation in determining size, growth and survival of avian offspring: experimental evidence from a cavity nesting passerine. *Oecologia* **144**, 499-507.

Depocas, F. and Hart, J. S. (1957). Use of the Pauling oxygen analyser for measurement of oxygen consumption of animals in open-circuit systems and in a short-lag, closed-circuit apparatus. *J Appl Physiol* **10**, 388-392.

Descamps, S., Gauthier-Clerc, M., Gendner, J. and Le Maho, Y. (2002). The annual breeding cycle of unbanded king penguins *Aptenodytes patagonicus* on Possession Island (Crozet). *Avian Science* **2**.

Dridi, S., Onagbesan, O., Swennen, Q., Buyse, J., Decuypere, E. and Taouis, M. (2004). Gene expression, tissue distribution and potential physiological role of uncoupling protein in avian species. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **139**, 273-83.

Dridi, S., Temim, S., Derouet, M., Tesseraud, S. and Taouis, M. (2008). Acute cold- and chronic heat-exposure upregulate hepatic leptin and muscle uncoupling protein (UCP) gene expression in broiler chickens. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* **309**, 381-8.

Duchamp, C. (1990). Demonstration d'une thermogenèse sans frisson d'origine musculaire chez l'oiseau - étude chez le caneton de Barbarie et le poussin de manchot royal. PhD, Université Claude Bernard Lyon1.

Duchamp, C. and Barre, H. (1993). Skeletal muscle as the major site of nonshivering thermogenesis in cold-acclimated ducklings. *Am J Physiol* **265**, R1076-83.

Duchamp, C., Barre, H., Delage, D., Rouanet, J. L., Cohen-Adad, F. and Minaire, Y. (1989). Nonshivering thermogenesis and adaptation to fasting in king penguin chicks. *Am J Physiol* **257**, R744-51.

Duchamp, C., Barre, H., Rouanet, J. L., Lanni, A., Cohen-Adad, F., Berne, G. and Brebion, P. (1991). Nonshivering thermogenesis in king penguin chicks. I. Role of skeletal muscle. *Am J Physiol* **261**, R1438-45.

Duchamp, C., Chatonnet, J., Dittmar, A. and Barre, H. (1993). Increased role of skeletal muscle in the calorogenic response to glucagon of cold-acclimated ducklings. *Am J Physiol* **265**, R1084-91.

Duchamp, C., Cohen-Adad, F., Rouanet, J. L. and Barre, H. (1992). Histochemical arguments for muscular non-shivering thermogenesis in muscovy ducklings. *J Physiol* **457**, 27-45.

Duchamp, C., Marmonier, F., Denjean, F., Lachuer, J., Eldershaw, T. P., Rouanet, J. L., Morales, A., Meister, R., Benistant, C., Roussel, D. et al. (1999). Regulatory, cellular and molecular aspects of avian muscle nonshivering thermogenesis. *Ornis Fennica* **76**, 151-165.

Duchamp, C., Rouanet, J. L. and Barre, H. (2002). Ontogeny of thermoregulatory mechanisms in king penguin chicks (*Aptenodytes patagonicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **131**, 765-73.

Dumonteil, E., Barre, H. and Meissner, G. (1993). Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and ryanodine receptor in cold-acclimated ducklings and thermogenesis. *Am J Physiol* **265**, C507-13.

Dumonteil, E., Barre, H. and Meissner, G. (1994). Effects of palmitoyl carnitine and related metabolites on the avian Ca(2+)-ATPase and Ca²⁺ release channel. *J Physiol* **479** (Pt 1), 29-39.

Dunn, E. H. (1980). On the variability in energy allocation of nestling birds. *The Auk* **97**, 19-27.

E-F

Echtay, K. S. (2007). Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med* **43**, 1351-71.

Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A., Pickering, S. et al. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**, 96-9.

Eckert, R., Randall, D., Burggren, W. W. and French, K. (1999). Animal physiology : Mechanisms and adaptations, (ed. s. a. De Boeck Université).

El-Halawani, M. S., Wilson, W. O. and Burger, R. E. (1971). Cold-acclimation and the role of catecholamines in body temperature regulation in male Leghorns. *Poultry Sci* **49**, 621-632.

