



HAL
open science

Implication potentielle des protéines de fusion mitochondriale dans l'ontogenèse des processus bioénergétiques musculaires chez l'oiseau

Anaïs Fongy

► **To cite this version:**

Anaïs Fongy. Implication potentielle des protéines de fusion mitochondriale dans l'ontogenèse des processus bioénergétiques musculaires chez l'oiseau. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10276 . tel-01127600

HAL Id: tel-01127600

<https://theses.hal.science/tel-01127600>

Submitted on 7 Mar 2015

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.

N° d'ordre 276 - 2013

Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Discipline : Physiologie

Présentée et soutenue publiquement le 26 Novembre 2013

Par Anaïs FONGY

**Implication potentielle des protéines
de fusion mitochondriale dans l'ontogenèse
des processus bioénergétiques musculaires chez l'oiseau**

Sous la direction du **Pr. Claude DUCHAMP** et du **Dr. Caroline ROMESTAING**

M. Fabien VAN COPPENOLLE, <i>PU, Université Claude Bernard, Lyon</i>	Président du jury
Mme Anne BONNIEU, <i>DR INRA, Montpellier</i>	Rapporteur
M. Jean-Patrice ROBIN, <i>CR CNRS, Strasbourg</i>	Rapporteur
M. Rodrigue ROSSIGNOL, <i>CR INSERM, Bordeaux</i>	Rapporteur
M. Claude DUCHAMP, <i>PU, Université Claude Bernard, Lyon</i>	Directeur
Mme Caroline ROMESTAING, <i>MCU, Université Claude Bernard, Lyon</i>	Co-Directrice

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

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

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Cette thèse a débuté dans le laboratoire de Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire (UMR5123, UCBL) et s'est achevée dans le Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (UMR5025, UCBL) dirigé par le Pr. **Pierre Joly**, au sein de l'équipe Ecophysiologie, Comportement, Conservation du Pr. **Yann Voituron**, sous la direction du Dr. **Caroline Romestaing** et du Pr. **Claude Duchamp**.

Je voudrais tout d'abord remercier l'ensemble des membres de mon **Jury** pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse et pour la discussion très enrichissante qui a suivi ma présentation.

Merci également au Dr. **Stéphane Servais** et au Pr. **Fabien Van Coppenolle** d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et de m'avoir guidée et soutenue dans la construction de cette thèse, étape par étape.

Bien sûr, un très grand merci à mes chefs pour m'avoir encadrée pendant ces 3 années. Merci **Claude** de m'avoir fait confiance dès le Master 1 puis de m'avoir proposé un Master 2 et enfin un sujet de thèse qui correspondait vraiment à mes attentes même si cela n'a pas toujours été facile d'être en marge de ce qui se faisait habituellement au labo. Merci également de m'avoir permis de réaliser mon rêve en m'envoyant à l'autre bout du monde étudier les manchots Adélie, jamais je n'oublierai cette expérience. Et merci à toi **Caro** d'avoir accepté de co-encadrer cette thèse malgré tes nombreuses collaborations déjà en cours. Tu m'as, entre autre, transmis ton savoir sur la respiration sur fibres perméabilisées et, grâce à toi « le robot rose » n'a aujourd'hui plus aucun secret pour moi ! Merci pour ton soutien sans faille du début à la fin de cette thèse même quand tu étais à des milliers de kilomètres !

Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail de thèse. Merci au Dr. **Damien Roussel** pour le partage de son savoir mitochondrial. Merci à **Pax** pour la partie mitochondries isolées et ATP/O ! Réseaux intègres ou non, on est d'accord sur un point : « La mitochondrie c'est la vie ! ». Merci également à **Patricia** pour m'avoir appris la technique de Western Blot, merci à **Orély** pour les longues journées de respi mais aussi pour les bons plans en tout genre ! Merci au Dr. **Sandrine Pouvreau** pour m'avoir initiée à la microscopie confocale. Un de mes plus grands regrets est de ne pas avoir réussi à visualiser ces réseaux mitochondriaux chez le canard... Mais je ne perds pas espoir ! Merci également au Dr. **Dominique Desplanche** pour ses précieux conseils en matière de muscle mais également pour LA fameuse plaque à tissus !

Un merci tout particulier aux membres de la **TA61** et de la **TA62** qui m'ont permis de passer une campagne d'été mémorable tant sur le plan personnel que professionnel. Un merci tout particulier à **Coco** et **Nico** pour les échantillons bien frais et à **Benoit**, l'assistant robot rose le plus médiatisé ! Un grand merci à ma **Gégé** pour avoir pris soin de moi pendant les journées interminables en tête-à-tête avec le mouton ! Et merci à ma coupine des glaces ! J'espère que j'aurai une vie post-thèse aussi passionnante que la tienne !

Merci au **Dr. Jean-Louis Rouanet** pour son immense connaissance en matière de canard et pour la grande aide qu'il m'a apporté quant à la gestion des commandes et des box. Merci également à **Sophie et Julie** pour leur disponibilité et pour le soin aux animaux.

Cette thèse était également un partage d'expérience avec tous mes aînés de plus ou moins nombreuses années... Merci à **Cyril** pour m'avoir encadrée lorsque je faisais mes premiers pas dans le labo... Merci à **Benjamin** pour les grandes conversations en terrasse ou à la paillasse... A quelques mois près on peut dire qu'on était quand même pas mal sur la même longueur d'onde ! Merci aux **Dr Baetz, Belouze et Teulier** pour avoir partagé avec moi leurs expériences de thèse, de post-doc ou d'enseignement. Merci à **Guy** pour les longues conversations relatant ta vie passionnante autour de plus ou moins bonnes tasses de thé... Et merci aussi pour tes nombreuses anecdotes plus que pertinentes quant à l'utilité du matériel de protection en laboratoire !

Merci à tous les membres de l'équipe et notamment **Thierry, Nathalie, Mireille et Yann** pour vos précieux conseils, principalement au moment de la préparation de l'oral.

Trois années de thèse c'est beaucoup de boulot mais c'est aussi la nécessité de faire des pauses de temps en temps et de déconnecter complètement ! Merci à tous ceux qui m'ont supportée au quotidien, comprenant plus ou moins ce que c'est que de passer une thèse... Merci à **Bérengère** d'avoir été présente aussi bien côté boulot que côté détente ! Quel bonheur d'avoir eu tout au long de ma thèse une personne qui vivait « exactement » la même chose que moi et qui pouvait donc réellement me comprendre. Tu as eu un rôle plus qu'essentiel dans tellement de moments ! Merci également à ma petite **Lulu** pour le côté détente et surtout remontage de moral à travers de délicieux muffins ou autre brioche perdue... J'attends avec impatience l'ouverture de ton salon de thé ! Merci à **mes parents** et à toute **ma famille** de cœur et de sang d'avoir persisté jusqu'au dernier moment à essayer de comprendre sur quoi je travaillais... Vous voir assister à ma soutenance de thèse et tenir (presque tous) éveillés jusqu'au bout m'a vraiment fait chaud au cœur ! Merci la Team Barbala pour votre soutien ! Et surtout un grand merci à **Math et Alice** pour l'organisation de mon pot de thèse qui était juste parfait ! Vous êtes des amis qui déchiiiiirent ! Et merci à tous ceux que je n'ai pas cités, qui m'ont sorti la tête du labo à travers des journées piscine, des soirées jeux, des weekends de détente, des Karaoké, j'en passe et des meilleurs...

Merci à tous !

Implication potentielle des protéines de fusion mitochondriale dans l'ontogenèse des processus bioénergétiques musculaires chez l'oiseau

Les jeunes oiseaux exposés au froid assurent leur homéothermie en stimulant les oxydations mitochondriales dans les muscles squelettiques. L'exposition prolongée au froid accroît les capacités de thermogenèse musculaire grâce à une plasticité bioénergétique mitochondriale dont le contrôle reste hypothétique. Chez les mammifères, des protéines de fusion (les mitofusines (Mfns) et OPA1 (OPTic Atrophy 1)) participent au remaniement des réseaux dynamiques mitochondriaux dans de multiples types cellulaires. Le but de ce travail de thèse était de caractériser l'expression d'homologues aviaires des protéines de fusion mammaliennes et d'étudier leurs variations d'expression lors de la mise en place des processus bioénergétiques chez l'oiseau en croissance, lors d'une exposition aiguë ou prolongée au froid ou lors de challenges nutritionnels ou endocrines.

Sur le plan méthodologique, une approche intégrative a été utilisée de l'animal entier (calorimétrie indirecte) à l'expression protéique (western blot) ou transcriptionnelle (RT-PCR) en passant par des mesures de la fonctionnalité bioénergétique sur des fibres musculaires perméabilisées et mitochondries isolées. Deux modèles animaux ont été utilisés, une espèce naturellement adaptée aux conditions extrêmes de l'Antarctique, le manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*), et un modèle de laboratoire, le canard de Barbarie (*Cairina moschata*).

Nos résultats ont permis de caractériser chez l'oiseau l'expression de protéines de fusion (Mfn2, OPA1) immunoréactives homologues à celles des mammifères. Le séquençage d'une partie de la séquence codante des gènes codant les Mfns a montré une bonne similitude entre les espèces d'oiseaux et les mammifères. Chez le manchot, l'abondance relative de ces protéines dans les mitochondries musculaires variait avec la croissance et l'exposition thermique en corrélation positive avec les capacités bioénergétiques musculaires. Chez le canard, l'activité respiratoire et l'abondance relative de ces protéines étaient également corrélées suite à un jeûne de 60h ou, bien que dans une moindre mesure, après altération pharmacologique du statut thyroïdien.

Ces résultats montrent pour la première fois chez l'oiseau l'expression de protéines homologues aux protéines de fusion des mammifères. L'association entre les variations d'expression de ces protéines et les modifications bioénergétiques du muscle squelettique indiquent qu'elles pourraient contribuer à la plasticité bioénergétique observée chez l'oiseau en croissance. Ces résultats suggèrent que des modifications potentielles de l'organisation des réseaux mitochondriaux musculaires pourraient contribuer aux réponses adaptatives des organismes face aux contraintes environnementales.

Mots clés : Oiseaux, manchots Adélie, canetons, bioénergétique mitochondriale, fibres perméabilisées, OPA1, Mfn2, contraintes énergétiques, froid, jeûne, hormones thyroïdiennes

Potential implication of mitochondrial fusion proteins in the ontogeny of muscle bioenergetics in birds

Cold-exposed young birds maintain their homeothermy by stimulating mitochondrial oxidations in skeletal muscle. Prolonged cold exposure enhances muscle thermogenic capacities through mitochondrial bioenergetics plasticity which control still remains hypothetical. In mammals, fusion proteins (mitofusins (Mfns) and OPA1 (Optic Atrophy 1)) contribute to the permanent and dynamic changes in mitochondrial networks in multiple cell types. The aim of our work was to characterize the expression of avian homologues of mammalian fusion proteins and to study the variations of their expression during the establishment of bioenergetics processes in growing birds, during an acute or a prolonged cold exposure and finally during nutritional or endocrine challenges.

Methodologically, an integrative approach has been used from whole animal (indirect calorimetry) to protein (western-blot) or gene (RT-PCR) expression through measurements of the bioenergetics functionality of permeabilized muscle fibers and isolated mitochondria. Two animal models were used, a species naturally adapted to Antarctica harsh conditions, the Adélie penguin (*Pygoscelis adeliae*), and a laboratory model, the Muscovy duck (*Cairina moschata*).

Our results allowed us to characterize, in birds, the expression of immunoreactive fusion proteins (Mfn2, OPA1) which were homologous to those of mammals. The sequencing of a part of the coding sequence of Mfns genes showed a great similitude between avian and mammalian species. In penguins, the relative abundance of these proteins in muscle mitochondria was modified by growth in the cold and was positively correlated with muscle bioenergetics capacities. In ducks, the respiratory activity and the relative abundance of these proteins were also correlated after a 60h fasting period or, though a lesser extent, after a pharmacological alteration of thyroid status.

Our results show, for the first time in birds, the expression of proteins homologous to mammalian fusion proteins. The association between the changes in expression of these proteins and the bioenergetics modifications in skeletal muscle indicates that these proteins could contribute to the bioenergetics plasticity observed in growing chicks. These results suggest that potential modifications of the muscle mitochondrial network organization could play a role in the adaptive responses of organisms to the environmental constraints.

Keywords: *Birds, Adélie penguins, ducklings, mitochondrial activity, permeabilized fibers, OPA1, Mfn2, energetic constraints, cold, fasting, thyroid hormones*

Liste des publications et communications scientifiques

Publication présentée dans le manuscrit :

Fongy A., Romestaing C., Blanc C., Lacoste-Garanger N., Rouanet J.L., Raccurt M., Duchamp C., **Ontogeny of muscle bioenergetics in Adélie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*)**. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* (Accepté pour publication, Août 2013)

Publication non présentée dans le manuscrit :

Rey B., Romestaing C., Bodennec J., Dumet A., **Fongy A.**, Duchamp C., Roussel D., **Thyroid status affects mitochondrial membrane susceptibility to free radicals and oxidative stress markers in skeletal muscle of Muscovy duck (*Cairina moschata*)**. *Gen Comp Endocrinol* (2013, soumis)

Communications orales :

Fongy A., Romestaing C., Blanc C., Lacoste-Garanger N., Rouanet J.L., Raccurt M., Duchamp C., **Ontogénèse des processus bioénergétiques musculaires chez le poussin manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*)**. *Comité National Français des Recherches Arctiques et Antarctiques - 8èmes Journées Scientifiques*. Plouzané, France. Mai 2012.

Fongy A., Romestaing C., Blanc C., Lacoste-Garanger N., Rouanet J.L., Raccurt M., Duchamp C., **Ontogénèse des processus bioénergétiques musculaires chez le poussin manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*)**. *17^{ème} journée scientifique de l'Ecole Doctorale Inter-Disciplinaire Sciences-Santé*. Lyon, France. Octobre 2012.

Communications affichées :

Fongy A., Romestaing C., Blanc C., Lacoste-Garanger N., Rouanet J.L., Raccurt M., Duchamp C., **Ontogénèse des processus bioénergétiques musculaires chez le poussin manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*)**. *Colloque MeetOchondrie*. Soustons, France. Septembre 2012.

Fongy A., Romestaing C., Blanc C., Lacoste-Garanger N., Raccurt M., Rouanet J.L., Duchamp C., **Ontogeny of muscle bioenergetic processes in adélie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*)**. *Experimental Biology 2013*. Boston, Etats-Unis. Avril 2013.

Fongy A., Romestaing C., Blanc C., Lacoste-Garanger N., Raccurt M., Rouanet J.L., Duchamp C., **Growing in the cold, a bioenergetic challenge: The Adélie penguin (*Pygoscelis adeliae*) point of view**. *Colloque d'EcoPhysiologie Animale (CEPA) 2013*. Lyon, France. Novembre 2013

Liste des abréviations

A

ADP : Adénosine DiPhosphate

AG : Acide Gras

ANT : Adénine Nucléotide Translocase

ATP : Adénosine TriPhosphate

Ac : Anticorps

C

CA : Cold Acclimated

COX : Cytochrome-c Oxydase

Cyt c : Cytochrome-c

D

DE : Dépense Energétique

Drp : Dynamamin-related protein

E

EMG : ElectroMyogramme

EuT : EuThyroïdien

F

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FG : Fibre Glycolytique

FOG : Fibre Oxydative Glycolytique

G

G6P : Glucose-6-Phosphate

G6PDH : Glucose-6-Phosphate
Déshydrogénase

GDAP1 : Ganglioside-induced Differentiation-
Associated Protein 1

GDP : Guanosine DiPhosphate

GTP : Guanosine TriPhosphate

H

HR : Heptad Repeat

IMF : InterMyoFibrillaire

IOP : IOPanoate

IP : IntraPéritonéale

M

MAM : Mitochondria-Associated Membrane

Mfn : Mitofusine

MTP18 : MiTochondrial Protein 18

MyHC : Myosin Heavy Chain

N

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NST : Non-Shivering Thermogenesis

O

O : Oligomycine

OPA1 : OPtic Atrophy 1

OXPPOS : OXYdation - Phosphorylation

P

PC : PalmitoylCarnitine

PGC1 α : Peroxysome proliferator activator receptor Gamma Coactivator 1 α

PM : Pyruvate/Malate

PMS : Pyruvate/Malate/Succinate

PST : frisson potentialisé

PTP : Pore de Transition de Perméabilité

PTU : PropylThioUracil

R

RCR : Rapport de Contrôle Respiratoire

S

SC : Sous-cutané

SO : Slow Oxydative

SS : Subsarcolemmale

ST : Shivering Thermogenesis

STPD : Standard Temperature and Pression, Dry

T

T₃ : Triiodothyronine

T_a : Température ambiante

TAB : Tissus Adipeux Brun

T_c : Température corporelle

TCI : Température Critique Inférieure

TCS : Température Critique Supérieure

Tf : Température de frisson

TMPD : TetraMethylPhenyleneDiamine

TN : Thermoneutralité

TOM/TIM : Transporter Outer Membrane/Transporter Inner Membrane

U

UCP : UnCoupling Protein

V

VDAC : Voltage-Dependent Anion-selective Channel

Z

ZNT : Zone de Neutralité Thermique

Liste des figures

Chapitre 1 : La croissance au froid : un véritable challenge métabolique et énergétique pour l'oiseau

- Figure 1** : Représentation schématique des variations de la température corporelle (T_c), de la dépense énergétique (DE) et de la thermolyse d'un endotherme en fonction de la température ambiante (T_a) p25
- Figure 2** : Des stratégies comportementales pour faire face au froid p27
- Figure 3** : Morphologie particulière des oiseaux antarctiques tels que les manchots p28
- Figure 4** : Réponse métabolique d'un rongeur à une exposition aiguë et chronique au froid p29
- Figure 5** : Mécanismes de la production de chaleur *via* la thermogenèse de frisson p30
- Figure 6** : Variations de l'activité du frisson thermique en fonction de la température ambiante p31
- Figure 7** : Mécanismes potentiels de la thermogenèse sans frisson aviaire p33
- Figure 8** : Contrôle endocriné de la NST aviaire p34
- Figure 9** : Les oisillons nidicoles (exemple du Chardonneret élégant) naissent dépourvus de duvet et thermiquement dépendants de leurs parents p36
- Figure 10** : Les oiseaux nidifuges comme le caneton de Barbarie naissent pourvus de duvet et relativement alertes p37
- Figure 11** : Représentation schématique de la succession des mécanismes thermogènes impliqués lors d'une exposition au froid (4°C) chez le caneton p38

Chapitre 2 : Muscles, réseaux mitochondriaux et chaîne respiratoire : 3 niveaux d'adaptation aux processus de croissance au froid

- Figure 12** : Organisation du muscle squelettique p39
- Figure 13** : Schématisations de l'organisation structurale d'une fibre musculaire (A) et d'un sarcomère (B) p40
- Figure 14** : Représentation schématique d'une mitochondrie et de ses différents compartiments p46
- Figure 15** : Représentation schématique d'une chaîne respiratoire mitochondriale p48
- Figure 16** : Représentation simplifiée du cycle de Krebs p50
- Figure 17** : Deux populations mitochondriales se distinguent par leur localisation cellulaire, leur conformation et leurs propriétés fonctionnelles p53
- Figure 18** : Hétérogénéité mitochondriale en fonction du type de fibre musculaire p54
- Figure 19** : Schématisation d'un mécanisme hypothétique qui permettrait une transmission du potentiel membranaire (ΔP) entre les mitochondries d'une cellule musculaire p55
- Figure 20** : Des réseaux mitochondriaux dynamiques grâce à des mécanismes de fusion et de fission mitochondriale p55

Figure 21 : Structure et répartition de la mitofusine 2 (Mfn2)	p56
Figure 22 : Schématisation du mécanisme moléculaire de la fusion mitochondriale	p58
Figure 23 : Schématisation du mécanisme moléculaire de la fission mitochondriale	p61
Figure 24 : Modèle d'adaptation de la morphologie mitochondriale à l'activité respiratoire	p62
Figure 25 : Deux rôles des protéines de fusion	p64

Matériels et Méthodes

Figure 26 : Le canard de Barbarie (<i>Cairina moschata</i>) au stade éclosion, caneton et à l'âge adulte	p71
Figure 27 : Base scientifique Dumont D'Urville en terre Adélie	p72
Figure 28 : Le manchot Adélie passe 90% de sa vie d'adulte dans l'eau ou à se reposer sur des morceaux de banquise	p73
Figure 29 : Période de reproduction et croissance du poussin manchot Adélie durant le court été antarctique	p74
Figure 30 : Enceintes de stabulation des canetons	p75
Figure 31 : Illustration des différents éléments composant la chaîne métabolique	p76
Figure 32 : Représentation schématique des échanges respiratoires dans une chambre métabolique	p76
Figure 33 : Biopsie du muscle pectoral	p78
Figure 34 : Protocole de dissociation des fibres musculaires	p79
Figure 35 : Illustration des courbes obtenues lors d'une respiration mitochondriale classique et des effets des substrats sur les différents complexes de la chaîne respiratoire	p82
Figure 36 : Principe de la mesure du rapport ATP/O	p83
Figure 37 : Gammes de cycles d'amplification des Mfns 1 et 2	p86
Figure 38 : Principe de la technique de western blot	p89

Etude 1

Figure 39 : Protocole expérimental pour l'étude de l'effet de l'âge et de l'acclimatation au froid sur l'expression des protéines de fusion	p93
Figure 40 : Photographie d'un gel de migration des produits PCR illustrant l'amplification des Mfns 1 et 2 dans le muscle gastrocnémien interne de canard	p94
Figure 41 : Séquences nucléotidiques des gènes codant les Mfns 1 et 2	p95
Figure 42 : Expression tissulaire des ARNm de la Mfn1 et de la Mfn2	p96
Figure 43 : Détection par Western Blot d'un homologue de la protéine Mfn2	p97
Figure 44 : Détection par Western Blot d'un homologue de la protéine OPA1	p97
Figure 45 : Détection par Western Blot d'un homologue de la protéine Mfn2 (86 kDa) dans les 2 populations de mitochondries (SS et IMF) du muscle squelettique de canard	p98
	p99

Figure 46 : Suivi de la masse corporelle (en g) en fonction de l'âge des canards élevés à 25°C (TN, n=6) et à 4°C (CA, n=6)	
Figure 47 : Variation de l'abondance relative des transcrits codant les mitofusines 1 et 2 en PCR semi-quantitative	p100
Figure 48 : Variation de l'abondance relative des transcrits codant les mitofusines 1 et 2 en PCR semi-quantitative (Pec)	p101
Figure 49 : Effet de la croissance et de l'exposition au froid sur l'abondance relative de la protéine Mfn2 dans le muscle pectoral de canard	p102
Figure 50 : Effet de la croissance et de l'exposition au froid sur l'abondance relative de la protéine OPA1 dans le muscle pectoral de canard	p103

Etude 2

Figure 51 : Suivi des masses corporelles des canards élevés à 25°C ou à 4°C	p142
Figure 52 : Consommation d'oxygène des fibres perméabilisées du muscle pectoral des canetons en croissance à thermoneutralité, de 9 à 36 jours	p143
Figure 53 : Consommation d'oxygène des fibres perméabilisées du muscle pectoral des canetons au cours d'une exposition au froid aiguë	p145
Figure 54 : Consommation d'oxygène des fibres perméabilisées du muscle pectoral des canetons au cours d'une exposition au froid prolongée	p146
Figure 55 : Abondance relative des protéines de fusion mitofusine 2 et optic atrophy 1 analysées par western blot sur des mitochondries isolées de muscle pectoral de canetons	p148
Figure 56 : Expression de l'abondance relative des protéines de fusion en fonction de l'activité respiratoire des fibres musculaires	p149

Etude 3

Figure 57 : Diminution de la masse corporelle après 48h et 60h de jeûne par rapport à la valeur témoin correspondant aux mêmes canards à l'état nourri <i>ad libitum</i>	p159
Figure 58 : Comparaison de la dépense énergétique de repos de canards à l'état nourri <i>ad libitum</i> puis à jeun depuis 48h	p159
Figure 59 : Consommation d'oxygène des fibres perméabilisées du muscle pectoral de canards à jeun depuis 60h par comparaison avec des canetons témoins nourris <i>ad libitum</i>	p160
Figure 60 : Consommation d'oxygène des mitochondries isolées du muscle pectoral de canards à jeun depuis 60h par comparaison avec des canetons témoins nourris <i>ad libitum</i>	p161
Figure 61 : Diminution de la capacité maximale de production d'ATP (rapport ATP/O) après un jeûne de 60h	p162

Figure 62 : Abondance relative des protéines de fusion mitofusine 2 et optic atrophy 1 analysée par western blot sur des mitochondries isolées de canetons témoins nourris <i>ad libitum</i> ou à jeun	p163
Figure 63 : Corrélation entre l'activité respiratoire des fibres musculaires et l'abondance relative des protéines de fusion mitochondriale Mfn2 et OPA1 chez les canetons en fonction de leur statut nutritionnel	p164
Figure 64 : Paramètres physiologiques mesurés pour vérifier l'effet des traitements	p172
Figure 65 : Dépense énergétique de repos des canards en fonction du statut thyroïdien	p173
Figure 66 : Modifications de la quantité de mitochondries en fonction du statut thyroïdien	p174
Figure 67 : Consommation d'oxygène des mitochondries isolées du muscle quadriceps de canard en fonction du statut thyroïdien	p175
Figure 68 : Modifications du rendement mitochondrial (ATP/O) en fonction du statut thyroïdien	p176
Figure 69 : Comparaison de la consommation d'oxygène des fibres perméabilisées du muscle quadriceps de canards en fonction su statut thyroïdien	p177
Figure 70 : Abondance relative des protéines de fusion mitofusine 2 (Mfn2 ; 86 kDa) et optic atrophy 1 (OPA1 ; 90-110 kDa) analysée par western blot sur des mitochondries isolées du muscle quadriceps de canards (50µg) de statuts thyroïdiens différents	p178
Figure 71 : Absence de corrélation entre l'activité respiratoire des fibres musculaires et l'abondance relative des protéines de fusion mitochondriale Mfn2 et OPA1 chez les canards de statuts thyroïdiens différents	p179

Discussion, Conclusion & Perspectives

Figure 72 : Des réseaux mitochondriaux dynamiques grâce à des mécanismes de fusion	p188
Figure 73 : Modèle des processus de mitophagie	p193

Liste des tableaux

Matériels et Méthodes

- Tableau 1** : Séquences des amorces utilisées en PCR semi-quantitative pour les différents gènes et nombres de cycles de PCR associés p85
- Tableau 2** : Séquences des amorces utilisées pour les différents gènes utilisés en PCR quantitative p86

Table des matières

Avant-propos	p20
Introduction et rappels bibliographiques	p24
<i>Chapitre 1 : La croissance au froid : un challenge énergétique pour l'oisillon</i>	
I - S'adapter aux contraintes environnementales	p24
1 - Ectothermes <i>versus</i> endothermes	p24
2 - Températures critiques	p25
II - Régulation de la thermogenèse au froid chez l'oiseau	p26
1 - Différentes stratégies	p26
a- Des stratégies comportementales	p27
b- Des stratégies morphologiques	p27
c- Des stratégies vasculaires et métaboliques	p28
2 - La thermogenèse de frisson	p29
a- Définition	p29
b- Mécanisme	p30
c- Différentes activités de frisson	p31
3 - La thermogenèse sans frisson	p32
a- Définition	p32
b- Mécanismes de la NST aviaire	p32
c- Contrôle endocrine	p34
III - Ontogenèse de la thermogenèse de régulation	p35
1 - Espèces nidicoles	p35
2 - Espèces nidifuges	p36
3 - Mise en place progressive des mécanismes de thermogenèse	p37
<i>Chapitre 2 : Muscles squelettiques et réseaux mitochondriaux : adaptations à des contraintes énergétiques</i>	
I - Le muscle squelettique	p39
1 - Structure des fibres musculaires	p39
2 - La contraction musculaire	p40
3 - Propriétés contractiles des fibres musculaires	p40
a- Caractéristiques fonctionnelles	p41
b- Caractéristiques métaboliques des fibres	p41
c- Caractéristiques physiologiques	p42
4 - Ontogenèse et développement du tissu musculaire	p42
5 - Modifications physiologiques du muscle au froid	p43
II - Le métabolisme énergétique cellulaire	p44
III - Les mitochondries	p45
1 - Origine et historique	p45
2 - Structure	p45
3 - Fonctionnement	p47
4 - Modulation de l'efficacité mitochondriale	p48
a- La composition membranaire	p49
b- La nature des substrats utilisés	p49
c- Les transporteurs protéiques de métabolites ou d'ions	p50
d- Rôle du calcium	p51
5 - Différentes populations mitochondriales	p52
6 - Une organisation mitochondriale en réseaux	p54
IV - Des réseaux mitochondriaux dynamiques - Description chez les mammifères	p55
1 - La fusion mitochondriale	p56
a- Les mitofusines 1 et 2	p56
b- OPA1	p57
c- Mécanismes moléculaires de la fusion	p58
2 - La fission mitochondriale	p59

a-	Les protéines impliquées	p59
b-	Mécanismes de la fission	p60
3 -	Relation structure/fonction énergétique mitochondriale	p61
a-	Modifications de l'activité mitochondriale	p62
b-	Modifications de l'expression des protéines de fusion/fission	p63
4 -	Les modifications des réseaux	p64
a-	Conditions physiologiques : exercice et froid	p64
b-	Conditions pathologiques	p65
V-	protéines de fusion/fission chez l'oiseau ?	p66

Objectifs de la thèse Matériels et méthodes

p68
p71

I -	Modèles d'étude	p71
1 -	Le canard de Barbarie : un modèle de laboratoire	p71
2 -	Le manchot Adélie : un modèle naturel de croissance au froid	p72
II -	Protocole expérimental <i>in vivo</i>	p74
1 -	Les canetons de Barbarie	p74
a-	Provenance et stabulation	p74
b-	Suivi de la croissance et mesure de la dépense énergétique	p75
c-	Prélèvements des tissus	p77
2 -	Les Manchots Adélie	p77
III -	Etudes biochimiques	p78
1 -	Préparation des fibres musculaires perméabilisées	p78
2 -	Isolement des mitochondries	p80
3 -	Respiration mitochondriale	p80
4 -	Activité de la Cytochrome-c Oxydase (Complexe IV)	p83
5 -	Mesure de l'efficacité mitochondriale (rapport ATP/O)	p83
IV -	Etude moléculaire	p84
1 -	Etude des transcrits des mitofusines	p84
a-	Extraction et dosage des acides ribonucléiques (ARN) totaux	p84
b-	Transcription inverse (RT) des ARN messagers (ARNm)	p84
c-	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) semi-quantitative	p85
d-	Analyse des produits PCR	p86
e-	Séquençage des mitofusines	p86
2 -	Etude protéique de la Mfn2 et d'OPA1	p87
a-	Extraction et dosage des protéines	p87
b-	Préparation des gels de migration et des échantillons	p88
c-	Migration et transfert	p88
d-	Immunodétection	p90
e-	Révélation	p90
V -	Etude statistique	p90

Etude 1 : Caractérisation des protéines de fusion mitochondriale chez l'oiseau, mise au point des techniques de détection génique et protéique

p92

I -	Introduction	p92
II -	Animaux	p92
III -	Objectifs de l'étude	p93
IV -	Résultats	p94
1 -	Détection des transcrits des mitofusines 1 et 2	p94
a-	RT-PCR	p94
b-	Séquençage des ADNc amplifiés	p94
c-	Profil d'expression génique des mitofusines chez le canard	p95
2 -	Détection des protéines de fusion par western blot	p96
a-	Dans les muscles squelettiques	p96
b-	En fonction du type de mitochondries	p97
3 -	Effets de l'âge et de la température d'élevage sur l'expression musculaire des protéines de fusion	p98
a-	Croissance pondérale	p98

b-	Abondance des ARNm codant les mitofusines	p99
c-	Abondance relative des protéines de fusion Mfn2 et OPA1	p101
V -	Discussion	p103
1 -	Expression d'homologues des protéines de fusion chez le canard	p104
2 -	Variation de l'expression des mitofusines avec la croissance	p105
3 -	Variation des protéines de fusion avec l'exposition au froid	p106
4 -	Mitofusines et mécanismes thermogènes	p108
VI -	Conclusion	p109

Etude 2 : Mise en place des processus bioénergétiques au cours de la croissance au froid chez l'oiseau **p112**

Partie 1 : Le manchot Adélie (Pygoscelis adeliae) **p112**

	Résumé	p114
	Abstract	p115
I -	Introduction	p116
II -	Materials and Methods	p118
1 -	Animals	p118
2 -	Experimental design	p118
3 -	Permeabilized muscle fiber preparation and respiration	p119
4 -	Mitochondrial respiration and isolation	p119
5 -	Western blot analysis	p120
6 -	Statistical analysis	p121
III -	Results	p122
1 -	Body growth	p122
2 -	Permeabilized muscle fiber respiration rates	p123
3 -	Tissue mitochondrial protein content and COX activity	p125
4 -	Mitochondrial respiration rates	p126
5 -	Extrapolation of mitochondrial to pectoral muscle fiber respiration	p128
6 -	Expression of fusion proteins in growing chicks and adults	p129
7 -	Correlation between respiratory activity of muscle fibers and fusion protein relative abundance in muscle mitochondria	p132
IV -	Discussion	p133
1 -	Comparison of permeabilized fibers and isolated mitochondria	p133
2 -	Increase in skeletal muscle oxidative capacity during post-hatching ontogenesis	p134
3 -	Ontogenic changes in mitochondrial characteristics	p135
4 -	Expression of immunoreactive fusion proteins in penguin skeletal muscle relates to fiber energetics	p136
5 -	Perspectives	p138

Partie 2 : Le canard de Barbarie (Cairina moschata) **p140**

I -	Introduction	p140
II -	Matériel et Méthode	p141
1 -	Animaux	p141
2 -	Protocole expérimental	p141
3 -	Analyses statistiques	p142
III -	Résultats	p143
1 -	Modifications des capacités énergétiques mitochondriales au cours de la croissance à TN (25°C)	p143
2 -	Modifications bioénergétiques au cours d'une exposition aiguë au froid	p144
3 -	Modifications bioénergétiques au cours d'une exposition prolongée au froid	p146
4 -	Abondance relative des protéines de fusion dans les mitochondries musculaires au cours de la croissance et en fonction de la durée d'exposition au froid	p147
5 -	Activité respiratoire vs abondance relative des protéines de fusion	p148
IV -	Discussion	p149
1 -	La croissance à thermoneutralité	p150
2 -	Effet d'une exposition aiguë au froid	p151

3 - Effet d'une exposition au froid prolongée	p153
V - Conclusion	p155

Etude 3 : Régulation des protéines de fusion : dépression métabolique / statut endocrine ? **p157**

Partie 1 : Effet d'un jeûne alimentaire de 60h sur la bioénergétique mitochondriale et l'expression des protéines de fusion **p157**

I - Introduction	p158
II - Matériels et Méthodes	p158
III - Résultats	p159
1 - La masse corporelle	p159
2 - La dépense énergétique de repos	p159
3 - Activité bioénergétique des fibres musculaires perméabilisées	p160
4 - L'activité mitochondriale	p161
5 - Expression des protéines de fusion	p163
6 - Corrélation entre expression des protéines de fusion et activité bioénergétique	p164
IV - Discussion	p164
1 - Jeûne alimentaire et métabolisme	p165
2 - Jeûne alimentaire et protéines de fusion	p166
V - Conclusion	p168

Partie 2 : Effets des hormones thyroïdiennes sur la bioénergétique mitochondriale et l'expression des protéines de fusion **p169**

I - Introduction	p169
II - Matériels et méthodes	p170
1 - Animaux	p170
2 - Protocole expérimental	p171
3 - Analyses statistiques	p171
III - Résultats	p172
1 - Modifications physiologiques	p172
2 - La dépense énergétique de repos	p173
3 - L'activité mitochondriale	p174
4 - Activité bioénergétique des fibres musculaires perméabilisées	p177
5 - Expression des protéines de fusion	p178
6 - Corrélation expression des protéines de fusion vs activité bioénergétique	p179
IV - Discussion	p180
1 - Validation des traitements	p180
2 - Statut thyroïdien et bioénergétique mitochondriale	p181
3- Statut thyroïdien et protéines de fusion mitochondriale	p182
4 - Faible corrélation entre l'expression des protéines de fusion et l'énergétique musculaire	p183
V - Conclusion	p184

Discussion, Conclusion & Perspectives **p186**

I - Mises au point méthodologique : caractérisation de protéines de fusion aviaire	p186
II - Mises au point méthodologique : les fibres perméabilisées	p188
III - Contraintes énergétiques et plasticité mitochondriale	p189
IV - Activité métabolique et abondance relative des protéines de fusion	p191
V - Contrôle endocrine de l'expression des protéines de fusion	p194
VI - Conclusion	p196

Références bibliographiques **p198**

Avant-propos

Avant-propos

Les êtres vivants ont su coloniser la quasi-totalité de la planète malgré les variations climatiques extrêmes entre les différentes niches écologiques. La plus grande variété d'espèces se retrouve dans les zones tempérées ou tropicales, mais certaines d'entre elles ont su s'adapter à des espaces hostiles comme les milieux de haute altitude où la pression atmosphérique est très faible, les zones désertiques arides où les températures peuvent dépasser 50°C ou au contraire descendre en dessous de -80°C pour le territoire antarctique et où les rayonnements UV sont très importants. Les espaces océaniques ont également été largement colonisés incluant les zones les plus froides où la température de l'eau avoisine les -1.9°C comme dans les zones polaires, mais aussi les zones profondes où la luminosité est fortement réduite et où les pressions sont extrêmement élevées.

Avec près de 10000 espèces répertoriées, les oiseaux sont les endothermes les plus représentés dans les quatre coins du monde. Ils ont su conquérir les milieux les plus hostiles grâce à des adaptations comportementales telles que la migration lorsque le climat devient moins propice à leur survie ou grâce à des adaptations physiologiques leur permettant de survivre dans des environnements extrêmes. C'est ainsi que l'on peut croiser une oie à tête barrée survolant les plus hautes crêtes de l'Himalaya, à plus de 9000 mètres d'altitude, ou des manchots empereurs affrontant l'hiver antarctique et résistant à des températures avoisinant -60°C et à des vents pouvant atteindre 200 km/h. Les oiseaux ont également su coloniser les territoires aquatiques. On retrouve en effet de nombreuses espèces d'oiseaux marins passant la plus grande partie de leur vie au-dessus des océans et s'alimentant principalement de produits de la mer. Parmi eux, les manchots sont les oiseaux marins les plus exceptionnels. Ils ont en effet perdu la capacité de voler au profit d'adaptations à la nage. Certains manchots passent 90% de leur vie dans les eaux antarctiques où la température avoisine 0°C et sont capables de plonger à des profondeurs record de 500 m.

Ces incroyables capacités physiques proviennent à la fois de l'évolution de leur morphologie et de leur physiologie interne. En effet, avec des extrémités très réduites, un faible rapport surface/volume, un plumage très dense et épais, une importante couche de graisse sous-cutanée et une relative tolérance à l'hypothermie, les manchots sont bien armés pour résister au froid. Ils disposent également de fortes capacités thermogènes leur permettant de maintenir une température interne de 38-39°C malgré les températures ambiantes extrêmement faibles.

Le muscle squelettique est le tissu thermogène majeur chez les oiseaux qui ne possèdent pas de tissu adipeux brun, le tissu thermogène des mammifères nouveau-nés et des petits rongeurs. De par sa masse, le muscle pectoral des manchots qui contribue fortement à l'activité de nage lors de la recherche de nourriture en mer joue un rôle quantitatif majeur dans la thermogenèse de régulation. Des études menées au sein de notre laboratoire ont montré que l'exposition au froid chez le manchot royal ou le canard de Barbarie entraîne une plasticité mitochondriale importante se traduisant par une augmentation de la quantité, de la morphologie et de l'activité des mitochondries musculaires. Aucune étude des variations de l'activité mitochondriale du muscle squelettique au cours de la croissance n'a à notre connaissance été réalisée, que ce soit sur le canard, espèce domestique élevée en laboratoire, ou chez les manchots vivant en milieu polaire. Le manchot Adélie est particulièrement intéressant dans ce contexte car il a une période de reproduction très courte en bordure du continent antarctique, ce qui impose une croissance accélérée des poussins. En effet, en 2 mois les poussins acquièrent leur taille et leur plumage d'adulte et sont capables de partir en mer à la recherche de nourriture. Grandir vite dans un milieu aussi froid représente une double contrainte énergétique puisque les poussins vont devoir allouer une grande partie de leur énergie à la production de chaleur, au détriment de leur croissance.

Les études réalisées au laboratoire ont jusque-là abordé les mitochondries comme des organites isolées mais il est aujourd'hui connu que, chez de nombreuses espèces, les mitochondries sont organisées en réseaux mitochondriaux dynamiques grâce à des mécanismes de fusion ou de fission permettant une modulation de l'activité mitochondriale en fonction des besoins énergétiques des cellules. Chez les mammifères, cette organisation en réseaux dans le muscle squelettique présente des différences notables en fonction du type de fibres musculaires. Les contraintes énergétiques imposées au muscle squelettique pour associer croissance et thermogenèse, lors d'une exposition précoce au froid des jeunes oiseaux, pourraient entraîner des modulations de cette organisation. Cette modulation pourrait être permise par des modifications de l'abondance des protéines de fusion (les Mitofusines (Mfns) et la protéine OPA1 (OPTic Atrophy 1)) ou des protéines de fission (Drp1 (Dynamin related protein 1) et Fis1 (Fission 1)). Aucune donnée sur la présence et le rôle de ces protéines n'existe chez l'oiseau mais des homologues aviaires de ces protéines peuvent être suspectés à partir de la séquence du génome de poulet. Une réorganisation des réseaux mitochondriaux musculaires pourrait également être envisagée dans les situations de dépression du métabolisme musculaire comme par exemple lors de la privation d'alimentation, situation fréquemment rencontrée par les manchots à terre.

Si le manchot Adélie représente un modèle particulièrement intéressant pour étudier la mise en place complexe des processus bioénergétiques au cours de la croissance au froid, son statut d'espèce sauvage lui confère certaines limites expérimentales. De plus, la croissance en milieu naturel ne permet pas d'isoler la température ou l'âge comme seuls facteurs de variation, ce qui peut compliquer l'interprétation des données. Afin de nous affranchir de ces limitations, nous avons utilisé, en parallèle, le canard de Barbarie comme modèle expérimental de laboratoire.