Emre, Y., Hurtaud, C., Ricquier, D., Bouillaud, F., Hughes, J. and Criscuolo, F. (2007). Avian UCP: the killjoy in the evolution of the mitochondrial uncoupling proteins. *J Mol Evol* **65**, 392-402.

Enerback, S. (2010) Brown adipose tissue in humans. *Int J Obes (Lond)* **34 Suppl 1**, S43-6.

Evoock-Clover, C. M., Poch, S. M., Richards, M. P., Ashwell, C. M. and McMurtry, J. P. (2002). Expression of an uncoupling protein gene homolog in chickens. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **133**, 345-58.

Fahlman, A., Schmidt, A., Handrich, Y., Woakes, A. J. and Butler, P. J. (2005). Metabolism and thermoregulation during fasting in king penguins, *Aptenodytes patagonicus*, in air and water. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R670-9.

Filali-Zegzouti, Y., Abdelmelek, H., Rouanet, J. L., Cottet-Emard, J. M., Pequignot, J. M. and Barre, H. (2000). Involvement of the catecholaminergic system in glucagon-induced thermogenesis in Muscovy ducklings (*Cairina moschata*). *Pflugers Arch* **441**, 275-80.

Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D. et al. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* **15**, 269-72.

G-H

Gabrielsen, G. W., Mehlum, F. and Karlsen, H. E. (1988). Thermoregulation in four species of arctic seabirds. *J Comp Physiol* **157**, 703-708.

George, B. (1996). La gestion des réserves lipidiques chez l'oiseau développant une thermogénèse sans frisson. PhD. Université Claude Bernard Lyon 1.

Giret, A., Weis, D., Zhou, X., Cottin, J. and Tourpin, S. (2003). Les îles Crozet. *Géologues* **137**, 15-23.

Goglia, F. and Skulachev, V. P. (2003). A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *Faseb J* **17**, 1585-91.

Golozoubova, V., Hohtola, E., Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B. and Nedergaard, J. (2001). Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *Faseb J* **15**, 2048-50.

Hazel, J. R. (1995). Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol* **57**, 19-42.

Himms-Hagen, J. and Harper, M. E. (2001). Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med (Maywood)* **226**, 78-84.

Hissa, R. (1988). Controlling mechanisms in avian temperature regulation: a review. *Acta Physiol Scand* **132**, 1-148.

Hohtola, E. (2004). Shivering thermogenesis in birds and mammals. In *Life in the Cold: Evolution, Mechanisms, Adaptation, and Application. Biological Papers of the University of Alaska*, **27**. Fairbanks, Alaska, USA: Institute of Arctic Biology, University of Alaska.

Hohtola, E. and Visser, G. (1998). Development of locomotion and endothermy in altricial and precocial birds. In *Avian growth and development: evolution within the Altricial-Precocial spectrum*, pp. 157-173: Oxford University Press, USA.

Hourton-Cabassa, C., Rita Matos, A., Zachowski, A. and Moreau, F. (2004). The plant uncoupling protein homologues: a new family of energy-dissipating proteins in plant mitochondria. *Plant Physiol Biochem* **42**, 283-90.

Hughes, L. (2002). Biological consequences of global warming: is the signal already. *TREE* **15**, 56-61.

J-I

Jansky, L. (1973). Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. *Biol Rev Camb Philos Soc* **48**, 85-132.

Jarmuszkiewicz, W., Milani, G., Fortes, F., Schreiber, A. Z., Sluse, F. E. and Vercesi, A. E. (2000). First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS Lett* **467**, 145-149.

Jastroch, M., Wuertz, S., Kloas, W. and Klingenspor, M. (2005). Uncoupling protein 1 in fish uncovers an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis. *Physiol Genomics* **22**, 150-6.

Jenni-Eiermann, S., Jenni, L., Kvist, A., Lindstrom, A., Piersma, T. and Visser, G. H. (2002). Fuel use and metabolic response to endurance exercise: a wind tunnel study of a long-distance migrant shorebird. *J Exp Biol* **205**, 2453-60.

Jenni, L. and Jenni-Eiermann, S. (1998). Fuel supply and metabolic constraints in migrating birds. *Journal of Avian Biology* **29**, 521-528.

Johnston, D. W. (1971). The absence of brown adipose tissue in birds. *Comp Biochem Physiol A* **40**, 1107-8.

Joubert, R. (2009). Rôles et régulations de la protéine découplante aviaire dans le métabolisme mitochondrial de l'oiseau. In *Sciences de la vie*, vol. PhD. Nouzilly: François Rabelais.

Joubert, R., Metayer Coustard, S., Swennen, Q., Sibut, V., Crochet, S., Cailleau-Audouin, E., Buyse, J., Decuypere, E., Wrutniak-Cabello, C., Cabello, G. et al. (2010). The beta-adrenergic system is involved in the regulation of the expression of avian uncoupling protein in the chicken. *Domest Anim Endocrinol* **38**, 115-25.

IUPS Thermal Commission (2001). Glossary of terms for thermal physiology. *The Japanese Journal of physiology* **51**, 245-278.

K-L

Klingenspor, M., Fromme, T., Hughes, D. A., Jr., Manzke, L., Polymeropoulos, E., Riemann, T., Trzcionka, M., Hirschberg, V. and Jastroch, M. (2008). An ancient look at UCP1. *Biochim Biophys Acta*.

Krauss, S., Zhang, C. Y. and Lowell, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 248-61.

Kumar, S. and Hedges, S. B. (1998). A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* **392**, 917-20.

Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A. and Goglia, F. (2003). Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett* **543**, 5-10.

Le Bohec, C. (2007). Stratégies d'histoire de vie d'un oiseau longévif : le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*). PhD. Université Louis Pasteur Strasbourg I.

Leroi, A. M., Bennett, A. F. and Lenski, R. E. (1994). Temperature acclimation and competitive fitness: an experimental test of the beneficial acclimation assumption. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1917-21.

Letexier, D. (2004). Régulation nutritionnelle de la lipogenèse : comparaison entre foie et tissu adipeux et entre rat et homme. PhD. Université Claude Bernard Lyon 1.

Liang, H. and Ward, W. F. (2006). PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* **30**, 145-51.

M-

Mao, W., Yu, X. X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H. and Pan, G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett* **443**, 326-30.

Marjoniemi, K. (2001). Thermogenic mechanisms during the development of endothermy in juvenile birds. In *Biology*: Oulu.

Marjoniemi, K. and Hohtola, E. (1999). Shivering thermogenesis in leg and breast muscles of galliform chicks and nestlings of the domestic pigeon. *Physiol Biochem Zool* **72**, 484-92.

Mezentseva, N. V., Kumaratilake, J. S. and Newman, S. A. (2008). The brown adipocyte differentiation pathway in birds: an evolutionary road not taken. *BMC Biol* **6**, 17.

Miwa, S. and Brand, M. D. (2003). Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochem Soc Trans* **31**, 1300-1.

Montaron, A., Rouanet, J. L. and Barre, H. (1995). Inhibition of shivering thermogenesis by centrally applied glucagon in muscovy ducklings. *Brain Res* **702**, 49-54.

Mujahid, A., Akiba, Y. and Toyomizu, M. (2007). Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young white leghorn cockerels by downregulation of avian uncoupling protein. *Poult Sci* **86**, 364-71.

Mujahid, A., Sato, K., Akiba, Y. and Toyomizu, M. (2006). Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content. *Poult Sci* **85**, 1259-65.

N-

Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A. and Cannon, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* **1504**, 82-106.

Negre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Trolly, M., Salvayre, R., Penicaud, L. and Casteilla, L. (1997). A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Faseb J* **11**, 809-15.

Nichelmann, M. and Tzschentke, B. (2002). Ontogeny of thermoregulation in precocial birds. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **131**, 751-63.

Noren, S. R., Williams, T. M., Pabst, D. A., McLellan, W. A. and Dearolf, J. L. (2001). The development of diving in marine endotherms: preparing the skeletal muscles of dolphins, penguins, and seals for activity during submergence. *J Comp Physiol B* **171**, 127-34.

O- P-

Olson, J. (1994). The Ontogeny of Shivering Thermogenesis in the Red-Winged Blackbird (*Agelaius Phoeniceus*). *J Exp Biol* **191**, 59-88.