La première partie de cette thèse, sous forme de rappels bibliographiques, servira à replacer nos études expérimentales dans le contexte scientifique actuel. Les principales études portant sur les processus thermogènes lors de la croissance au froid des oiseaux et plus particulièrement sur nos deux modèles d'étude seront synthétisées. Les données existantes sur les modifications fonctionnelles connues du muscle squelettique, le tissu thermogène le plus impliqué dans les mécanismes d'acclimatation au froid chez l'oiseau, seront abordées. Les concepts actuels sur la modulation des réseaux mitochondriaux *via* des mécanismes de fusion/fission seront présentés.

La deuxième partie « matériels et méthodes » reprendra les différentes techniques utilisées et notamment les méthodes de caractérisation des protéines par western-blot et de respiration sur fibres musculaires perméabilisées qui ont représenté la majeure partie des mises au point au cours de mes travaux.

La troisième partie sera consacrée à la présentation de l'ensemble des résultats expérimentaux recueillis au cours de mes travaux de thèse.

Enfin, la quatrième et dernière partie permettra de discuter dans leur ensemble des différents résultats et de formuler des perspectives quant à l'ontogenèse des processus bioénergétiques au cours de la croissance au froid chez l'oiseau.

*Introduction & rappels
bibliographiques*

Chapitre 1

La croissance au froid : un challenge énergétique pour l'oisillon

I - S'adapter aux contraintes environnementales

La température constitue un paramètre physique de l'environnement parmi les plus contraignants, l'hypo- ou l'hyperthermie pouvant être létales pour les organismes. Ainsi, résister au chaud ou au froid devient rapidement couteux en termes hydriques ou énergétiques. Tous les organismes, ectothermes et endothermes, vivant dans des milieux de vie non tamponnés, subissent des contraintes environnementales.

1 - Ectothermes versus endothermes

Les ectothermes, comprenant les insectes, les amphibiens, les reptiles et les poissons, ont une température interne qui varie de façon directement proportionnelle à la température ambiante. En subissant les variations thermiques de l'environnement, leur température corporelle peut atteindre des températures très basses, d'où leur appellation familière d'animaux à sang froid, mais ils peuvent également atteindre des températures très élevées. Pour lutter contre le chaud ou le froid, les ectothermes utilisent principalement des stratégies comportementales comme l'évitement ou l'enfouissement. Exposés à un froid extrême, ils peuvent développer différents mécanismes physiologiques de défense, 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 aux ectothermes, les endothermes, comprenant les mammifères et les oiseaux, se caractérisent par leur capacité à réguler leur température interne à un niveau élevé et constant sur une large gamme de températures, appelée zone d'homéothermie. Lorsque la température ambiante (T_a) varie, ils mettent en place des mécanismes d'ajustement physiologique aigu puis d'acclimatation si la contrainte perdure.

En maintenant leur température interne, les endothermes s'affranchissent des contraintes de température ambiante et gardent un métabolisme optimal pour assurer leurs fonctions vitales malgré les aléas thermiques de l'environnement. Cependant, ce système de

régulation thermique représente un important budget énergétique qui, en période de carence alimentaire, peut être difficile à maintenir.

2 - Températures critiques

Les réponses thermolytiques et/ou thermogéniques mises en jeu par les endothermes lors d'une exposition aiguë à une température ambiante donnée sont illustrées dans la figure 1. La plupart des endothermes sont généralement mieux équipés physiologiquement pour lutter contre le froid (thermogenèse) que contre le chaud (thermolyse).

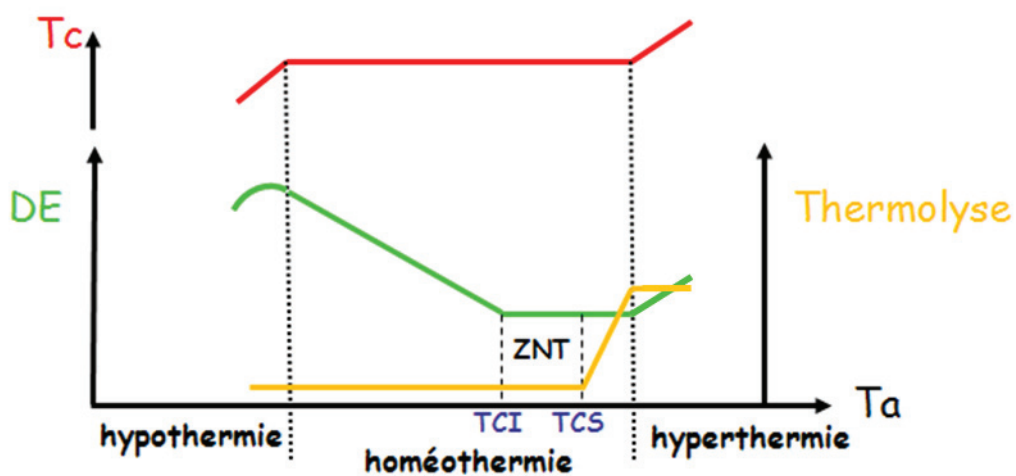


Figure 1 : Représentation schématique des variations de la température corporelle (T_c), de la dépense énergétique (DE) et de la thermolyse d'un endotherme en fonction de la température ambiante (T_a). Afin de maintenir une T_c constante, la production de chaleur augmente (courbe verte) au-dessous de la température critique inférieure (T_{CI}) ou inversement, les mécanismes de thermolyse (courbe jaune) sont activés au-dessus de la température critique supérieure (T_{CS}). Sur une courte plage de températures, la dépense énergétique de repos suffit à équilibrer les pertes vers l'environnement, aucun mécanisme thermogène ou thermolytique particulier n'est activé, on parle de zone de neutralité thermique (ZNT). Lorsque les mécanismes thermogènes ou thermolytiques sont dépassés, l'animal entre en hypothermie ou hyperthermie. (D'après Barré *et al.*, 2001)

Sur une petite plage de températures qu'on appelle la zone de neutralité thermique (ZNT), le fonctionnement basal des cellules suffit à équilibrer le budget thermique, sans recourir à des mécanismes thermogènes ou thermolytiques particuliers. Par contre, lorsque la T_a augmente et dépasse la température critique supérieure (T_{CS}), des mécanismes thermolytiques comme la vasodilatation périphérique, la sudation ou la polypnée thermique sont activés pour évacuer la chaleur corporelle excessive et conserver une température interne constante, sans élévation du métabolisme. Si la T_a augmente trop, les capacités

thermolytiques de l'organisme ne sont plus suffisantes pour évacuer la chaleur de l'organisme. La chaleur produite par l'organisme et celle captée de l'environnement s'accumulent et entraînent une hyperthermie qui, par effet Q10, augmente le métabolisme, ce qui génère encore plus de chaleur et conduit à un désordre métabolique léthal. A l'inverse, lorsque la T_a diminue et passe en dessous de la température critique inférieure (TCI), des mécanismes thermogènes sont activés pour compenser l'accroissement des pertes de chaleur avec l'environnement. En dessous d'une certaine T_a , les capacités maximales de thermogénèse de régulation sont atteintes et ne permettent plus de compenser les pertes thermiques. Le déficit de chaleur créé entraîne une hypothermie qui, par effet Q10, réduit encore la production métabolique de chaleur, conduisant à terme au dérèglement des fonctions physiologiques et à la mort de l'animal.

Le froid comme le chaud représentent donc des contraintes extrêmes pour les endothermes dont la survie dépend de leur capacité d'ajustement des échanges thermiques. Si la contrainte thermique perdure, des processus d'acclimatement des organismes sont mis en place pour améliorer la gestion du budget thermique.

II - Régulation de la thermogénèse au froid chez l'oiseau

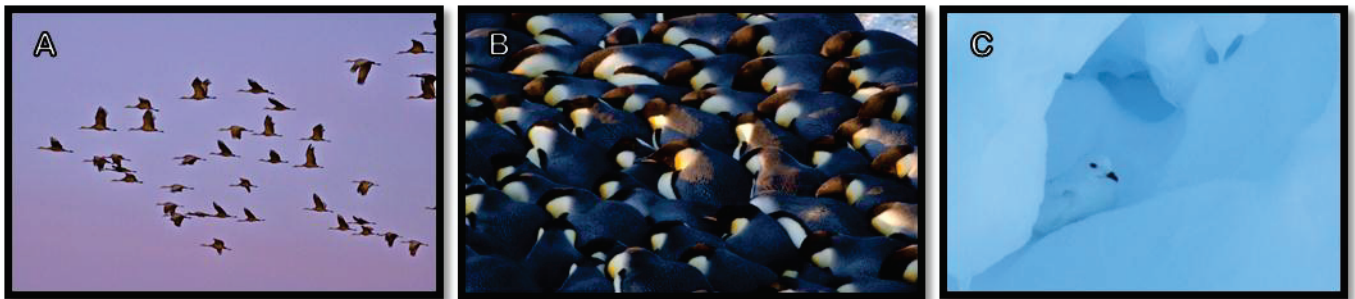
1 - Différentes stratégies

La classe des Oiseaux forme le groupe le plus important du sous-embranchement des vertébrés endothermes. On recense plus de 10000 espèces d'oiseaux contre 5400 espèces de mammifères (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 (Williams and Tieleman, 2001), de haute-altitude (Willmer *et al.*, 2000), polaires en arctique (Scholander *et al.*, 1950) ou en antarctique (Shirihai *et al.*, 2009).

Dans la lutte contre le froid, on peut identifier 3 stratégies qui se mettent en place progressivement en fonction de la durée et de l'intensité de l'exposition au froid :

a - Des stratégies comportementales

Observées généralement dans les premiers temps d'une exposition au froid (figure 2), les stratégies comportementales peuvent être réalisées à l'échelle individuelle et/ou interindividuelles et mises en place à plus ou moins long terme (Schmidt-Nielsen, 1997). On retrouve par exemple l'évitement (migration), l'enfouissement (terriers et abris de certains oiseaux polaires), les regroupements (« turtle huddling » des Manchots empereurs), le repli sur soi pour protéger les extrémités et minimiser la surface corporelle en contact avec l'environnement ou la piloérection permettant d'augmenter la couche d'air isolante les entourant.



© Françoise Amélineau

Figure 2 : Des stratégies comportementales pour faire face au froid. Selon les espèces d'oiseaux, on peut observer des stratégies (A) d'évitement (migration), (B) de regroupement (tortue des manchots empereurs) ou (C) d'enfouissement (pétrel des neiges à l'abri du vent dans une grotte de glace).

b - Des stratégies morphologiques

Les animaux des régions polaires ont en effet des extrémités réduites (membres locomoteurs, oreilles) et un rapport surface/volume très diminué. Ces modifications morphologiques, apparues au cours de l'évolution des animaux vivant dans des environnements très froids (Figure 3), permettent de réduire les pertes thermiques vers l'environnement. Ces animaux polaires ont aussi généralement une croissance rapide et une isolation thermique renforcée (forte densité de plumage ou du pelage, augmentation de la couche adipeuse sous-cutanée).

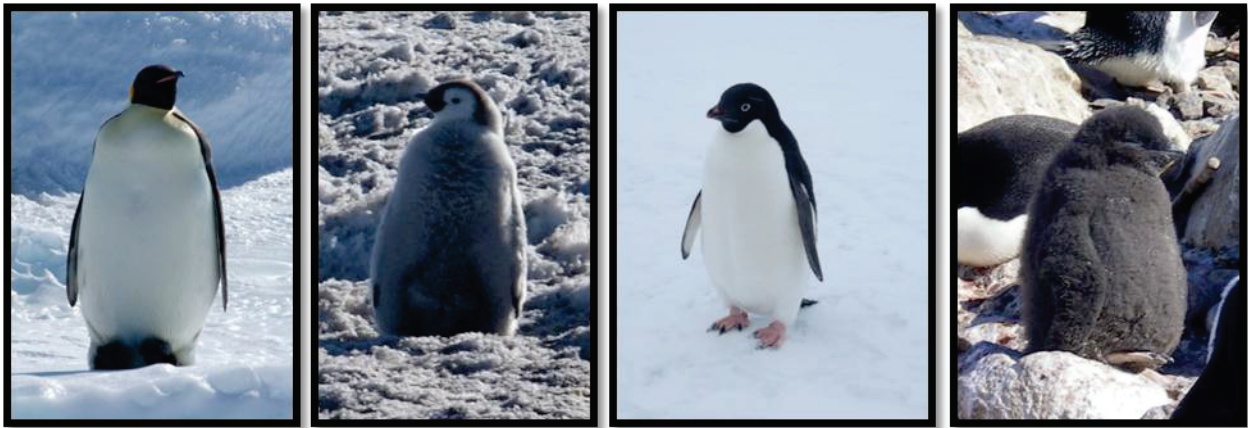


Figure 3 : Morphologie particulière des oiseaux antarctiques tels que les manchots. Qu'il s'agisse du manchot empereur adulte ou poussin (à gauche) ou du manchot Adélie adulte ou poussin (à droite), on retrouve des extrémités réduites, et un très faible rapport surface/volume grâce à leur morphologie ovoïde.

c - Des stratégies vasculaires et métaboliques

En plus de l'épaississement de la couche de graisse sous-cutanée, l'isolation thermique interne des endothermes est également renforcée par l'amélioration des réponses vasomotrices. En effet, la vasoconstriction périphérique et la mise en place d'anastomoses artérioveineuses, qui sont particulièrement abondantes au niveau de la base des ailerons de manchots (Trawa, 1970), jouent un rôle important dans la réduction des pertes de chaleur périphériques par convection. Les modifications métaboliques consistent en une augmentation transitoire du métabolisme de base, une augmentation des capacités de thermogénèse maximale, et enfin l'apparition d'une thermogénèse indépendante de l'activité motrice des muscles, la thermogénèse sans frisson (NST). Cette dernière modification est considérée comme la plus caractéristique de l'acclimatement au froid des endothermes (Cannon and Nedergaard, 2004; Jansky, 1973). En effet, au cours d'une exposition au froid de longue durée, le frisson thermique, qui est le premier moyen mis en œuvre pour produire de la chaleur, diminue progressivement d'intensité pour finalement disparaître après quelques semaines au froid, alors que la thermogénèse de régulation persiste (Cannon and Nedergaard, 2004; Jansky, 1973). La thermogénèse de frisson est ainsi progressivement remplacée par une thermogénèse sans frisson plus confortable pour l'animal que le frisson thermique, et probablement moins préjudiciable pour la fonction motrice. Ces mécanismes de NST sont bien caractérisés chez le rongeur avec le recrutement du tissu adipeux brun (Figure 4) (Cannon et Nedergaard, 2004).

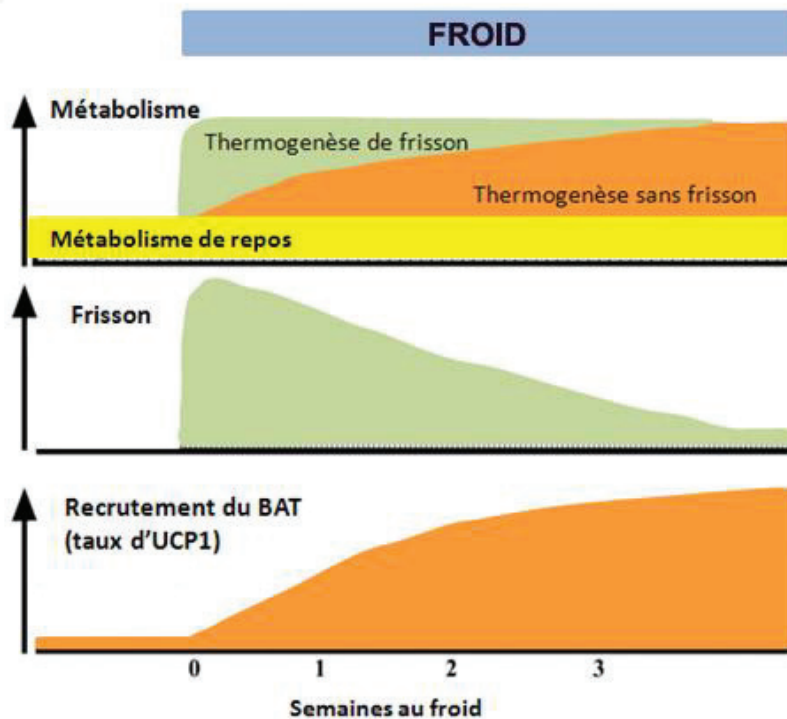


Figure 4 : Réponse métabolique d'un rongeur à une exposition aiguë et chronique au froid. Lorsque l'animal est placé dans un environnement froid (5°C), son métabolisme de base augmente d'environ 4 fois. Cette augmentation du métabolisme est d'abord due à la thermogénèse de frisson. L'intensité du frisson est immédiatement très élevée puis diminue progressivement, laissant place à une thermogénèse sans frisson associée au recrutement du tissu adipeux brun chez le mammifère (D'après Cannon and Nedergaard, 2004).

2 - La thermogénèse de frisson

Chez les mammifères et les oiseaux non acclimatés/adaptés au froid, la thermogénèse de régulation est essentiellement localisée dans le muscle squelettique où elle résulte soit de l'activité motrice basale, soit de l'augmentation du tonus musculaire, soit enfin du frisson thermique (Duchamp *et al.*, 1999).

a - Définition

Le frisson est un tétanos imparfait des muscles squelettiques, lié aux contractions asynchrones des muscles antagonistes, conduisant à une production de chaleur sans mouvement locomoteur (Commission IUPS, 2001; Duchamp, 1990). Il répond à un stimulus « froid », détecté par les thermorécepteurs périphériques et centraux. Après intégration centrale, les motoneurones α transmettent l'information nerveuse activatrice jusqu'aux effecteurs principaux de cette thermogénèse, les muscles squelettiques.

Le frisson apparaît séquentiellement en fonction du type de muscle (Aulie and Toien, 1988; Duchamp, 1990) : les muscles à tendance oxydative frissonnant plus précocement que les muscles plus glycolytiques qui ne seraient recrutés que si la capacité de production de chaleur est insuffisante. Chez les Oiseaux les principaux muscles impliqués dans le frisson sont les muscles des pattes (oxydatifs) et le pectoral (mixte, oxydatif-glycolytique).

b - Mécanisme

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 la myosine ATPase des myofilaments (Figure 5). Cette consommation accrue d'ATP nécessite une resynthèse accrue et donc une augmentation du métabolisme mitochondrial d'environ 4 à 5 fois lorsqu'il est stimulé de façon maximale (contre 20 fois pour un exercice locomoteur tel que le vol). L'énergie produite par les mitochondries, normalement utilisée pour un travail mécanique, est principalement dissipée sous forme de chaleur lors du frisson thermique (Block, 1994; Jansky, 1973; Marjoniemi, 2001).

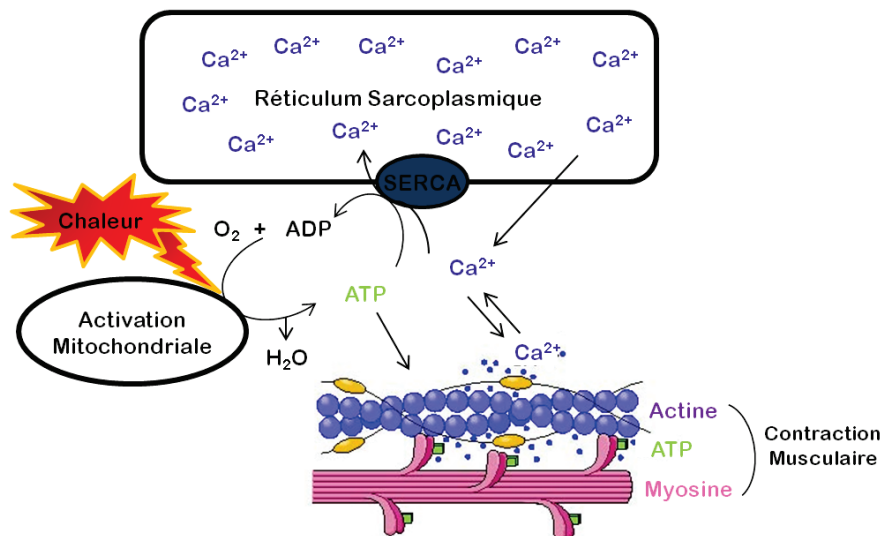


Figure 5 : Mécanisme de la production de chaleur via la thermogénèse de frisson. La forte demande d'ATP pour la contraction musculaire et la recapture du calcium dans le réticulum sarcoplasmique entraîne une activation du métabolisme mitochondrial. L'énergie produite est principalement dissipée sous forme de chaleur.

c - Différentes activités de frisson

Le frisson thermique (ST, Shivering Thermogenesis) peut soit apparaître sous forme de bouffées transitoire soit être continu selon l'intensité de la thermogénèse nécessaire. Ces deux profils d'activité de frisson entraîneraient une consommation préférentielle de substrats avec une utilisation accrue des substrats d'origine glucidique lors de bouffées de frisson, alors que les lipides sont préférentiellement oxydés lors du frisson continu (Hohtola, 2004).

L'intensité de l'activité de frisson peut également varier en fonction de la température ambiante (Figure 6).