Ozaki, M., Haga, S., Zhang, H. Q., Irani, K. and Suzuki, S. (2003). Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in HGF-stimulated antiapoptotic signaling: role of PI3-K and Akt kinase upon rac1. *Cell Death Differ* **10**, 508-15.

Pearson, J. T. (1998). Development of thermoregulation and posthatching growth in the altricial cockatiel *Nymphicus hollandicus*. *Physiol Zool* **71**, 237-44.

Pecqueur, C., Alves-Guerra, M. C., Gelly, C., Levi-Meyrueis, C., Couplan, E., Collins, S., Ricquier, D., Bouillaud, F. and Miroux, B. (2001). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* **276**, 8705-12.

Porter, R. K., Hulbert, A. J. and Brand, M. D. (1996). Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *Am J Physiol* **271**, R1550-60.

Pütz, K. (2002). Spatial and temporal variability in the foraging areas of breeding king penguins. *The Condor* **104**, 528-538.

R-

Raccurt, M., Baudimont, F., Tirard, J., Rey, B., Moureaux, E., Geloën, A. and Duchamp, C. (2008). Growing in Antarctica, a challenge for white adipose tissue development in Adélie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R1671-9.

Raimbault, S., Dridi, S., Denjean, F., Lachuer, J., Couplan, E., Bouillaud, F., Bordas, A., Duchamp, C., Taouis, M. and Ricquier, D. (2001). An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem J* **353**, 441-4.

Rey, B. (2008). Implication de la protéine découplante aviaire dans l'ontogénèse des mécanismes thermogènes et/ou anti-radicalaires - Etude expérimentale sur le manchot Royal et le caneton de Barbarie. PhD. Université Claude Bernard Lyon 1.

Rey, B., Halsey, L. G., Dolmazon, V., Rouanet, J. L., Roussel, D., Handrich, Y., Butler, P. J. and Duchamp, C. (2008a). Long-term fasting decreases mitochondrial avian UCP-mediated oxygen consumption in hypometabolic king penguins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R92-R100.

Rey, B., Roussel, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rouanet, J. L., Desplanches, D., Sibille, B., Servais, S. and Duchamp, C. (2010a). Up-regulation of avian uncoupling protein in cold-acclimated and hyperthyroid ducklings prevents reactive oxygen species production by skeletal muscle mitochondria. *BMC Physiol* **10**, 5.

Rey, B., Sibille, B., Romestaing, C., Belouze, M., Letexier, D., Servais, S., Barre, H., Duchamp, C. and Voituron, Y. (2008b). Reptilian uncoupling protein: functionality and expression in sub-zero temperatures. *J Exp Biol* **211**, 1456-62.

Rey, B., Spee, M., Belouze, M., Girard, A., Prost, J., Roussel, D. and Duchamp, C. (2010b). Oxygen recovery up-regulates avian UCP and ANT in newly hatched ducklings. *J Comp Physiol B* **180**, 239-46.

Ricquier, D. and Kader, J. C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun* **73**, 577-83.

Rintamäki, H., Saarela, S., Marjakangas, A. and Hissa, R. (1983). Summer and winter temperature regulation in the black grouse *Lyrurus tetrix*. *Physiol Zool* **56**, 152-159.

Rouanet, J. L. (1983). Arguments morphologiques et fonctionnels en faveur d'une participation du muscle squelettique à la thermogenèse sans frisson chez le caneton acclimaté au froid. PhD. Université Claude Bernard Lyon 1.

Roussel, D. (1999). Contrôle du couplage énergétique mitochondrial par les acides gras - Implication dans la thermogenèse sans frisson musculaire aviaire. PhD. Université Claude Bernard Lyon 1.

Roussel, D., Rouanet, J. L., Duchamp, C. and Barre, H. (1998). Effects of cold acclimation and palmitate on energy coupling in duckling skeletal muscle mitochondria. *FEBS Lett* **439**, 258-62.

Saarela, S., Keith, J. S., Hohtola, E. and Trayhurn, P. (1991). Is the "mammalian" brown fat-specific mitochondrial uncoupling protein present in adipose tissues of birds? *Comp Biochem Physiol B* **100**, 45-9.