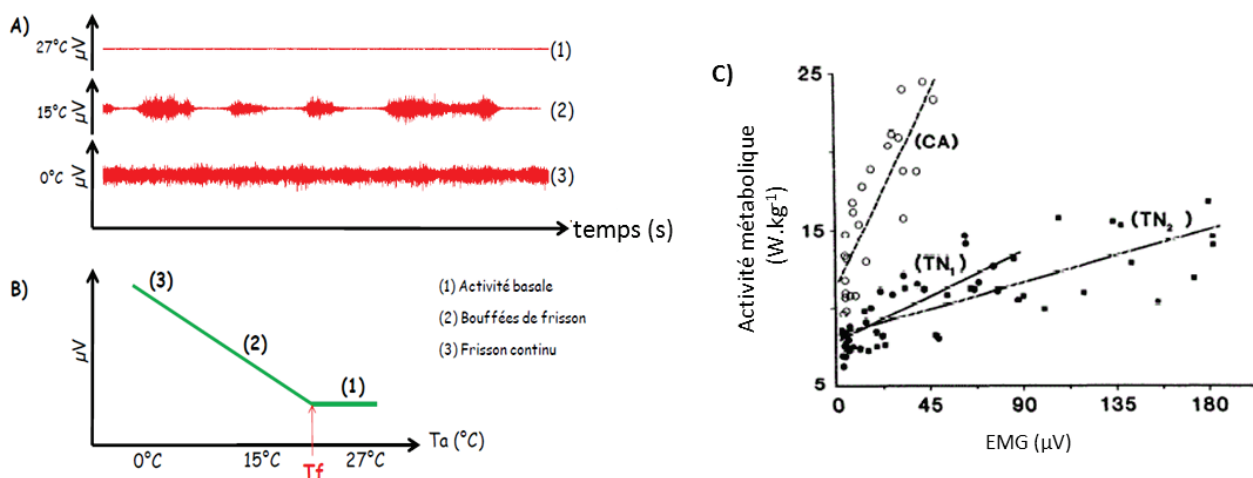


Figure 6: Variations de l'activité du frisson thermique en fonction de la température ambiante. En A), l'activité électromyographique (EMG) brute enregistrée chez un caneton de Barbarie à thermoneutralité (27°C), à 15°C et à 0°C. A thermoneutralité, l'activité électromyographique est basale ; à une température 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). En C), réponse de canetons acclimatés (CA) ou non acclimatés (TN_1 et TN_2 , témoins de même âge ou de même masse) au froid lors d'une exposition aiguë au froid. L'activité métabolique des CA est beaucoup plus élevée pour une valeur similaire d'EMG, traduisant une meilleure efficacité thermogène du frisson, on parle de frisson potentialisé. (Barré *et al.*, 1985; Teulier, 2010).

Contraignant pour l'animal, le frisson thermique constitue une réponse transitoire à un refroidissement ponctuel. Après 2 semaines d'exposition à 4°C, on observe chez le canard, une réduction de l'activité électromyographique de frisson sans réduction de la production de chaleur associée (Figure 6 C), une même intensité de frisson générant une thermogénèse accrue, on parle de frisson potentialisé (Barré *et al.*, 1985).

Si l'exposition au froid se prolonge, le frisson disparaît à la température d'acclimatation alors que la thermogénèse de régulation, persiste, le frisson a été remplacé par une thermogénèse sans frisson (NST ; Non Shivering Thermogenesis).

3 - La thermogénèse sans frisson

a - Définition

Par définition, il s'agit d'une augmentation de la thermogénèse de régulation sans activité de frisson détectée par électromyographie ou accélérométrie. La NST est bien connue chez les mammifères, particulièrement les nouveau-nés, les hibernants et les petits rongeurs acclimatés au froid, où elle a pour site principal le tissu adipeux brun (TAB) dans lequel la grande richesse en mitochondries et la présence d'UCP1 (*uncoupling protein 1*) mitochondriale permettent une thermogénèse activée par le système sympathique (Cannon and Nedergaard, 2004). Les oiseaux, qui ne possèdent pas de TAB (Barré *et al.*, 1986a; Duchamp *et al.*, 1999; Johnston, 1971) ont développé une NST originale qui a pour effecteur principal le muscle squelettique (Duchamp and Barré, 1993; Duchamp *et al.*, 1999).

b - Mécanismes de la NST aviaire

Un premier mécanisme impliquerait un cycle futile du calcium entre les membranes du réticulum sarcoplasmique et le compartiment cytosolique des fibres musculaires (Dumonteil *et al.*, 1995; Dumonteil *et al.*, 1993). L'exposition prolongée au froid stimule en effet l'expression et l'activité de la Ca^{2+} -ATPase et du canal Ca^{2+} sensible à la ryanodine (Dumonteil *et al.*, 1993). La libération accrue de calcium par ce canal, entrainerait un repompage actif de celui-ci par les pompes Ca^{2+} -ATPasiques réticulaires et de ce fait une augmentation de la consommation d'ATP. L'intensification d'un cycle de libération/captage du calcium constitue un mécanisme futile de dissipation d'énergie à des fins thermogènes, l'hydrolyse accrue de l'ATP ainsi que l'activation du métabolisme oxydatif pour régénérer l'ATP étant des processus exothermiques (Figure 7). Parce qu'ils sont consommateurs d'ATP, les mécanismes thermogènes tels que le frisson thermique ou le cycle futile du calcium sont dépendants de la disponibilité en ATP et donc des bonnes capacités phosphorylantes des mitochondries (Roussel *et al.*, 1998).

Un deuxième mécanisme serait basé sur une moins bonne efficacité des conversions énergétiques mitochondriales dans le muscle squelettique grâce à la réduction du couplage des oxydations phosphorylantes comme on peut l'observer chez des canetons acclimatés au froid (Barré *et al.*, 1986b; Duchamp *et al.*, 1992; Roussel *et al.*, 1998). Une réduction du degré de couplage (découplage partiel) des oxydations phosphorylantes, qui peut être liée à

des fuites de protons et/ou de cations à travers la membrane interne mitochondriale, augmente les oxydations de substrats pour maintenir le potentiel de membrane mitochondriale sans augmenter la production d'ATP. L'énergie des oxydations est alors dissipée sous forme de chaleur. Plus le découplage est important, plus l'activation de la chaîne respiratoire est importante pour continuer à répondre aux besoins cellulaires en ATP. Ces fuites peuvent être catalysées par des protéines de la membrane interne des mitochondries comme l'Adénine Nucleotide Translocase (ANT) ou les protéines découplantes (Uncoupling Protein, UCP), qui par leur activité d'échanges de charges à travers la membrane (sous forme de protons, d'anions ou de molécules protonées) affectent le potentiel de membrane et la perméabilité membranaire aux protons (Cannon and Nedergaard, 2004; Roussel *et al.*, 1998; Skulachev, 1991). Les acides gras et les dérivés réactifs de l'oxygène jouent un rôle important dans l'activité découplante de l'UCP aviaire (Rey *et al.*, 2010; Talbot *et al.*, 2004). Il faut toutefois noter que l'activité thermogène des UCP musculaires, comme l'UCP aviaire, est loin d'être aussi performante que celle de l'UCP1 du TAB (Cannon and Nedergaard, 2004).

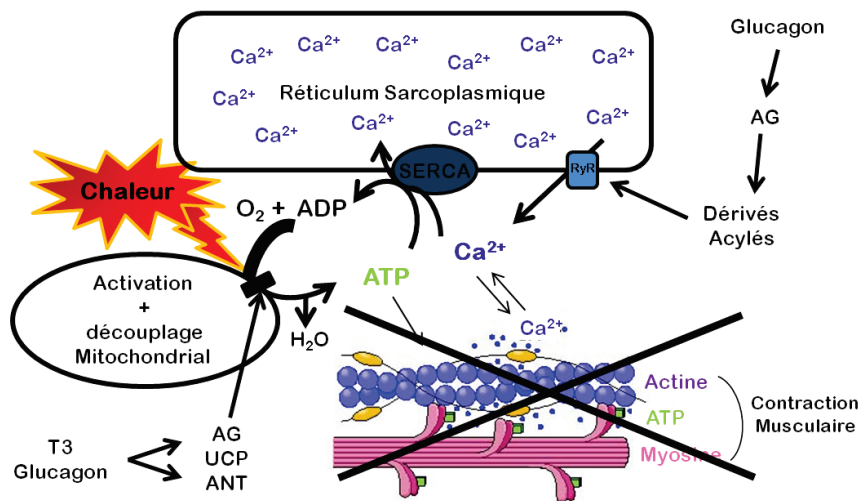


Figure 7 : Mécanismes potentiels de la thermogénèse sans frisson aviaire. L'activation des récepteurs à la ryanodine (RyR) entraîne un relargage du calcium sans activation de la contraction musculaire, le calcium est repompé de manière active par les Ca^{2+} -ATPases (SERCA). La demande en ATP pour la recapture du calcium dans le réticulum sarcoplasmique entraîne une activation du métabolisme mitochondrial, on parle de cycles futiles du calcium. De plus, l'effet endocrine conduisant à une augmentation des acides gras circulants et des protéines UCP et ANT entraîne un découplage partiel des oxydations phosphorylantes augmentant l'activité mitochondriale pour maintenir la production d'ATP. L'énergie produite est principalement dissipée sous forme de chaleur.

c - Contrôle endocrine

Si la NST du TAB des mammifères est contrôlée directement par le système sympathique (Cannon and Nedergaard, 2004), la NST musculaire aviaire fait intervenir un contrôle endocrine plus indirect (Figure 8). Le glucagon semble être fortement impliqué dans la stimulation des processus thermogènes par son fort effet lipolytique et thermogénique chez les oiseaux (Duchamp *et al.*, 1999). Au froid, l'augmentation des concentrations circulantes d'acides gras sous contrôle du glucagon peut stimuler un découplage partiel de la respiration mitochondriale (Barré *et al.*, 1986b; Roussel *et al.*, 1998). Les dérivés métaboliques des acides gras comme les dérivés acylés stimulent également le relargage du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique en activant les récepteurs à la ryanodine (RyR) (Dumonteil *et al.*, 1995). De plus, une NST glucagon-dépendante et un découplage partiel des mitochondries musculaires sont observés chez des canetons maintenus à neutralité thermique mais traités chroniquement au glucagon, traitement qui mime l'hyperglucagonémie observée au froid (Barré *et al.*, 1989; Barré *et al.*, 1987b).

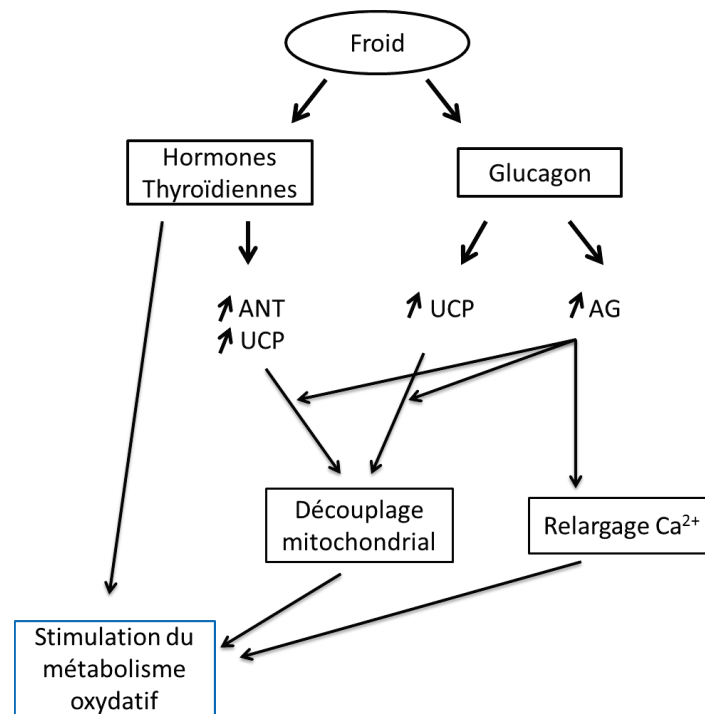


Figure 8 : Contrôle endocrine de la NST aviaire. L'augmentation des concentrations circulantes des hormones thyroïdiennes et du glucagon lors d'une exposition au froid entraîne une stimulation du métabolisme oxydatif *via* une augmentation de l'expression des protéines découplantes (ANT et UCP) et une stimulation du découplage mitochondrial par les AG. Les AG stimulent également le relargage du calcium par le réticulum sarcoplasmique (RS) qui va entraîner une stimulation du métabolisme oxydatif du fait de son repompage actif dans le RS.

Les acides gras mobilisés par l'action lipolytique du glucagon pourraient ainsi stimuler l'activité découplante de protéines mitochondriales comme l'ANT (Roussel *et al.*, 2000), ou l'UCP aviaire (Rey *et al.*, 2010; Talbot *et al.*, 2004). L'expression de ces deux protéines est principalement sous le contrôle des hormones thyroïdiennes et particulièrement de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3) (Collin *et al.*, 2003; Collin *et al.*, 2005) connue pour stimuler le métabolisme oxydatif chez les oiseaux comme chez les mammifères et dont les concentrations circulantes sont accrues au froid (Rey *et al.*, 2010). L'expression de l'UCP aviaire est également accrue par le traitement chronique au glucagon (Raimbault *et al.*, 2001). La surexpression de ces protéines est cohérente avec l'effet découplant accru des acides gras sur les mitochondries musculaires des canetons acclimatés au froid ou traités chroniquement au glucagon (Barré *et al.*, 1986b; Roussel *et al.*, 2000).

III - Ontogenèse de la thermogenèse de régulation

La contrainte thermique est particulièrement importante pour les oiseaux à l'éclosion. Leur faible taille, leur grand rapport surface/volume et leur immaturité métabolique et thermorégulatrice sont préjudiciables à la survie des oisillons au froid. Les oiseaux peuvent être subdivisés en deux grandes catégories : les espèces nidicoles et les espèces nidifuges. Ces deux groupes diffèrent principalement par leur degré de maturité à la naissance qui peut être lié à la durée de la période d'incubation, généralement plus courte chez les oiseaux nidicoles. A l'éclosion, les oisillons peuvent être exposés à des T_a faibles par rapport à leur température interne. Leur capacité à réguler leur température corporelle est donc cruciale pour leur survie et leur développement.

1 - Espèces nidicoles

Lors de l'éclosion, les oisillons nidicoles sont généralement de petite taille, dépourvus de duvet, et leurs yeux sont clos (Figure 9). Ils ne sont pas émancipés thermiquement ce qui signifie qu'ils ne pourraient pas survivre sans le comportement de couvaie de leurs parents (*Parental Care*). Contrairement aux mammifères nouveau-nés pourvus de tissu adipeux brun à la naissance, les oiseaux nidicoles n'ont pas les moyens physiologiques 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 couvaie (Pearson, 1998; Tortosa and Castro, 2003). Cette absence de thermorégulation pourrait en partie s'expliquer par une maturité musculaire insuffisante pour une activité de frisson productrice de chaleur (Olson, 1994). La plupart des oiseaux nidicoles commencent à frissonner à partir de 4 jours après éclosion (Hohtola and Visser, 1998). Grâce aux soins parentaux (isolation thermique

et apport en nourriture), les oisillons nidicoles allouent une part importante de leur budget énergétique à la croissance et non aux mécanismes de thermorégulation ce qui leur permet d'avoir une croissance rapide (Dawson and Evans, 1960; Dunn, 1980; Tortosa and Castro, 2003).



Figure 9 : Les oisillons nidicoles (exemple du Chardonneret élégant) naissent dépourvus de duvet et thermiquement dépendants de leurs parents.

2 - Espèces nidifuges

Contrairement aux oisillons nidicoles, les oisillons nidifuges naissent couverts de duvet et relativement alertes (Figure 10), ce qui leur permet de quitter le nid précocement pour suivre leurs parents, notamment en quête de nourriture. Ils ne sont pas couvés et doivent donc être capables de réguler leur température interne rapidement. Ils semblent avoir la capacité de frissonner dès leur naissance (Hohtola and Visser, 1998). Ils sont généralement plus gros à l'éclosion, ce qui leur confère un rapport surface/volume plus favorable pour éviter les déperditions de chaleur. Ils ont une croissance moins rapide que celle des nidicoles, qui pourrait s'expliquer par la dépense énergétique importante allouée à la thermogenèse de régulation. Nichelmann et Tzschentke (Nichelmann and Tzschentke, 2002) ont décrit l'existence de trois phases dans le développement de l'homéothermie chez ces oiseaux : une période avant éclosion (*Prenatal phase*), une période entre 0 et 10 jours (*Early postnatal phase*) et enfin une période d'homéothermie complète à partir de 10 jours (*Phase of full-blown homeothermy*).

Pendant la période pré-éclosion, les mécanismes de thermorégulation se mettent en place mais leur efficacité reste limitée. Juste après l'éclosion, les oiseaux nidifuges sont capables d'augmenter leur production de chaleur. Les canetons de Barbarie (*Cairina moschata*) et les poussins de poule (*Gallus gallus*) conservent leur température interne constante aux alentours de 40°C en augmentant leur production de chaleur dès le premier

jour si le froid n'est pas trop intense. Chez ces oisillons, la production de chaleur provient principalement de l'activité musculaire de frisson thermique (ST) (Hohtola and Visser, 1998). Dès 10 jours après éclosion, les oiseaux nidifuges régulent leur température interne à un niveau élevé et constant pour une grande plage de T_a . Les mécanismes de thermogenèse mais aussi de thermolyse (vasodilatation périphérique, pertes de chaleur par évaporation) sont alors très efficaces.



Figure 10 : Les oiseaux nidifuges comme le caneton de Barbarie naissent pourvus de duvet et relativement alertes.

3 - Mise en place progressive des mécanismes de thermogenèse

Chez les canetons élevés au froid, la croissance pondérale est ralentie (Barré *et al.*, 1985; Bénistant *et al.*, 1998), ce qui témoigne d'un investissement supérieur d'énergie pour des besoins de thermorégulation. Au cours de l'exposition prolongée au froid, les processus d'acclimatation se mettent en place progressivement (Figure 11).

Dans les premiers jours d'exposition au froid, la thermogenèse de régulation est assurée principalement par le frisson thermique (ST). Après 2 semaines d'exposition à 4°C, ce frisson devient progressivement plus efficace, on parle de frisson potentialisé (PST) (Barré *et al.*, 1985). Si l'exposition au froid se prolonge, le frisson thermique finit par disparaître au bout de quatre à cinq semaines à 4°C alors que la thermogenèse est maintenue. La thermogenèse de frisson a laissé place à un mécanisme de thermogenèse sans frisson (NST).

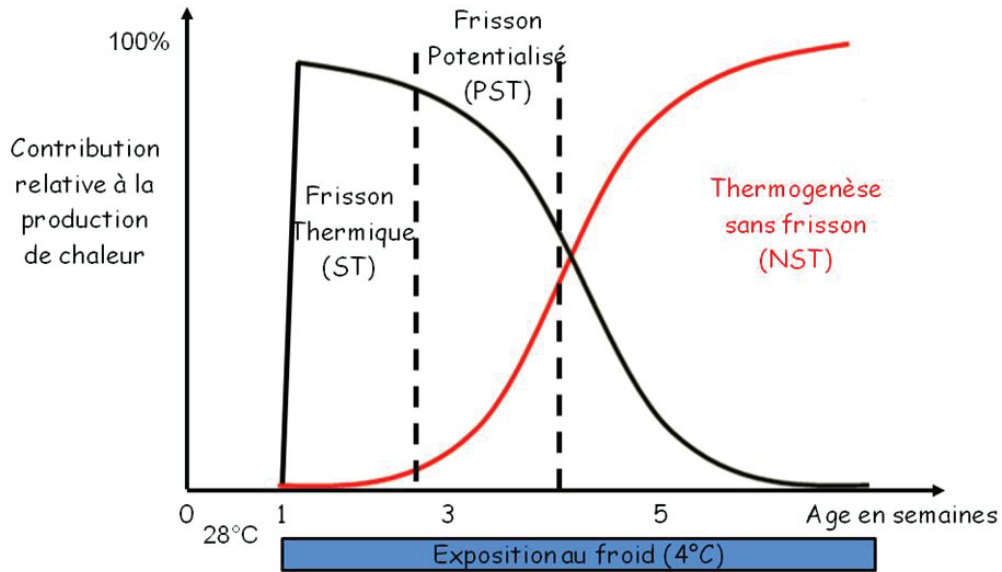


Figure 11 : Représentation schématique de la succession des mécanismes thermogènes impliqués lors d'une exposition au froid (4°C) chez le caneton : le frisson thermique (Shivering Thermogenesis (ST), le frisson potentialisé (PST) puis la thermogénèse sans frisson musculaire (Non Shivering Thermogenesis (NST)). (D'après Barré *et al.*, 1986a; Barré *et al.*, 1985; Duchamp *et al.*, 1999).

Le développement de cette thermogénèse se traduit par une augmentation des capacités oxydatives du muscle squelettique (Barré *et al.*, 1987a; Goglia *et al.*, 1993). Au niveau sub-cellulaire, l'acclimatation au froid induit une augmentation de l'activité respiratoire des mitochondries musculaires (Barré *et al.*, 1986b) ainsi qu'un découplage partiel des oxydations phosphorylantes stimulé par les acides gras (Barré *et al.*, 1986b; Roussel *et al.*, 1998). Parallèlement, on observe une forte augmentation de l'expression de l'UCP aviaire dans le muscle squelettique (Raimbault *et al.*, 2001) ce qui suggère une implication de cette protéine dans la mise en place de la thermogénèse adaptative d'origine musculaire (Rey, 2008).