S-

Saarela, S. and Vakkuri, O. (1982). Photoperiod-induced changes in temperature-metabolism curve, shivering threshold and body temperature in the pigeon. *Experientia* **38**, 373-5.

Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Gubern, M., Huang, Q., Neverova, M., Gregoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C. et al. (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem* **273**, 34611-5.

Schekkerman, H., Tulp, I., Piersma, T. and Visser, G. H. (2003). Mechanisms promoting higher growth rate in arctic than in temperate shorebirds. *Oecologia* **134**, 332-42.

Schmidt-Nielsen, K. (1990). *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. Cambridge: Cambridge University Press.

Schmidt, A., Alard, F. and Handrich, Y. (2006). Changes in body temperature in king penguins at sea: the result of fine adjustments in peripheral heat loss? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**, R608-18.

Scholander, P., Hock, R., Walters, V., Johnson, F. and Irving, L. (1950). Heat regulation in some arctic and tropical mammals and birds. *The Biological Bulletin* **99**, 237.

Schrauwen, P., Hoeks, J. and Hesselink, M. K. (2006). Putative function and physiological relevance of the mitochondrial uncoupling protein-3: involvement in fatty acid metabolism? *Prog Lipid Res* **45**, 17-41.

Schrauwen, P., Saris, W. H. and Hesselink, M. K. (2001). An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. *Faseb J* **15**, 2497-502.

Schwartz, T. S., Murray, S. and Seebacher, F. (2008). Novel reptilian uncoupling proteins: molecular evolution and gene expression during cold acclimation. *Proc Biol Sci* **275**, 979-85.

Shirihai, H. (2007). A complete guide to Antarctic wildlife. *The birds and marine mammals of the Antarctic Continent and the Southern Ocean (2nd Edition)*. London: A. & C. Black.

Silva, J. E. (2006). Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev* **86**, 435-64.

Sinclair, B. J., Addo-Bediako, A. and Chown, S. L. (2003). Climatic variability and the evolution of insect freeze tolerance. *Biol Rev Camb Philos Soc* **78**, 181-95.

Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-31.

Skulachev, V. P. and Maslov, S. P. (1960). The role of nonphosphorylating oxidation in temperature regulation. *Biochemistry (Moscow)* **25**, 1058-1064.

Slocinska, M. B., Almsherqi, Z. A., Sluse, F. E., Navet, R. and Deng, Y. (2010). Identification and characterization of uncoupling protein in heart and muscle mitochondria of canary birds. *J Bioenerg Biomembr* **42**, 345-53.

Sokolova, I. M. and Sokolov, E. P. (2005). Evolution of mitochondrial uncoupling proteins: novel invertebrate UCP homologues suggest early evolutionary divergence of the UCP family. *FEBS Lett* **579**, 313-7.

St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. and Brand, M. D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* **277**, 44784-90.

Starck, J. and Ricklefs, R. (1998). Avian growth and development: evolution within the altricial-precocial spectrum: Oxford University Press, USA.

T-U-

Talbot, D. A., Duchamp, C., Rey, B., Hanuise, N., Rouanet, J. L., Sibille, B. and Brand, M. D. (2004). Uncoupling protein and ATP/ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins. *J Physiol* **558**, 123-35.

Talbot, D. A., Hanuise, N., Rey, B., Rouanet, J. L., Duchamp, C. and Brand, M. D. (2003). Superoxide activates a GDP-sensitive proton conductance in skeletal muscle mitochondria from king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 983-8.

Tortosa, F. S. and Castro, F. (2003). Development of thermoregulatory ability during ontogeny in the white stork *Ciconia ciconia*. *Ardeola* **50**, 39-45.

Toyomizu, M., Ueda, M., Sato, S., Seki, Y., Sato, K. and Akiba, Y. (2002). Cold-induced mitochondrial uncoupling and expression of chicken UCP and ANT mRNA in chicken skeletal muscle. *FEBS Lett* **529**, 313-8.

Ueda, M., Watanabe, K., Sato, K., Akiba, Y. and Toyomizu, M. (2005). Possible role for avPGC-1 α in the control of expression of fiber type, along with avUCP and avANT mRNAs in the skeletal muscles of cold-exposed chickens. *FEBS Lett* **579**, 11-7.