Chapitre 2

Muscles squelettiques et réseaux mitochondriaux : adaptations à des contraintes énergétiques

I - Le muscle squelettique

Chez l'oiseau, la masse musculaire est principalement représentée par les muscles pectoraux et les muscles de la cuisse et de la jambe (quadriceps et gastrocnémiens). Les principales fonctions du tissu musculaire sont la locomotion et la production de chaleur. Le muscle squelettique est constitué de gros faisceaux de fibres musculaires entourés par un tissu conjonctif appelé épimysium (Figure 12). Chaque faisceau musculaire est délimité par une enveloppe conjonctive très vascularisée (pérимysium) et regroupe un ensemble de fibres musculaires elles-mêmes limitées par une mince gaine de tissu conjonctif nommée endomysium (Hill *et al.*, 1989; Robelin, 1990).

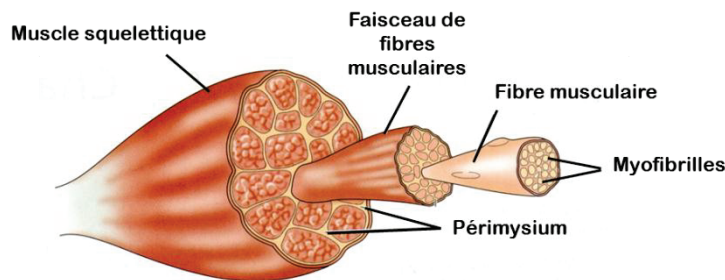


Figure 12 : Organisation du muscle squelettique. (D'après Hill *et al.*, 1989)).

1 - Structure des fibres musculaires

Chez les oiseaux comme chez les mammifères, la fibre musculaire est une cellule plurinucléée, allongée et caractérisée par un appareil contractile constitué de myofibrilles qui s'étendent sur toute la longueur de la cellule. Elles présentent une striation transversale périodique caractéristique qui est à l'origine de la dénomination de muscle strié. Chaque myofibrille est composée de myofilaments épais issus de l'assemblage de protéines contractiles appelées myosines, et de myofilaments fins constitués de protéines telles que l'actine, la tropomyosine et la troponine. Ces filaments sont organisés dans des éléments répétitifs appelés sarcomères limités par les stries Z. Chaque sarcomère présente une

alternance des filaments épais et fins, ces derniers étant attachés aux stries Z (Figure 13B). L'espace laissé libre entre les myofibrilles est occupé par le sarcoplasme, dans lequel on retrouve principalement les noyaux, le réticulum sarcoplasmique et les réseaux organisés de mitochondries en contact étroit avec le réticulum (Figure 13A).

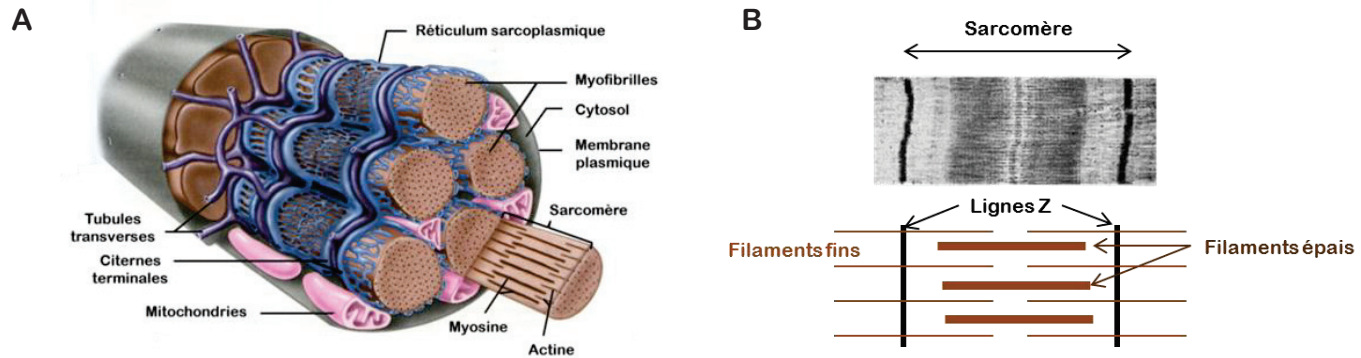


Figure 13 : Schématisations de l'organisation structurale d'une fibre musculaire (A) et d'un sarcomère (B). (D'après Vander *et al.*, 2004).

2 - La contraction musculaire

La contraction musculaire correspond au raccourcissement simultané de tous les sarcomères de la cellule musculaire. Ce phénomène est dû au déplacement des filaments d'actine et est induit par l'activité des myosines ATPases. Les myosines sont les principales protéines constituant les myofibrilles (Bandman, 1999). Elles sont composées de deux chaînes lourdes (environ 200 kDa chacune) et de quatre chaînes légères (environ 20 kDa chacune). Chaque chaîne lourde est porteuse d'une tête globulaire N-terminale enzymatique à activité ATPasique permettant de convertir en mouvement l'énergie libérée par hydrolyse de l'ATP. La contraction musculaire est initiée par la libération des ions calcium stockés dans le réticulum sarcoplasmique. Le relâchement musculaire est obtenu par un pompage actif des ions calcium vers la lumière du réticulum sarcoplasmique par les SERCA.

3 - Propriétés contractiles des fibres musculaires

Chez l'oiseau comme chez le mammifère, le muscle strié squelettique présente une grande variabilité de caractéristiques fonctionnelles, comme sa vitesse de contraction, son métabolisme énergétique et sa résistance à la fatigue (Pette and Staron, 1990; Talesara and Goldspink, 1978). Cette hétérogénéité est issue d'une diversité physiologique, biochimique et morphologique au sein des cellules musculaires.

a - Caractéristiques fonctionnelles

La vitesse de contraction des fibres, corrélée à l'activité ATPasique, dépend directement de la nature des molécules de myosine (Pette and Staron, 1990; Reiser *et al.*, 1996). On distingue des fibres musculaires dites rapides (type II) et lentes (type I) qui se différencient par leur composition en chaîne lourde de myosine (*myosine heavy chain*, MyHC).

b - Caractéristiques métaboliques des fibres

Le métabolisme énergétique des cellules musculaires est également un facteur déterminant de la fonction contractile, notamment pour la résistance à la fatigue (Robelin, 1990). En effet, pour produire l'énergie libre (ATP) nécessaire à l'activité musculaire, les fibres utilisent différents substrats présents dans la cellule musculaire (glycogène, lactate) ou provenant de la circulation sanguine (glucose, acides gras, corps cétoniques). Ces substrats énergétiques peuvent être utilisés par deux voies métaboliques distinctes : la glycolyse (anaérobie) ou les oxydations (aérobie) (Hocquette *et al.*, 2000). En condition anaérobie, la glycolyse est un processus très rapide permettant de faire face à une demande brusque en énergie, lors d'un sprint par exemple. L'inconvénient de cette voie métabolique est le faible rendement énergétique. En effet, une mole de glucose oxydé ne produit que 3 ATP, et l'accumulation d'acide lactique ne permet pas de satisfaire une demande énergétique prolongée. En condition aérobie, l'oxydation du glucose ou des acides gras par la voie du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire produit une plus grande quantité d'énergie (38 moles d'ATP par mole de glucose, 129 moles d'ATP par mole de palmitate), même si ce processus se déroule plus lentement que la glycolyse.

Trois catégories de fibres ont été définies d'après leur métabolisme : oxydatives, oxydo-glycolytiques et glycolytiques. Ce deuxième critère, associé aux propriétés contractiles définies précédemment, permet de caractériser les cellules musculaires de manière plus précise (von Lengerken *et al.*, 2002). Les fibres lentes oxydatives (type I ou slow oxydative, SO) contiennent généralement de nombreuses mitochondries et sont dotées d'une forte capacité de phosphorylation oxydative. Elles sont très vascularisées et contiennent une grande quantité de myoglobine pour fixer l'oxygène ce qui leur donne une couleur rouge foncé et leur nom commun de fibres musculaires rouges. Le groupe des fibres rapides (type II) est constitué de fibres oxydo-Glycolytiques (ou FOG pour Fast Oxydative-Glycolytic) et glycolytiques (FG pour Fast Glycolytic). Ces fibres contiennent moins de

myoglobine, de mitochondries et de capillaires (SO>FOG>FG) et possèdent une coloration intermédiaire, plus claire (fibres intermédiaires ou blanches).

c - Caractéristiques physiologiques

La typologie des fibres au sein d'un muscle strié squelettique peut dépendre de ses fonctions motrices (Rosser and George, 1986). Ceci est particulièrement vrai chez les oiseaux où le muscle pectoral, représentant en moyenne 1/6^{ème} de la masse corporelle, assure la locomotion aérienne (vol battu, vol plané) et/ou aquatique (Kovacs and Meyers, 2000; Ponganis *et al.*, 1997; Rosser *et al.*, 1996). La grande variabilité de composition en fibres dans ce muscle correspond aux diverses propriétés métaboliques et contractiles requises pour les différentes variétés de vol (Torrella *et al.*, 1998). Chez le poulet domestique, les muscles pectoraux ne sont composés que de fibres rapides glycolytiques FG capables d'accomplir à très court terme des séries de contractions rapides et puissantes (Smith *et al.*, 1993). A l'opposé, les muscles pectoraux des oiseaux de petite taille tels que les Passériformes (moineau, fauvette) sont composés de fibres rapides oxydo-glycolytiques FOG, certes moins puissantes et rapides que les FG, mais plus résistantes à la fatigue et capables de soutenir un effort plus prolongé (Rosser *et al.*, 1996). Dans la plupart des cas, le muscle pectoral peut contenir plusieurs types de fibres (Talesara and Goldspink, 1978). Ainsi, chez des oiseaux massifs comme le canard ou le pigeon, une faible proportion de fibres FG, associées aux FOG, permet d'assurer des contractions brèves et puissantes pendant le décollage (Rosser and George, 1986). Quant aux muscles des pattes (comme le gastrocnémien), la présence d'une population de fibres lentes ayant une grande résistance à la fatigue musculaire traduit le rôle de ces muscles dans le maintien de la posture (McFarland and Meyers, 2008).

4 - Ontogenèse et développement du tissu musculaire

Chez la plupart des espèces, le nombre de fibres musculaires ne varie plus après l'éclosion (Fauconneau, 1996; Smith, 1963). Du point de vue morphologique, le développement post-natal du tissu musculaire se traduit par l'élongation et l'augmentation du diamètre des fibres musculaires résultant respectivement de l'addition de sarcomères et de myofibrilles (Williams and Goldspink, 1978). On observe simultanément une augmentation de la densité des protéines contractiles et des mitochondries (Hohtola and Visser, 1998). Chez l'oiseau, dans les 15 premiers jours, la masse du pectoral est multipliée par 10 et le rapport quantité de protéines musculaires sur quantité de protéines plasmatiques est très augmenté (Dickerson, 1960). Ce développement morphologique est également accompagné

d'un phénomène de maturation provenant de l'augmentation de l'activité enzymatique des fibres musculaires (Choi *et al.*, 1993; Rosser *et al.*, 1998) ainsi que de l'expression de différents isoformes de myosine développementales (Bandman and Rosser, 2000). Dès les premiers jours après l'éclosion, on observe chez l'oiseau d'importants changements biochimiques dans les muscles squelettiques, notamment dans le muscle pectoral, avec de fortes augmentations des capacités aérobies et de β -oxydation qui coïncident avec la mise en place des processus thermogènes (Olson, 2001). L'augmentation des capacités métaboliques musculaires suit la cinétique de mise en place de l'activité de la thyroïde, ce qui suggère un rôle des hormones thyroïdiennes dans le développement des capacités aérobies chez l'oiseau (Deaton *et al.*, 1997; Deaton *et al.*, 1998). Il apparaît également que la maturation et les variations d'expression de différents isoformes de myosine au cours de la croissance semblent dépendre du type de muscle et de l'espèce étudiée. En effet, chez le manchot royal, Erbrech *et al.*, ont montré un polymorphisme des MyHC au niveau des muscles de la ceinture pelvienne au cours de la croissance, correspondant à l'acquisition de la locomotion par le poussin. Ces auteurs ont également observé qu'à l'inverse, le muscle pectoral exprime une MyHC mature correspondant aux FOG dès l'éclosion (Erbrech *et al.*, 2011). En parallèle, une étude récente sur le muscle pectoral du manchot Adélie en croissance a montré au cours du premier mois après éclosion une coloration de plus en plus rouge du muscle pectoral caractéristique des muscles possédant un métabolisme oxydatif et une importante concentration en myoglobine (Dégletagne *et al.*, 2013). Des études histochimiques ont confirmé cette observation en montrant un accroissement des capacités oxydatives dans les quinze premiers jours après l'éclosion et une modification du typage de fibres du muscle pectoral avec une disparition des fibres lentes SO présentes à hauteur de 10% dans la première semaine, au profit des fibres FOG qui composent exclusivement le muscle pectoral de manchot Adélie dès 15 jours de croissance (Dégletagne *et al.*, 2013).

5 - Modifications physiologiques du muscle au froid

Comme décrit précédemment, chez l'oiseau, le muscle est le principal effecteur de la thermogénèse. Dans un premier temps la production de chaleur est possible grâce à l'apparition du frisson thermique qui laisse ensuite place à des mécanismes de thermogénèse sans frisson (Duchamp and Barré, 1993; Duchamp *et al.*, 1999). On observe lors de l'acclimatation au froid une augmentation de la vascularisation des muscles squelettiques permettant un approvisionnement optimal en O_2 (Duchamp and Barré, 1993). L'exposition prolongée au froid entraîne chez les mammifères et les oiseaux des modifications fonctionnelles des fibres musculaires, avec une augmentation de la proportion

des fibres oxydatives associée à une diminution de celle des fibres glycolytiques (Dauncey and Ingram, 1988; Duchamp *et al.*, 1992; Jackson *et al.*, 1987). De même, une étude de Ueda *et al.*, en 2005 a montré qu'une exposition au froid durant 10 jours induit chez le poussin de poule (*Gallus gallus*) une modification du typage des fibres du muscle pectoral qui passe d'un métabolisme de type glycolytique vers un métabolisme de type oxydatif caractérisé par une diminution des fibres IIB au profit des fibres IIA (Ueda *et al.*, 2005). Cette modification serait sous le contrôle du facteur de transcription, PGC1 α (Peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator 1 α), déjà connu pour activer la biogenèse mitochondriale et stimuler l'expression de protéines spécifiques des fibres lentes (SO) comme la troponine I ou la myoglobine (Lin *et al.*, 2002).

L'accroissement des capacités oxydatives lors de la thermogenèse sans frisson musculaire pourrait en partie s'expliquer par cette augmentation des fibres oxydatives mais pourrait également traduire une plasticité mitochondriale au froid caractérisée par des modifications fonctionnelles des mitochondries (Barré *et al.*, 1986b; Duchamp *et al.*, 1991; Goglia *et al.*, 1993).

II - Le métabolisme énergétique cellulaire

Toutes les cellules de l'organisme assurent des réactions métaboliques de synthèse et de dégradation, ainsi que de nombreux processus biologiques en produisant leur propre énergie (sous forme d'ATP), principalement à partir des glucides et des lipides apportés par l'alimentation. Dans des situations de carence alimentaire, les acides aminés peuvent également servir de substrats des oxydations soit directement, soit après transformation *via* des processus néoglucogéniques.

- Les glucides sont métabolisés dans le cytosol des cellules *via* la voie de la glycolyse. Il s'agit d'une série de réactions enzymatiques conduisant à la dégradation d'une molécule de glucose pour fournir deux molécules de pyruvate, deux NADH + H⁺ et deux molécules d'ATP.
- Les acides gras sont activés en acyl-coA dans le cytosol. Ces derniers peuvent ensuite entrer dans la mitochondrie et servir de substrats à la β -oxydation. Cette voie métabolique permet la coupure successive du dernier groupement CH₂-CH₃ de la molécule d'acyl-coA. Ainsi, à chaque cycle, un nouvel acyl-coA, un NADH + H⁺ et un FADH₂ sont produits dans la matrice mitochondriale.

Ces dégradations primaires, en conditions anaérobies, permettent la production d'une quantité restreinte d'ATP, la forme d'énergie directement utilisable par les cellules. Cependant, lorsque la cellule est en conditions aérobie, les métabolites que ces voies génèrent (acétyl-coA, pyruvate,...) et les équivalents réduits (NADH + H⁺ et FADH₂) peuvent être utilisés par la mitochondrie pour fournir une quantité d'ATP nettement supérieure. En effet, le pyruvate peut entrer dans la mitochondrie et être transformé en acétyl-coA, molécule qui sert de base aux réactions du cycle de Krebs qui génère à son tour trois molécules de NADH + H⁺, un FADH₂ et un ATP. Les équivalents réduits (NADH + H⁺ et FADH₂) formés par les différentes réactions enzymatiques servent de donneurs d'électrons aux complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale permettant ainsi la formation d'environ 32 molécules d'ATP par molécule de glucose consommée.

III - Les mitochondries

1 - Origine et historique

Les mitochondries ont été observées pour la première fois dans le tissu musculaire en 1857 (Kölliker, 1857). Elles tiennent leur nom du grec *mitos* (filament) et *chondros* (grain) en référence à leur forme. Elles proviendraient de l'endosymbiose d'une α -protéobactérie dans les cellules eucaryotes primitives (Margulis, 1981). Dès 1890, Altmann a montré leur présence dans toutes les cellules grâce à une technique de coloration des mitochondries et suggéra leur autonomie métabolique et génétique (Altmann, 1894). En 1948, Kennedy et Lehninger ont montré que le cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs), la β -oxydation des acides gras et la phosphorylation oxydative (OXPHOS), ont lieu dans la mitochondrie (Kennedy and Lehninger, 1948). En 1978, Peter Mitchell a obtenu le prix Nobel de chimie pour sa théorie chimio-osmotique montrant que le couplage entre la chaîne d'oxydoréduction et le mécanisme de phosphorylation repose sur la formation d'un gradient de protons à travers la membrane interne, servant de potentiel énergétique pour la synthèse d'ATP (Mitchell, 1961).

2 - Structure

Les mitochondries sont des organites retrouvés dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception des érythrocytes des mammifères. Elles mesurent entre 0,5 et 1 μm de diamètre et peuvent atteindre plus de 10 μm de long. Elles sont constituées d'une membrane externe et d'une membrane interne, délimitant deux compartiments, l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale (Figure14).

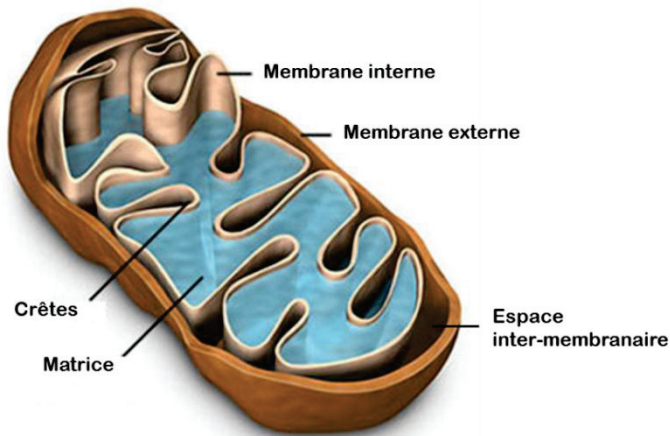


Figure 14 : Représentation schématique d'une mitochondrie et de ses différents compartiments.

La membrane externe constitue une barrière semi-perméable aux ions et aux petites molécules, ce qui fait que l'espace inter-membranaire a une composition proche de celle du cytoplasme, mais avec une forte concentration en protons qui lui confère une charge positive. Cette perméabilité est assurée en grande partie par la présence d'une protéine formant un canal transmembranaire : VDAC (voltage-dependent anion channel). Cette protéine permet le passage des molécules d'une taille inférieure à 10 kDa (anions, cations, acides gras, pyruvate et nucléotides). Les molécules de poids moléculaire supérieur à 10 kDa, possédant un signal d'adressage mitochondrial, sont prises en charge par les complexes d'importation TOM/TIM (translocase of the outer membrane / translocase of the inner membrane) localisés au niveau d'une zone d'accolement entre les membranes externe et interne. La membrane interne a une composition qui diffère des autres membranes biologiques avec environ 80% de protéines pour seulement 20% de phospholipides. De plus, sa composition lipidique est particulière puisqu'elle est riche en cardiolipides (ou diphosphatidylglycérol), ce qui lui confère une propriété beaucoup moins perméable que la membrane externe et constitue donc une barrière sélective entre la matrice et l'environnement cytosolique. Le passage des molécules nécessite donc la présence de transporteurs tels que le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) qui réalise l'échange ATP/ADP entre le cytosol et la matrice mitochondriale, le transporteur du phosphate inorganique, le transporteur du pyruvate, la navette glycérol 3-phosphate et la navette malate/aspartate. La membrane interne s'invagine et forme des crêtes mitochondriales qui permettent d'augmenter la surface membranaire. Elle contient la machinerie enzymatique des oxydations phosphorylantes (OXPHOS) qui assure la synthèse

d'ATP mitochondrial. La matrice mitochondriale contient l'ADN mitochondrial ainsi que les éléments nécessaires à sa réplication et son expression. C'est également le siège de nombreuses voies métaboliques telles que le cycle de Krebs et la β -oxydation des acides gras. La forme et le nombre de mitochondries par cellule dépendent du type cellulaire et des besoins énergétiques. Par exemple, dans le foie les mitochondries représentent 20% du volume cytosolique alors que dans le muscle cardiaque, ce pourcentage atteint 40%. De même, le tissu adipeux blanc qui est un tissu métaboliquement peu actif ne contient que très peu de mitochondries alors que le TAB en possède énormément. Dans la dernière décennie, il a été montré que, loin d'être des organites isolés, les mitochondries forment un réseau dynamique qui subit des phénomènes de fusion et de fission très régulés (Karbowski and Youle, 2003).

3 - Fonctionnement

La mitochondrie est le siège de la respiration cellulaire. La respiration mitochondriale est un processus exergonique aboutissant à la réduction de l'oxygène en eau et à la libération d'énergie libre. Si la plus grande majorité de cette énergie est convertie en ATP, la forme utilisable par la plupart des cellules, une partie est cependant dissipée sous forme de chaleur.

La chaîne respiratoire se compose de quatre complexes protéiques enchâssés dans la membrane interne : le complexe I (ou NADH-ubiquinone oxydoréductase), le complexe II (ou succinate déshydrogénase), le complexe III (ou ubiquinol cytochrome-c réductase) et le complexe IV (ou cytochrome-c oxydase). La fonction de la chaîne respiratoire est d'oxyder des équivalents réduits (NADH et FADH_2) provenant de différentes voies métaboliques (glycolyse, β -oxydation et 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' O_2 réduit en eau au niveau du complexe IV (cytochrome-c oxydase) (Figure 15).

L'imperméabilité relative de la membrane interne aux ions H^+ induit une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire formant ainsi un gradient électrochimique. 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 (Figure 15).

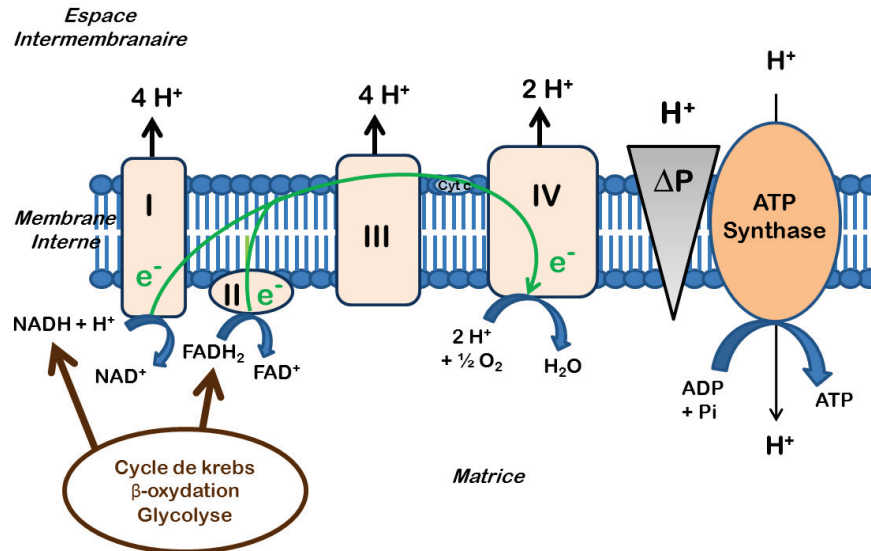


Figure 15: Représentation schématique d'une chaîne respiratoire mitochondriale. Les coenzymes réduits issus des différentes voies métaboliques sont oxydés par les différents complexes grâce à un transfert d'électrons. Ces oxydations sont couplées à la synthèse d'ATP *via* le gradient de protons généré dans l'espace inter-membranaire, on parle d'oxydations phosphorylantes.

L'oxydation phosphorylante mitochondriale fait donc intervenir un ensemble de réactions enzymatiques et constitue un processus qui, pour fonctionner de manière optimale, nécessite des régulations fines à différents niveaux.

4 - 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 si la membrane interne était complètement imperméable aux ions H^+ , la mitochondrie serait alors parfaitement couplée. Le rendement énergétique peut être modulé par une augmentation ou une diminution des fuites protoniques (perméabilité membranaire), signifiant un découplage plus ou moins important des oxydations phosphorylantes. Plusieurs facteurs peuvent moduler cette efficacité mitochondriale.

a - La composition membranaire

Les membranes mitochondriales sont constituées d'une bicouche de phospholipides dans laquelle sont enchâssées des protéines. 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; Rey, 2008). Il a par exemple été montré chez l'oiseau qu'une plus forte proportion d'acides gras polyinsaturés dans les phospholipides membranaires était corrélée à une augmentation de l'intensité des fuites de protons alors qu'une augmentation d'acides gras monoinsaturés était corrélée à une diminution des fuites de protons (Brand *et al.*, 2003; Chaïnier *et al.*, 2000). Des paramètres physiologiques comme l'alimentation ou l'exposition au froid peuvent faire varier cette composition membranaire, le froid entraînant une augmentation de la proportion d'acides gras polyinsaturés (Chaïnier *et al.*, 2000).

b - La nature des substrats utilisés

La nature biochimique des substrats oxydés par la chaîne respiratoire peut également entraîner une modification de l'efficacité mitochondriale.

Les glucides sont métabolisés grâce à la glycolyse alors que les lipides suivent la voie de la β -oxydation dans la matrice mitochondriale (Figure 19). Ces deux voies métaboliques ne produisent pas le même ratio de cofacteurs. En effet, à partir des glucides on obtient principalement du NADH alors que la β -oxydation des lipides donne à la fois du NADH et du FADH_2 (1/1). Les cofacteurs NADH et FADH_2 ne sont pas oxydés dans la chaîne respiratoire au niveau des mêmes complexes. Le NADH entre au niveau du complexe I alors que le FADH_2 entre 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 pour le FADH_2) (Figure 16). Le rapport entre ATP produit et oxygène consommé est alors plus faible lorsque le complexe I n'est pas sollicité. L'efficacité mitochondriale dépend donc du ratio NADH/ FADH_2 présent dans l'environnement de la mitochondrie.

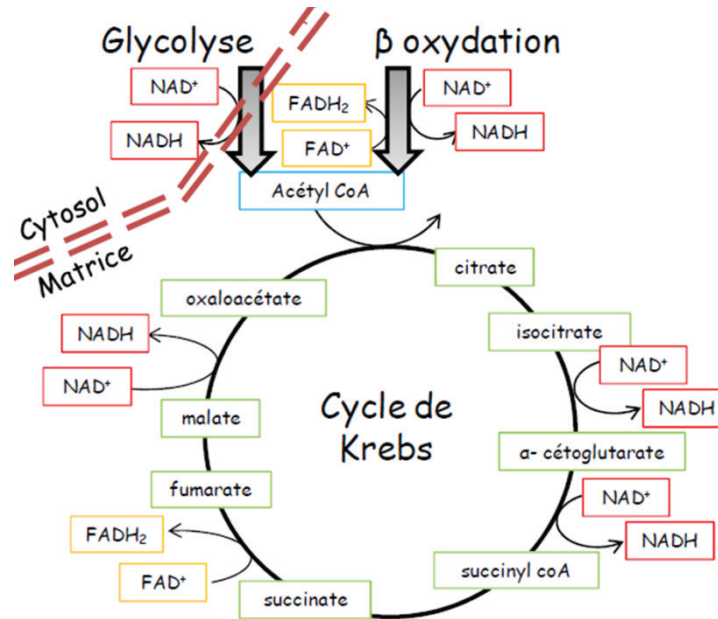


Figure 16 : Représentation simplifiée du cycle de Krebs. Cette figure permet de visualiser les différentes étapes permettant de produire les cofacteurs utilisés par la chaîne respiratoire au niveau de la mitochondrie. La β -oxydation et le cycle de Krebs s'effectuent dans la matrice mitochondriale alors que la glycolyse est un ensemble de réactions enzymatiques cytosoliques.

c - Les 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. Des modifications de leur abondance ou de leur activité entraîneront donc un découplage partiel des oxydations phosphorylantes. C'est notamment le cas du transporteur antiport ANT (Andreyev *et al.*, 1989) qui joue un rôle important dans le contrôle de la respiration mitochondriale (Roussel *et al.*, 1998; Talbot *et al.*, 2004; Toyomizu *et al.*, 2002). Ce transporteur interviendrait donc dans la modulation de la conductivité basale membranaire aux protons (Brand *et al.*, 2005). On retrouve également les protéines découplantes (*Uncoupling Protein* UCP), impliquées dans la modulation de la force proton motrice en favorisant le retour des protons depuis l'espace intermembranaire vers la matrice. 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-phosphates

comme le GDP, le GTP, l'ADP et l'ATP (Echtay, 2007). Contrairement aux nombreux isoformes d'UCP décrits chez les mammifères, les oiseaux ne possèdent à ce jour qu'une isoforme, l'UCP aviaire (Emre *et al.*, 2007) exprimée principalement dans le muscle squelettique (Raimbault *et al.*, 2001). Trois rôles potentiels de cette protéine sont décrits dans la littérature : un rôle antiradicalaire, un rôle dans le métabolisme lipidique et enfin un rôle thermogène (Collin *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 2010; Talbot *et al.*, 2004). A ce jour, les mécanismes d'action des UCPs autres que l'UCP1 du tissu adipeux brun et l'UCP aviaire restent encore hypothétiques.

d - Rôle du calcium

La signalisation calcique apparaît comme un élément fondamental dans le contrôle du métabolisme mitochondrial. Cet ion peut moduler l'activité de différentes enzymes importantes pour le fonctionnement mitochondrial. Il régule notamment certaines enzymes matricielles du cycle de Krebs (McCormack and Denton, 1980), de la β -oxydation des acides gras et du système anti-oxydant (Hopper *et al.*, 2006). Il active également de façon directe l'ATP synthase dans le cœur (Territo *et al.*, 2000), l'ANT dans le foie (Morenosanchez *et al.*, 1995) et le complexe III de la chaîne respiratoire (Murphy *et al.*, 1990).

Lors d'une acclimatation au froid chez le canard, on observe des modifications des concentrations de calcium dans les mitochondries musculaires qui pourraient être liées à la mise en place de la NST *via* des cycles futiles du calcium au niveau du réticulum (Barré and Nedergaard, 1987).

Le calcium intervient également dans les mécanismes apoptotiques. En effet, lors d'un stress oxydant ou d'une agression mitochondriale, le captage de calcium peut induire l'ouverture d'un large pore dans la membrane interne mitochondriale : le pore de transition de perméabilité (PTP) (Duchen, 2000). Le gonflement mitochondrial induit par l'ouverture du PTP suite à une surcharge calcique peut entraîner la « fuite » de molécules telles que le cytochrome-c, l'AIF (apoptosis inducing factor) ou la procaspase-9 et déclencher ainsi l'apoptose.

5 - Différentes populations mitochondriales

Le développement de l'imagerie mitochondriale a permis l'analyse des caractéristiques de ces organites dans des cellules entières et souligne l'hétérogénéité des mitochondries cellulaires dans leur répartition, leur conformation et leurs propriétés fonctionnelles. Cette hétérogénéité est retrouvée dans de multiples types cellulaires dont le muscle squelettique avec une subdivision anatomique et fonctionnelle entre des mitochondries subsarcolemmales (SS) et intermyofibrillaires (IMF). Ces deux populations de mitochondries diffèrent par leur morphologie et leur bioénergétique. En effet, des études ont montré que les mitochondries intermyofibrillaires sont plus allongées car coincées entre les myofibrilles (Figure 20 ; Picard *et al.*, 2013) et ont une capacité oxydative et une production d'ATP plus importantes que les mitochondries subsarcolemmales (Barré *et al.*, 1989; Duchamp *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 1977; Roussel *et al.*, 1998). De plus, ces deux populations ne répondent pas de la même manière aux contraintes énergétiques. Des études ont montré par exemple que l'augmentation des capacités oxydatives musculaires chez l'oiseau exposé au froid (Barré *et al.*, 1986b; Duchamp *et al.*, 1991; Goglia *et al.*, 1993) est principalement liée à l'accroissement des capacités de la population mitochondriale subsarcolemmale dont les capacités apparaissent suffisantes pour contribuer à la NST observée chez ces poussins (Figure 17). De plus des modifications morphologiques sont observées chez les oiseaux acclimatés au froid, qui présentent des mitochondries plus nombreuses et accolées, avec des crêtes mitochondriales plus abondantes (Duchamp *et al.*, 1991).

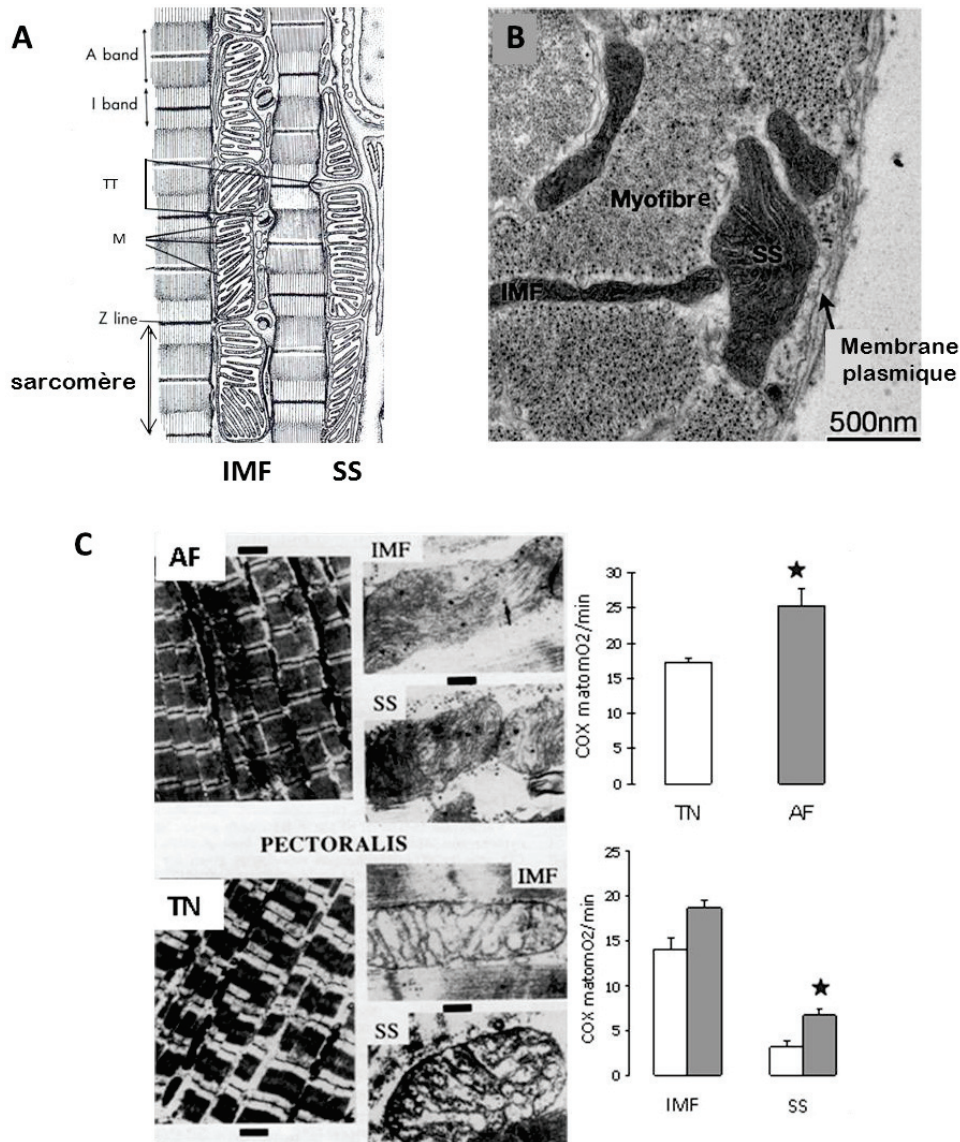


Figure 17: Deux populations mitochondriales se distinguent par leur localisation cellulaire, leur conformation et leurs propriétés fonctionnelles. (A) Les mitochondries intermyofibrillaires (IMF) se situent en profondeur dans la fibre, coincées entre les myofibrilles tandis que les mitochondries subsarcolemmales (SS) se situent tout contre la membrane plasmique (sarcolemme). (B) Hétérogénéité morphologique de ces mitochondries avec des mitochondries IMF fines et étirées en longueur contrairement aux SS qui présentent un diamètre beaucoup plus grand (D'après Picard 2013). (C) Modifications des compartiments mitochondriaux dans le muscle pectoral de poussins de manchot royal naturellement adaptés au froid pendant l'hiver subantarctique (AF) ou acclimatés à thermoneutralité (20°C, TN). Sur la gauche, photographies de microscopie électronique montrant des mitochondries moins nombreuses et plus distantes chez les poussins TN alors qu'elles sont plus nombreuses et accolées au froid et présentent des crêtes mitochondriales plus abondantes. Les barres noires représentent 2 μ m dans les sections musculaires et 0,2 μ m pour les détails des mitochondries. A droite, les capacités oxydatives musculaires totales (activité cytochrome-c oxydase) et représentées par compartiment mitochondrial ; * $P < 0,05$ vs TN. (D'après Duchamp *et al.*, 1991))

6 - Une organisation mitochondriale en réseaux

Le muscle squelettique semble présenter des réseaux mitochondriaux pouvant établir des connections anatomiques plus importantes qu'initialement imaginées. L'observation en microscopie électronique tridimensionnelle montre des tubules mitochondriaux qui chevauchent les myofibrilles ce qui suggère une connexion anatomique entre les deux populations musculaires. La forme des mitochondries et leur organisation en réseaux diffèrent d'ailleurs selon le type métabolique et contractile de muscle squelettique (Figure 18). En effet, plus la fibre est oxydative, plus le réseau mitochondrial est important et composé de grosses mitochondries (Ogata and Yamasaki, 1997). Par rapport aux fibres rapides glycolytiques, les fibres lentes possèdent une quantité similaire de mitochondries IMF mais significativement plus de mitochondries SS (Picard *et al.*, 2011).

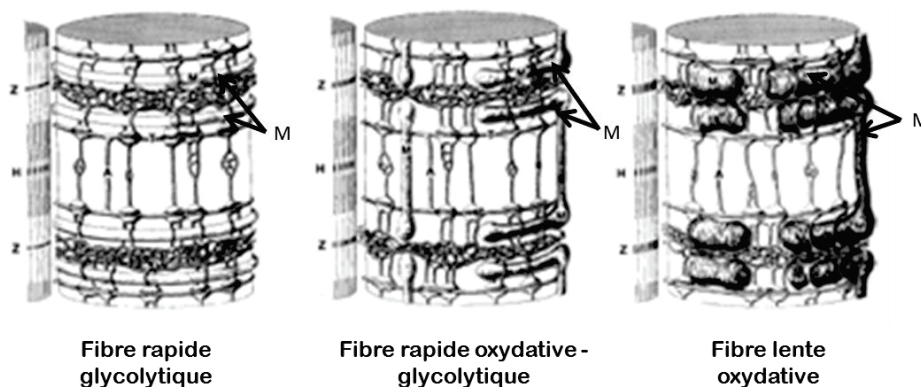


Figure 18 : Hétérogénéité mitochondriale en fonction du type de fibre musculaire. Plus la fibre est oxydative, plus les réseaux mitochondriaux (M) sont denses, connectés et composés de grosses mitochondries. (D'après Ogata and Yamasaki, 1997).

A partir de ces observations, une connexion fonctionnelle a été proposée, illustrant une coopération bioénergétique entre les mitochondries SS plus exposées à des concentrations élevées en substrats et oxygène (de part leur proximité des vaisseaux sanguins) et les mitochondries IMF situées plus profondément à l'intérieur des cellules (Figure 19 ; Skulachev, 2001)). Ainsi, les caractéristiques fonctionnelles des mitochondries SS, avec un moindre couplage des oxydations phosphorylantes, seraient plus adaptées aux conditions propices à la production de dérivés réactifs de l'oxygène. Le potentiel de membrane généré par les oxydations pourrait être transmis au compartiment IMF où les besoins en ATP sont grands pour alimenter les myofibrilles et la contraction musculaire (Kuznetsov and Margreiter, 2009; Skulachev, 2001). Toutefois cette hypothèse n'intègre pas toutes les différences fonctionnelles et biochimiques entre mitochondries SS et IMF.

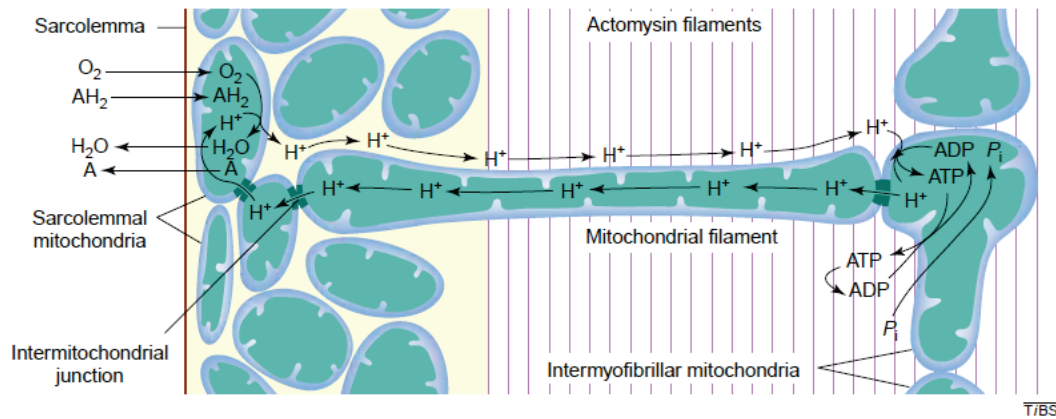


Figure 19 : Schématisation d'un mécanisme hypothétique qui permettrait une transmission du potentiel membranaire (ΔP) entre les mitochondries d'une cellule musculaire. Les mitochondries SS proches des capillaires sanguins consommeraient l' O_2 et les substrats (AH_2). Le gradient de protons généré par l'oxydation des substrats diffuserait le long de filaments mitochondriaux connectant les mitochondries SS et IMF situées en profondeur dans le muscle, pour lesquelles la disponibilité en O_2 et en substrats est réduite. (D'après Skulachev, 2001).