V-

Vaillancourt, E., Prud'homme, S., Haman, F., Guglielmo, C. G. and Weber, J. M. (2005). Energetics of a long-distance migrant shorebird (*Philomachus pugnax*) during cold exposure and running. *J Exp Biol* **208**, 317-25.

Vaillancourt, E. and Weber, J. M. (2007). Lipid mobilization of long-distance migrant birds in vivo: the high lipolytic rate of ruff sandpipers is not stimulated during shivering. *J Exp Biol* **210**, 1161-9.

Vianna, C. R., Hagen, T., Zhang, C. Y., Bachman, E., Boss, O., Gereben, B., Moriscot, A. S., Lowell, B. B., Bicudo, J. E. and Bianco, A. C. (2001). Cloning and functional characterization of an uncoupling protein homolog in hummingbirds. *Physiol Genomics* **5**, 137-45.

Vidal-Puig, A., Solanes, G., Grujic, D., Flier, J. S. and Lowell, B. B. (1997). UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 79-82.

Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N. J., Enerback, S. et al. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* **360**, 1518-25.

Visser, G. H. and Ricklefs, R. E. (1995). Relationship between body composition and homeothermy in neonates of precocial and semiprecocial birds. *The Auk* **112**, 192-200.

Voituron, Y., Mouquet, N., deMazancourt, C. and Clobert, J. (2002a). To freeze or not to freeze? an evolutionary perspective on the cold hardiness strategies of overwintering ectotherms. *American Naturalist* **160**, 255-270.

Voituron, Y., Storey, J. M., Grenot, C. and Storey, K. B. (2002b). Freezing survival, body ice content and blood composition of the freeze tolerant European common lizard, *Lacerta vivipara*. *Journal of Comparative Physiology B* **172**, 71-76.

W-Z

Walther, G. R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J., Fromentin, J. M., Hoegh-Guldberg, O. and Bairlein, F. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature* **416**, 389-95.

Weathers, W. W., Gearhart, K. L. and Hodum, P. J. (2000). Thermoregulation in Antarctic fulmarine petrels. *J Comp Physiol B* **170**, 561-572.

Weber, J.M. (2009). The physiology of long-distance migration: extending the limits of endurance metabolism. *J Exp Biol* **212**, 593-597

West-Eberhard, M. J. (1989). Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annu Rev Ecol Syst* **20**, 249-278.

Williams, J. B. and Tieleman, B. I. (2001). Physiological ecology and behavior of desert birds. In *Current Ornithology* **16**, 299-353. New-york: Kluwer Academics/Plenum.

Willmer, P., Stone, G. and Johnston, I. (2000). Environmental physiology of animals: *Blackwell Science Ltd*.

Wilson, R. P., Hustler, K., Ryan, P. G., Burger, A. E. and Nöldeke, E. C. (1992). Diving birds in the cold water: do Archimedes and Boyle determine energetic cost? *Am Nat* **140**, 179-200.

Wilson, R. S. and Franklin, C. E. (2002). Testing the beneficial acclimation hypothesis. *TREE* **17**, 66-70.

Zera, A. J. and Harshman, L. G. (2001). The physiology of life history trade-offs in Animals. *Annu Rev Ecol Syst* **32**, 95-126.

Annexes

Glossaire

Acclimatation : Changement persistant d'une fonction spécifique due à une exposition prolongée à une condition d'environnement telle que la température basse ou élevée (**Eckert et al., 1999**)

Acclimation : *Physiological or behavioral changes occurring within an organism, which reduces the strain or enhances endurance of strain caused by experimentally induced stressful changes in particular climatic factors. Note: The terms acclimation and acclimatization are etymologically indistinguishable. Both words have been assigned several and different meanings (Greenleaf & Greenleaf, 1970). The most useful of the assigned meanings, adopted here, would seem to be those of Hart (1957) and Eagan (1963) who use the term acclimation to describe the adaptive changes that occur within an organism in response to experimentally induced changes in particular climatic factors such as ambient temperature in a controlled environment, and the term acclimatization to describe the adaptive changes that occur within an organism in response to changes in the natural climate. (IUPS Thermal Commission, 2001)*