IV - Des réseaux mitochondriaux dynamiques - Description chez les mammifères

La complexité des processus énergétiques est renforcée par l'observation d'une grande plasticité des mitochondries qui ne représentent pas une somme d'organites indépendants mais des réseaux dynamiques (Figure 20 ; Benard *et al.*, 2007; Benard and Karbowski, 2009; Benard and Rossignol, 2008; Zorzano *et al.*, 2009a). La dynamique de ces réseaux peut être rapide et est affectée notamment par les conditions énergétiques cellulaires et l'importance des voies métaboliques anaérobies ou oxydatives utilisées (Kuznetsov and Margreiter, 2009; Rossignol *et al.*, 2004). Cette dynamique est permise par des processus de fusion ou fission des mitochondries grâce à des mécanismes qui commencent seulement à être décryptés et qui impliquent de nombreuses protéines spécifiques de la fusion ou de la fission des mitochondries.

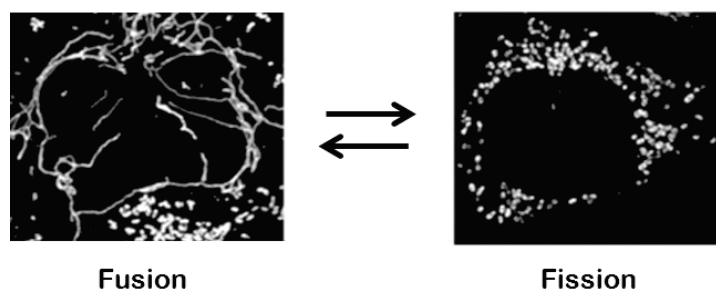


Figure 20 : Des réseaux mitochondriaux dynamiques grâce à des mécanismes de fusion et de fission mitochondriale. (D'après Benard and Karbowski, 2009).

1 - La fusion mitochondriale

Chez les mammifères, la fusion mitochondriale est principalement effectuée par les protéines mitofusine 1, mitofusine 2 (Santel and Fuller, 2001) et OPA1 (OPTic Atrophy 1). Ce sont des analogues des protéines de fusion Fzo pour les mitofusines et mgm1 pour OPA1, que l'on retrouve chez la drosophile ou la levure (Cipolat *et al.*, 2004).

a - Les mitofusines 1 et 2

Les mitofusines 1 et 2 (Mfn1 et Mfn2) font partie de la famille des dynamines GTPases. Ce sont des protéines ubiquitaires localisées à la membrane mitochondriale externes. Elles sont constituées d'un domaine GTPase N-terminal orienté vers le cytosol et de deux motifs répétés hydrophobes HR1 et HR2 (heptad repeat) qui encadrent un double segment transmembranaire nécessaire à la localisation mitochondriale de ces protéines (Figure 21A ; Santel and Fuller, 2001). Les segments HR1 et HR2 forment des structures « coiled-coil » orientées vers le cytosol et HR2 intervient dans l'attachement des mitochondries entre elles (Rojo *et al.*, 2002). Les mitofusines sont ubiquitaires mais leur niveau d'expression varie en fonction des tissus. La Mfn1 est exprimée en quantité équivalente dans tous les tissus alors que la Mfn2 est préférentiellement exprimée dans le cœur et le muscle squelettique (Figure 21B ; Bach *et al.*, 2003).

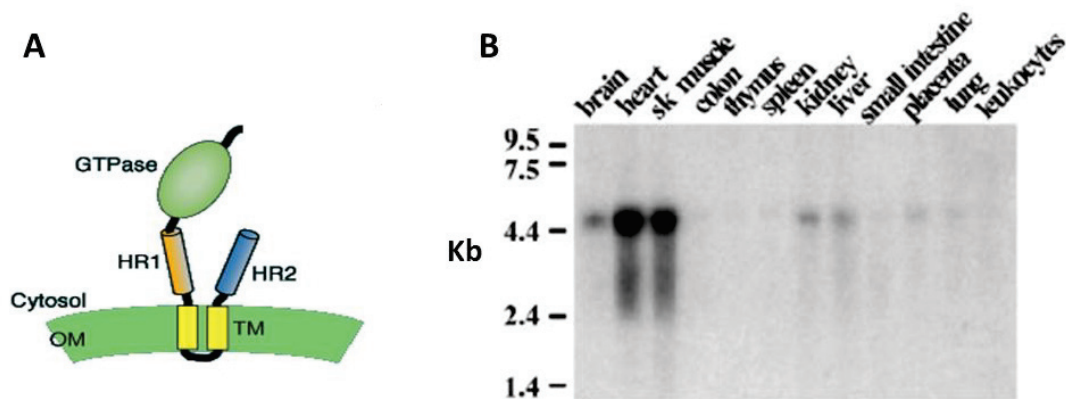


Figure 21 : Structure et répartition de la mitofusine 2 (Mfn2). (A) Elle est composée d'un domaine transmembranaire situé dans la membrane externe des mitochondries, et de deux chaînes (HR1 et HR2) en contact avec le cytosol des cellules. Elles possèdent un domaine GTPase permettant l'hydrolyse du GTP. (B) L'ARNm de la Mfn2 est principalement exprimée dans le cœur (heart) et le muscle squelettique (sk muscle). (D'après Bach *et al.*, 2003; Chen and Chan, 2005)).

On ne connaît pas encore précisément les propriétés respectives de chacune des isoformes. Elles semblent pouvoir se remplacer l'une et l'autre sur le plan fonctionnel puisque la fusion qui est déficiente dans des cellules dépourvues de Mfn1 est restaurée par la surexpression de Mfn2 et inversement (Chen *et al.*, 2003). Ce sont des protéines essentielles au développement et à la survie des mammifères. En effet, des embryons de souris invalides pour un des gènes des mitofusines meurent avant terme (Chen *et al.*, 2003). Cependant, malgré leur forte homologie, elles semblent avoir des rôles bien différents. En effet, la Mfn1 serait impliquée essentiellement dans les mécanismes de fusion avec une activité GTPase huit fois supérieure à celle de la Mfn2 (Ishihara *et al.*, 2004), alors que la Mfn2 interviendrait plutôt dans le métabolisme énergétique cellulaire. De plus, des études ont montré un rôle direct de la Mfn2 dans les contacts entre le réticulum sarcoplasmique (RS) et les mitochondries, facilitant la signalisation calcique. En effet, la Mfn2 est localisée sur la membrane externe des mitochondries, principalement au niveau des contacts étroits entre mitochondries et RS que l'on nomme MAMs (pour « mitochondria associated membranes »). De plus, la protéine Mfn2 est également retrouvée sur la membrane du RS, ce qui permet un accrochage physique entre les mitochondries et le RS (de Brito and Scorrano, 2008; de Brito and Scorrano, 2009).

b - OPA1

La protéine OPA1 est également une dynamine GTPase codée par le gène OPA1. Ce gène contient 31 exons dont 3 exons alternatifs à l'origine de 8 variants de protéines OPA1 par épissage alternatif chez l'homme (Delettre *et al.*, 2001).

OPA1 est localisée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial et serait retrouvée en quantité plus importante au niveau des crêtes mitochondriales (Olichon *et al.*, 2002). C'est une protéine ubiquitaire, qui prédomine tout de même dans la rétine, le cerveau, les testicules, le foie, le cœur, les muscles squelettiques et le pancréas (Delettre *et al.*, 2001). Les analyses de la protéine OPA1 par western blot mettent en évidence cinq bandes de 86 à 110 kDa correspondant à deux isoformes longues ancrées à la membrane interne et 3 isoformes courtes solubles (Ishihara *et al.*, 2006). Le mode d'action d'OPA1 dans le processus de fusion a d'abord été établi par analogie avec ses orthologues chez la levure. La délétion de Mgm1 (orthologue d'OPA1) conduit à une fragmentation mitochondriale, à une perte de l'ADN mitochondrial et à une anomalie de structure des crêtes mitochondriales (Wong *et al.* 2000). Il a également été montré que l'inhibition de l'expression d'OPA1 par siRNA conduit à une fragmentation du réseau mitochondrial par défaut de fusion (Cipolat *et*

al., 2004; Griparic *et al.*, 2004) et à une anomalie de structure des crêtes mitochondriales (Olichon *et al.*, 2003).

En plus de ce rôle dans la fusion mitochondriale, des études ont montré qu'une diminution de l'expression d'OPA1 active l'apoptose et ralentit la croissance cellulaire et la consommation d'oxygène (Zorzano *et al.*, 2010). Une étude récente a également démontré qu'OPA1 participe à l'élimination des dommages mitochondriaux par autophagie (Twig *et al.*, 2008). Comme les mitofusines, OPA1 est une protéine essentielle à la survie des embryons (Alavi *et al.*, 2007; Davies *et al.*, 2007; Zorzano *et al.*, 2010).

c - Mécanisme moléculaire de la fusion

Les protéines Mfn1 et Mfn2 initient l'interaction des mitochondries entre elles. Elles sont localisées à la membrane externe des mitochondries adjacentes. Les domaines hydrophobes HR2 permettent un accrochage entre ces dernières et entraîne leur rapprochement tout en laissant un espace entre elles (Figure 22). La fusion nécessitera un changement conformationnel de manière à créer un contact entre les membranes adjacentes. Les mécanismes ne sont pas connus mais ce changement fait intervenir l'hydrolyse du GTP ou d'autres protéines.

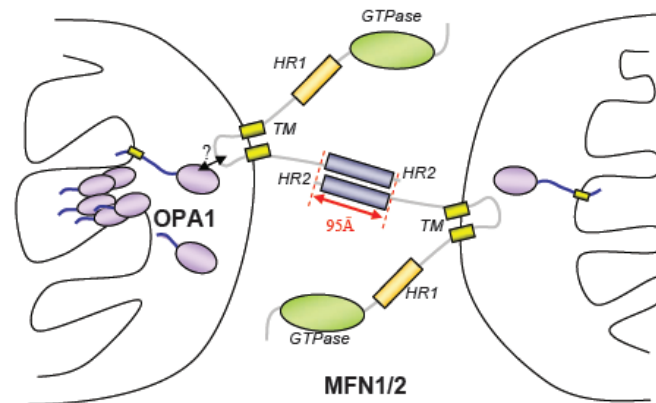


Figure 22: Schématisation du mécanisme moléculaire de la fusion mitochondriale. Les domaines HR2 de 2 mitofusines situées sur 2 mitochondries adjacentes se lient ce qui crée un rapprochement des membranes externes. Le mécanisme précis de la fusion des membranes n'est pas connu mais les GTPases interviennent. Le contact mitofusine/OPA1 semble également avoir une importance dans la fusion des membranes. (Guillet, 2009).

La fusion mitochondriale implique une coordination de la fusion des membranes externes et internes. Bien que les mitofusines soient majoritairement situées du côté cytosolique de la membrane mitochondriale, une courte boucle est localisée dans l'espace intermembranaire, permettant la formation de sites de contacts étroits entre les membranes externe et interne, et jouant un rôle régulateur important pour la fusion mitochondriale (Fritz *et al.*, 2001; Neuspiel *et al.*, 2005). De plus, une interaction physique entre les protéines Mfn1, Mfn2 et OPA1 a été montrée par co-immunoprécipitation (Guillery *et al.*, 2008). Les mécanismes régissant la fusion des membranes internes sont inconnus. Du fait de sa localisation, il est probable qu'OPA1 puisse jouer un rôle essentiel dans la fusion des membranes internes. Cette protéine pourrait également intervenir dans la fusion des membranes externes comme le montre l'inhibition de l'expression d'OPA1 par siRNA qui empêche la fusion des membranes externes (Chen and Chan, 2005). Par homologie avec les protéines de la famille des dynamines GTPases, il a été suggéré que OPA1 puisse être impliquée dans le contrôle de la courbure ou de la tubulation de la membrane interne, ce qui expliquerait pourquoi l'inhibition d'OPA1 affecte également la structure des crêtes mitochondriales (Griparic *et al.*, 2004; Olichon *et al.*, 2003).

Malgré cette coordination, les mécanismes de fusion des membranes externes et internes semblent être distincts. En effet, des tests de fusion réalisés *in vitro* chez la levure montrent que la fusion des membranes externes est possible en présence d'une faible concentration en GTP alors que la fusion des membranes internes nécessite une plus grande quantité de GTP et le maintien du potentiel de membrane mitochondrial (Meeusen *et al.*, 2004).

2 - La fission mitochondriale

a - Les protéines impliquées

Chez les mammifères, les principaux composants connus de la machinerie de fission mitochondriale sont les protéines Drp1 (dynamamin related protein 1) (Smirnova *et al.*, 2001), Fis 1 (James *et al.*, 2003) et GDAP1 (Ganglioside-induced differentiation associated protein 1) (Niemann *et al.*, 2005).

Drp1 fait partie de la famille des dynamines GTPase. Son rôle dans la fission mitochondriale a été mis en évidence grâce à l'inhibition de son expression par siRNA ou par expression d'un mutant dominant négatif montrant une augmentation de la longueur des tubules mitochondriaux et une réticulation du réseau (Lee *et al.*, 2004; Smirnova *et al.*, 2001). Drp1 est localisée dans le cytoplasme mais peut être relocalisée à la membrane

mitochondriale externe au niveau de futurs sites de fission (Smirnova *et al.*, 2001) via un possible recrutement par Fis1 (Yoon *et al.*, 2003). Cette dernière est une petite protéine contenant un domaine transmembranaire C-terminal ancré dans la membrane mitochondriale externe et un domaine N-terminal exposé vers le cytoplasme, comprenant un potentiel site d'interaction avec Drp1. La surexpression de Fis1 induit une fragmentation mitochondriale dépendante de Drp1. En effet, l'expression d'un mutant dominant négatif de Drp1 inhibe la fragmentation médiée par la surexpression de Fis1 (James *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2003).

On retrouve également la protéine GDAP1 (ganglioside-induced differentiation associated protein 1) qui intervient dans la fission mitochondriale. Sa surexpression induit une fragmentation du réseau mitochondrial qui peut être contrebalancée par l'expression d'un mutant dominant négatif Drp1 ou des protéines de fusion Mfn 1 et 2. De plus, le réseau mitochondrial apparaît tubulaire suite à l'inhibition de son expression par si RNA (Niemann *et al.*, 2005). D'autres protéines telles que l'endophiline B1 (Karbowski *et al.*, 2004) qui appartient à une famille d'enzymes de modification des phospholipides membranaires ou la protéine MTP18 (mitochondrial protein 18 kDa) (Tondera *et al.*, 2005) interviennent également dans le processus de fission des mitochondries.

b - Mécanisme de la fission

Drp1 étant une dynamine, il a été proposé qu'elle puisse agir comme une mécanoenzyme utilisant l'hydrolyse du GTP pour permettre la constriction puis la scission membranaire mitochondriale au niveau des sites de fission (Figure 22).

Son mode d'action a été suggéré par analogie avec celui des dynamines classiques qui interviennent dans la constriction et l'invagination du cou des vésicules d'endocytose clathrine-dépendante (Smirnova *et al.*, 1999) :

- La fixation du GTP induit un changement de conformation de la protéine et son oligomérisation en anneau. L'hydrolyse du GTP permet ensuite de fournir l'énergie nécessaire à la constriction du cou des vésicules formées.
- La fixation du GTP induit une oligomérisation des protéines en spirale. Suite à l'hydrolyse du GTP, la spirale adopte une forme plus lâche étirant le cou de la vésicule ainsi libérée.

Il reste toutefois de nombreux points du mécanisme de fission à déterminer, notamment l'implication des autres acteurs de la fission. Il en est de même pour les signaux

cellulaires à l'origine de ce mécanisme. Il a par exemple été montré que la morphologie et la motilité mitochondriales sont également affectées par le calcium. Ainsi, une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium entraîne la translocation de la protéine Drp1 vers la mitochondrie, initiant la fission et ainsi, une fragmentation du réseau mitochondrial (Breckenridge *et al.*, 2003).

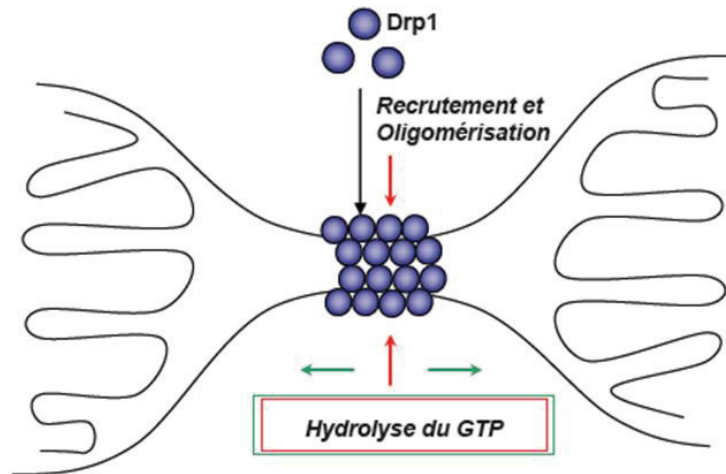


Figure 23 : Schématisation du mécanisme moléculaire de la fission mitochondriale. Drp1 est recruté à la membrane mitochondriale et s'oligomérisé au niveau des sites de fission. L'hydrolyse de GTP permet soit une constriction d'un anneau de protéines Drp1 (Flèches rouges), soit un étirement d'une spirale de protéines Drp1 (Flèches vertes) pour effectuer la fission. (Guillet, 2009).

3 - Relation structure/fonction énergétique mitochondriale

Depuis quelques années, les premiers éléments concernant le rapport entre la structure du réseau mitochondrial et la fonction énergétique mitochondriale ont été mis en évidence. En effet, les mitochondries sont en perpétuel remodelage *via* des cycles de fusion/fission en fonction des besoins énergétiques de la cellule. Des mitochondries fragmentées sont fréquemment retrouvées dans des cellules à l'état quiescent et la fission mitochondriale joue un rôle important dans l'élimination des mitochondries inactives ou endommagées *via* l'autophagie. Les mécanismes de fusion/fission permettent de maintenir des capacités bioénergétiques optimales. De nombreuses voies de signalisation régulent la dynamique mitochondrial afin d'adapter la structure du compartiment mitochondrial aux conditions métaboliques de la cellule (Figure 24 ; Westermann, 2012).

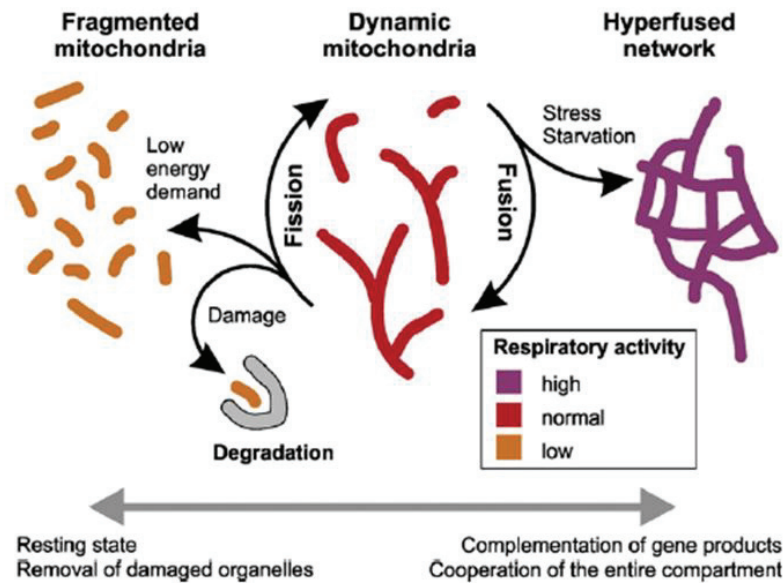


Figure 24: Modèle d'adaptation de la morphologie mitochondriale à l'activité respiratoire. Les mitochondries sont en perpétuels mouvements *via* des cycles de fusion/fission. Quand l'activité respiratoire est faible, les mitochondries sont généralement très peu fusionnées. La fission est nécessaire pour l'élimination des mitochondries endommagées ou inactives par autophagie. Quand l'état bioénergétique devient critique, par exemple lors d'un jeûne alimentaire ou une exposition à certains stress, un important réseau de mitochondries se forme pour optimiser la fonction mitochondrial. (D'après Westermann, 2012).

a - Modifications de l'activité mitochondriale

Les variations du fonctionnement des oxydations phosphorylantes ont des répercussions sur l'architecture mitochondriale. Par exemple, la morphologie du réseau mitochondrial subit des modifications en fonction de la nature et de la disponibilité des substrats énergétiques au sein des cellules. En effet, des cellules HeLa cultivées sur un milieu glucose (80% de glycolyse anaérobie) présentent un réseau plutôt fragmenté alors que lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu galactose où les cellules doivent oxyder la glutamine et stimuler les processus d'oxydation phosphorylante, on observe une condensation des mitochondries, suivie de la mise en place d'interconnexions et de ramifications du réseau mitochondrial (Rossignol *et al.*, 2004). L'inhibition de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase, la modification du potentiel de membrane mitochondrial et la présence de mutations affectant le fonctionnement des OXPHOS influencent également la structure du réseau (Benard *et al.*, 2007; Koopman *et al.*, 2005). La relation structure/fonction mitochondriale a été mise en évidence pour la première fois grâce aux travaux de Hackenbrock montrant que la mitochondrie passe d'une

configuration « orthodoxe » ou relâchée à une forme condensée, suite à l'activation de la production d'ATP par l'ajout d'ADP (Hackenbrock, 1981). Depuis, de nombreux travaux ont permis de clarifier ce lien. Des modifications du potentiel de membrane mitochondrial ont été corrélées à une fragmentation du réseau aussi bien lorsqu'il est diminué (Benard *et al.*, 2007; Ishihara *et al.*, 2003; Legros *et al.*, 2002) qu'augmenté en présence d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase (De Vos *et al.*, 2005). L'inhibition chimique de l'activité des complexes I, II et V est également responsable de la fragmentation du réseau (Benard *et al.*, 2007; De Vos *et al.*, 2005).

b - Modifications de l'expression des protéines de fusion/fission

Un certain nombre de données expérimentales indiquent que les protéines impliquées dans la dynamique des réseaux mitochondriaux affectent le métabolisme mitochondrial selon deux voies distinctes : 1) une perturbation de la dynamique des réseaux mitochondriaux *via* un effet sur la fusion ou fission. Cela induirait des modifications de la production d'énergie, suggérant que la dynamique mitochondrial contrôle de façon directe le métabolisme mitochondrial ; 2) un rôle régulateur spécifique de la Mfn2 dans le métabolisme mitochondrial (Liesa *et al.*, 2009).