Acclimatization: *Physiological or behavioral changes occurring within the lifetime of an organism that reduce the strain caused by stressful changes in the natural climate (e.g., seasonal or geographical).*

Note: What is termed acclimatization may also be specified as a particular phenotypic adaptation; therefore, the usefulness of the term may be questioned. (IUPS Thermal Commission, 2001)

Adaptation : Evolution par la sélection naturelle conduisant à un organisme dont la physiologie, l'anatomie et le comportement sont dépendants des besoins de son environnement (**Eckert et al., 1999**)

Adaptation: *Changes that reduce the physiological strain produced by stressful components of the total environment. This change may occur within the lifetime of an organism (phenotypic) or be the result of genetic selection in a species or subspecies (genotypic). Acclimation as defined in this Glossary relates to phenotypic adaptations to specified climatic components. In thermal physiology, the use of the term adaptation does not require specification of the climatic components of the total environment to which the organism adapts, but the most obvious component is often denoted (e.g., adaptation to heat). There are no distinct terms that relate genotypic adaptations to the climate or particular components of climate. Note: In comparison to adaptation as defined in neurophysiology, the adaptive processes in thermal physiology usually occur with larger time constants. (IUPS Thermal Commission, 2001)*

Ecologie : Etude des interactions entre les êtres vivants et leur environnement(CEPE)

Ecophysiologie : Etude du fonctionnement des êtres vivants en relation avec la situation de ces êtres vivants dans leur environnement (CEPE)

Ectothermes : Animaux dont la température du corps dépend de la température de l'environnement (Eckert et al, 1999)

Endothermes : Animaux dont la température du corps ne dépend que de la production de chaleur du corps (Eckert et al, 1999)

Environnement : Ensemble des éléments, vivants ou non, qui forment le milieu de vie (CEPE)

Homéotherme : Animal qui régule sa propre température interne dans une gamme étroite de températures par rapport aux variations thermiques du milieu ambiant ; cette régulation est assurée par une balance entre les pertes et les productions de chaleur (Eckert et al, 1999)

Hibernant : qui hiberne, c'est-à-dire qui rentre dans un état d'hypothermie régulée (ex. la marmotte)

Hivernant : qui passe l'hiver dans un endroit particulier (ex. le VCAT des TAAF)

Métabolisme : ensemble des processus physiques et chimiques comprenant l'anabolisme, le catabolisme et l'énergétique cellulaire (**Eckert et al., 1999**)

Métabolisme de base (BMR ou Basal Metabolic Rate) : Métabolisme mesuré lorsque l'animal est à thermoneutralité, inactif, à jeûn, adulte (pour éviter les dépenses énergétiques liées à la croissance), en période de non- reproduction (pour éviter les dépenses énergétiques liées à la gestation, la lactation, la formation d'œuf ou l'incubation). L'animal doit arriver à réguler sa température interne et doit être en période inactive. (**McNab, 1997**)

Note : Pour les ectothermes, on parle plus souvent de métabolisme standard (ou *SMR*, *Standard Metabolic Rate*), dépendant de la température ambiante (**Willmer et al., 2000**)

Métabolisme de repos (RMR ou Resting Metabolic Rate) : Niveau de métabolisme mesuré lors d'une activité minimal (mais en conditions normales et non restreintes).

Nidicole (Altricial) : Se dit de l'oisillon qui naît nu ou légèrement duvetés, aux yeux fermés ou ouverts, qui est incapable de quitter le nid, et doit être nourri par ses parents jusqu'à son essor. (www.oiseaux.net)

Nidifuge (Precocial) : Se dit des oiseaux dont les jeunes sont couverts de duvet et aptes à quitter le nid une fois l'œuf éclos. Ils sont capables de se nourrir seul, si besoin est, avec l'aide de leurs parents. (www.oiseaux.net)

Physiologie : Etude du fonctionnement des êtres vivants et de leurs organes (**CEPE**)

Poïkilotherme : Animal dont la température corporelle tend à fluctuer plus ou moins avec la température ambiante (**Eckert et al., 1999**)