- 1) La mitofusine 2 apparaît comme une protéine essentielle dans le maintien et l'organisation des réseaux mitochondriaux dans les différents types cellulaires (Bach *et al.*, 2003). En effet, une activation de l'expression de la Mfn2 est associée à un développement du réseau mitochondrial, et à l'inverse, une inhibition de l'expression de la Mfn2 de 50% dans des myotubes L6E9 entraîne une fragmentation de ce réseau. Cette fragmentation du réseau est associée à une diminution du potentiel de membrane mitochondrial de 60% et à une réduction de l'oxydation du glucose de 30% (Bach *et al.*, 2003). De même, l'inhibition de l'expression du gène *OPA1* dans des cellules HeLa conduit à une fragmentation du réseau mitochondrial et à une dissipation du potentiel de membrane mitochondrial (Olichon *et al.*, 2003). L'inhibition de l'expression de Drp1 dans les cellules HeLa diminue la respiration endogène des cellules et la synthèse d'ATP (Benard *et al.*, 2007). Des études ont montré que la fusion mitochondriale nécessite le maintien du potentiel de membrane mitochondrial (Ishihara *et al.*, 2003; Legros *et al.*, 2002).
- 2) Des études *in vitro* ont mis en évidence un rôle spécifique de la Mfn2 dans l'activation du métabolisme mitochondrial, indépendant de son implication dans le processus de fusion mitochondriale (Pich *et al.*, 2005). En effet, des myotubes transfectés de

manière stable avec une séquence antisens de la Mfn2 montrent une diminution du métabolisme mitochondrial caractérisée par la réduction de l'activité du cycle de Krebs et de la respiration mitochondriale associée à une moindre expression des sous-unités des complexes I, II, III et V (Bach *et al.*, 2003; Pich *et al.*, 2005). En contrepartie, on observe une activation de la glycolyse anaérobie pour continuer à fournir l'énergie nécessaire à la cellule. Réciproquement, une surexpression de la Mfn2 (ou d'un mutant dont la partie responsable de la fusion est tronquée) par des méthodes de transfection sur des myoblastes entraîne une augmentation du métabolisme mitochondrial caractérisée par une plus grande oxydation du pyruvate, une activation du cycle de Krebs et une augmentation du gradient de protons dans les mitochondries. Cette surexpression de la Mfn2 s'accompagne également d'une augmentation des oxydations phosphorylantes associée à une augmentation de l'expression des sous-unités des complexes I, II et V de la chaîne respiratoire (Pich *et al.*, 2005).

Toutes ces données suggèrent un lien étroit entre la structure du réseau mitochondrial et la fonction énergétique mitochondriale (Figure 25).

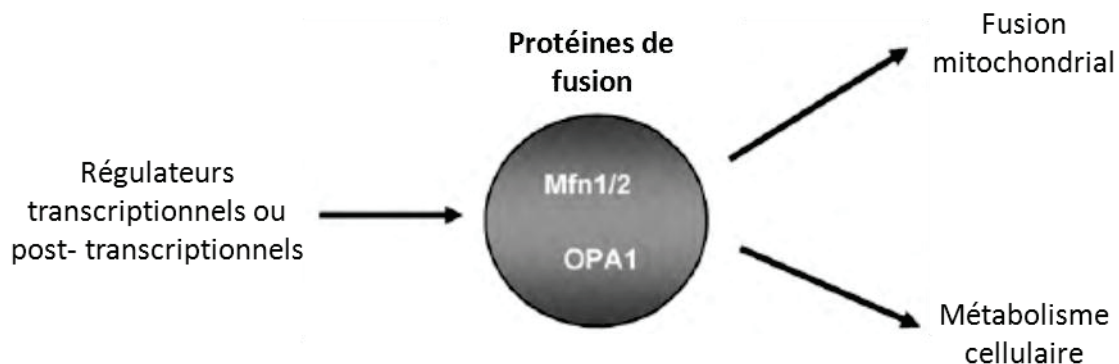


Figure 25: Deux rôles des protéines de fusion : la dynamique mitochondriale et le métabolisme mitochondrial (D'après Zorzano *et al.*, 2010).

4 - Les modifications des réseaux

a - Conditions physiologiques : exercice et froid

Des conditions physiologiques connues pour augmenter l'activité et/ou la biogenèse mitochondriales entraînent une augmentation de l'expression des mitofusines. Par exemple, l'exercice pour le muscle et la restriction calorique pour le cerveau, le cœur, le foie et le tissu adipeux sont connus pour augmenter l'expression de la Mfn1 (Zorzano *et al.*, 2010). De

même, un exercice physique entraîne chez l'Homme une augmentation de l'expression des mitofusines dans le muscle squelettique dès 24h après l'exercice (Cartoni *et al.*, 2005).

L'exposition aiguë au froid (48h) chez les rongeurs augmente l'expression de la Mfn2 dans le tissu adipeux brun, tissu thermogène très actif lors d'une exposition au froid, et dans le muscle squelettique (Soriano *et al.*, 2006). Une étude de Zhang a également mis en évidence l'effet protecteur de la Mfn2 lors une exposition aiguë au froid sur des cellules embryonnaires de rein (HEK293). Après 4h d'exposition au froid, une diminution de l'abondance de la protéine Drp1 et une augmentation de l'abondance de la protéine Mfn2 sont observées en association avec une fusion mitochondriale accrue. Une inhibition de l'expression de la Mfn2 par siRNA dans ces mêmes conditions, entraîne la mort cellulaire, ce qui suggère un rôle essentiel de cette protéine dans la survie cellulaire lors d'un stress froid (Zhang *et al.*, 2010).

Ces études suggèrent qu'une stimulation du métabolisme cellulaire est associée à l'augmentation de l'expression des mitofusines et à une modification de l'organisation des réseaux mitochondriaux *via* des mécanismes de fusion.

b - Conditions pathologiques

L'équilibre entre les processus de fission et de fusion semble critique pour la physiologie neuronale. En effet, des mutations dans certains gènes composant la « machinerie » de fission/fusion sont responsables de maladies neurodégénératives. De récentes études ont permis d'impliquer des défauts de la dynamique mitochondriale dans des maladies telles que la maladie de Parkinson (Deng *et al.*, 2008; Poole *et al.*, 2008). Ces données font de la dynamique mitochondriale un élément clé des recherches sur les mécanismes conduisant à une neurodégénérescence. Les principales neuropathies liées à la dynamique mitochondriale impliquent des mutations des gènes codant pour les protéines GDAP1, Mfn2 et OPA1. Les mutations des gènes *GDAP1* et *Mfn2* sont impliquées dans certaines formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Baxter *et al.*, 2002; Cuesta *et al.*, 2002; Züchner *et al.*, 2004) alors que les mutations du gène *OPA1* sont responsables d'atrophie optique autosomique dominante (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000). Un cas de neuropathie associée à une mutation du gène *Drp1* a également été récemment décrit chez un nouveau-né présentant une microcéphalie, une anomalie du développement cérébral, une atrophie optique avec hypoplasie, une acidose lactique persistante et une concentration plasmatique modérément élevée en acides gras à très longue chaîne. Cette

mutation hétérozygote à effet dominant négatif est associée à un défaut de fission mitochondriale (Waterham *et al.*, 2007).

Dans certaines pathologies métaboliques, les réseaux de mitochondries peuvent également être altérés. Des études chez des rats obèses ont montré une réduction de 25% du réseau mitochondrial dans le muscle squelettique (Bach *et al.*, 2003). La masse totale des mitochondries ne varie pas mais le réseau est déstructuré. Cette altération de la morphologie des mitochondries est associée à une diminution de l'expression de la Mfn2 dans le muscle squelettique de ces rats obèses (Bach *et al.*, 2003). Chez des sujets obèses on observe également une diminution de l'expression de la Mfn2 (Bach *et al.*, 2005; Bach *et al.*, 2003). Des études sur des patients atteints du diabète de type 2 ont également montré une diminution de l'expression de la Mfn2 dans le muscle squelettique par rapport à des sujets sains (Bach *et al.*, 2005) en corrélation avec une diminution du métabolisme énergétique des sujets.

V - Protéines de fusion/fission chez l'oiseau ?

A l'heure actuelle, aucune étude chez l'oiseau ne fait état d'une organisation des réseaux mitochondriaux *via* des mécanismes de fusion/fission. Cependant, de nombreux points communs au niveau de l'organisation structurale et fonctionnelle des muscles squelettiques ainsi que dans l'activité mitochondriale des mammifères et des oiseaux laissent supposer qu'il puisse y avoir des phénomènes semblables permettant la modulation du métabolisme énergétique *via* des mécanismes de fusion/fission.

D'un point de vue nucléotidique, les protéines de fusion et de fission sont maintenant bien caractérisées chez les mammifères, et le séquençage de l'intégralité du génome de poulet (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004) ayant été réalisé, la recherche de la présence de séquences pouvant correspondre à ces différents gènes peut facilement être réalisée. Ainsi, on retrouve dans le génome de poulet des séquences de très forte similitude avec les séquences des protéines de fusion et de fission caractérisées chez les mammifères. Par exemple, les séquences nucléotidiques des mitofusines 1 et 2 ainsi que d'OPA1 caractérisées sur le génome de la souris sont retrouvées chez le poulet avec un pourcentage de similarité d'environ 70%. De même, des séquences nucléotidiques chez le poulet ont une similarité de 80% avec celles des gènes Fis1 et Drp1 de souris (Communication personnelle, Degletagne C). La présence d'une organisation des réseaux mitochondriaux *via* des mécanismes de fusion/fission semble donc tout à fait probable chez l'oiseau.

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse

L'ensemble des études menées sur les mitochondries et leur organisation en réseaux semble ainsi mettre en lumière le rôle important des protéines de fusion et principalement de la mitofusine 2 dans l'énergétique cellulaire, de par leur implication dans la fusion mais également de par leur action directe sur le métabolisme mitochondrial. On peut donc se demander si ces protéines pourraient contribuer aux modifications morfo-fonctionnelles observées lorsque le métabolisme énergétique musculaire est accru par l'exposition au froid à une période charnière de croissance rapide des jeunes organismes.

Comme aucune étude ne s'est encore intéressée à l'organisation en réseau des mitochondries chez l'oiseau, nous avons organisé notre travail en plusieurs étapes, en commençant par des mises au point sur un oiseau déjà beaucoup étudié au laboratoire, le canard de Barbarie, nous donnant la possibilité d'étudier sa croissance soit à thermoneutralité à 25°C soit acclimaté au froid à 4°C, puis en développant des approches sur une espèce sauvage, le manchot Adélie.

Notre travail s'est organisé selon trois axes principaux :

- 1) **Caractériser la présence de protéines de fusion chez l'oiseau.** L'analyse des séquences du génome du poulet nous a permis d'émettre l'hypothèse que les protéines de fusion telles que les Mfns ou OPA1 des mammifères pouvaient être présentes également chez l'oiseau. Dans un premier temps nous envisageons donc de valider cette hypothèse en séquençant une partie des gènes *Mfn1* et *Mfn2* grâce à l'utilisation d'amorces dessinées à partir de la séquence connue de ces gènes chez le poulet. Puis nous regarderons la cinétique d'expression de ces gènes ainsi que l'influence du froid sur cette cinétique afin d'étudier l'impact de la croissance ou d'un stress énergétique sur l'expression des Mfns. Enfin, une mise au point de la technique de western-blot pour détecter les protéines de fusion Mfn2 et OPA1 chez l'oiseau à partir d'anticorps spécifiques de ces protéines chez les mammifères, nous permettrait d'associer des modifications d'abondances de ces protéines à des contraintes énergétiques.

- 2) **Etudier la mise en place des processus bioénergétiques au cours de la croissance au froid chez l'oiseau.** Pour cela nous utiliserons deux modèles animaux : un modèle semi-nidicole naturellement adapté aux contraintes thermiques extrêmes, le manchot Adélie, et un modèle nidifuge, le canard de Barbarie qui nous permettra de différencier les processus bioénergétiques mis en jeu lors de la croissance et ceux résultant de la contrainte froid. Nous utiliserons dans un premier temps la technique de respiration sur fibres isolées perméabilisées afin d'étudier les modifications de la bioénergétique des fibres musculaires tout en conservant une architecture mitochondriale intacte. Dans un second temps, nous essaierons d'établir des corrélations entre cette activité mitochondriale et l'abondance des protéines de fusion. Les résultats ayant trait aux manchots seront présentés sous la forme d'un article scientifique accepté pour publication dans *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* (Août 2013).
- 3) **Déterminer si des modifications de l'activité métabolique ou du statut endocrinien peuvent modifier l'expression des protéines de fusion et impacter l'énergétique musculaire.** Par opposition à l'effet du froid qui active le métabolisme énergétique, nous utiliserons, dans un premier temps, une situation au cours de laquelle la dépense énergétique est très diminuée, le jeûne alimentaire chez le canard. Cette étude nous permettra de déterminer si dans une situation d'hypométabolisme, l'abondance des protéines de fusion peut être modifiée. Dans un second temps, nous essaierons de déterminer l'effet du statut thyroïdien sur l'expression des protéines de fusion. En effet les hormones thyroïdiennes, qui sont impliquées aussi bien au cours d'une exposition au froid que lors d'un jeûne alimentaire, pourraient être directement impliquées dans les modifications d'expression des protéines de fusion.

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

I - Modèles d'étude

1 - Le canard de Barbarie : un modèle de laboratoire

De la famille des Anatidés, le canard de Barbarie (*Cairana moschata*, Linné, 1758) est une espèce domestique, dérivée du Canard Musqué, originaire d'Amérique du sud. Cette espèce a été sélectionnée au fil des générations pour atteindre une masse corporelle de 4 à 5 kg pour les mâles adultes et 2 à 3 kg pour les femelles adultes, ce qui les empêche généralement de voler (Figure 26).

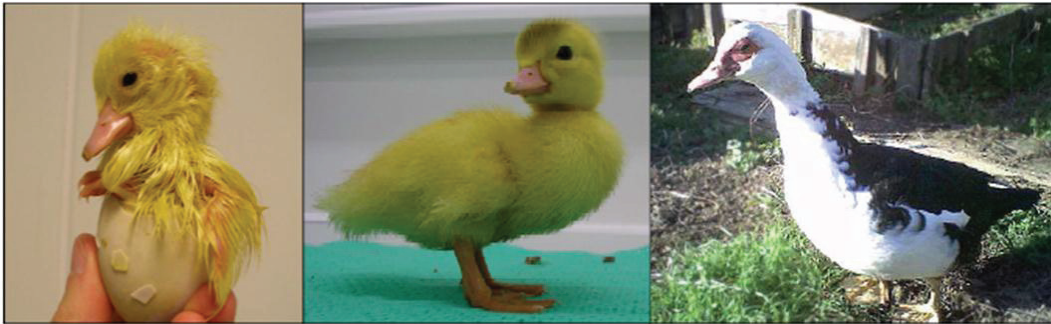


Figure 26 : Le canard de Barbarie (*Cairina moschata*) au stade éclosion, caneton et à l'âge adulte. (Teulier, 2010).

La période d'incubation est relativement longue (environ 35 jours) et les canetons naissent couverts de duvet mais pas encore totalement émancipés thermiquement. Pour maintenir leur température interne constante à 41°C ils ont besoin d'une ambiance thermique chaude (environ 30°C) les premiers jours.

Historiquement, notre laboratoire utilise couramment ce modèle d'étude dans l'identification de la mise en place des mécanismes thermogènes chez l'oiseau lors d'une exposition au froid. Les canetons utilisés sont des mâles (Pedigree R51, INRA, France). Ces animaux d'élevage sont disponibles toute l'année et présentent une faible variabilité interindividuelle, assurant une bonne reproductibilité des expériences y compris au cours du temps.

2 - Le manchot Adélie : un modèle naturel de croissance au froid

Une partie de ma thèse a consisté en l'étude de l'ontogenèse des processus bioénergétique au cours de la croissance chez une espèce naturellement adaptée au froid, le manchot Adélie (*Pigoscelis adeliae*, Hombron & Jacquinot, 1841). Cette étude a été réalisée pendant la campagne d'été 2011-2012 sur la base scientifique Dumont D'Urville, en terre Adélie (Figure 27). Cette base est situé sur l'archipel de pointe Géologie où 34 000 couples de manchots Adélie viennent se reproduire chaque année (Jenouvrier *et al.*, 2006).



Figure 27 : Base scientifique Dumont D'Urville en terre Adélie

- Généralités

Le manchot Adélie adulte mesure environ 75 cm pour une masse allant de 3,8 à 8,2 kg en fonction de son statut nutritionnel et de l'état de ses réserves. Il se nourrit principalement de crustacés ainsi que de quelques poissons ou céphalopodes au cours de ses périodes de plongée. Ils descendent généralement entre 20 et 30 mètres de profondeur pour trouver leur nourriture mais le record de plongée a été enregistré à 175 m (Shirihai *et al.*, 2009). Le manchot Adélie est un oiseau marin qui passe environ 90% de sa vie dans les eaux de l'océan antarctique dont la température ne dépasse pas 0°C. Ils vivent en mer, par groupes de 5 à 10 individus, sauf à proximité des colonies pendant la période de reproduction. Entre l'automne et le printemps, ils passent la plus grande partie de leur temps à se reposer sur des grandes plaques de glaces, nommées floes, provenant de la formation ou de l'éclatement de la banquise, et ne passent que quelques heures à la recherche de nourriture (Figure 28). Au printemps, ils augmentent leur prise alimentaire afin de faire une provision de graisse pour la migration et la reproduction. Pendant la période de reproduction, ils rentrent au nid avec jusqu'à 1kg de nourriture pour leurs poussins. De même, à l'automne, ils se nourrissent plus que d'ordinaire avant leur mue annuelle (Darmangeat, 2005).



Figure 28 : Le manchot Adélie passe 90% de sa vie d'adulte dans l'eau ou à se reposer sur des morceaux de banquise.

- *La période de reproduction*

Dans les zones antarctiques, la période de reproduction est courte, elle correspond aux 4 mois de l'été antarctique durant lesquels les températures avoisinent les 0°C et les précipitations sont moins fréquentes. Avant le retour de la banquise, les poussins doivent avoir atteint leur taille et leur plumage d'adulte afin de pouvoir partir en mer (Figure 29). La période de reproduction commence à la mi-octobre, et la pondaison commence début novembre. Une couvée comporte généralement deux œufs mais le taux moyen de poussins à atteindre le stade du passage en mer est de 0,9 par paire.

Après environ 35 jours d'incubation, les poussins naissent recouverts de duvet avec une masse d'environ 85g. Ils seraient incapables de survivre sans la protection thermique de leurs parents pendant les 15 premiers jours, c'est pourquoi on parle d'espèce semi-nidifuge. Les 2 parents se relayent pour aller chercher la nourriture pendant les 2 à 3 premières semaines. A 15 jours les poussins commencent à sortir de plus en plus de la poche incubatrice de leurs parents et par conséquent à s'émanciper thermiquement, ce qui représente pour eux une forte contrainte énergétique. Après 3 semaines, les besoins en nourriture des poussins deviennent trop importants et les deux parents doivent s'en charger en même temps. Les poussins se regroupent alors en crèches près de leur colonie afin de se tenir chaud en attendant le retour de leurs parents.

Après 6 semaines, ils atteignent leur masse adulte et commencent à remplacer leur duvet par des plumes. Ils deviennent indépendants de leurs parents vers l'âge de 50 jours et sont prêts à partir en mer où ils subiront une contrainte thermique importante due à la température très basse de l'eau associée à une contrainte physique puisqu'ils devront nager sur des kilomètres pour se nourrir.

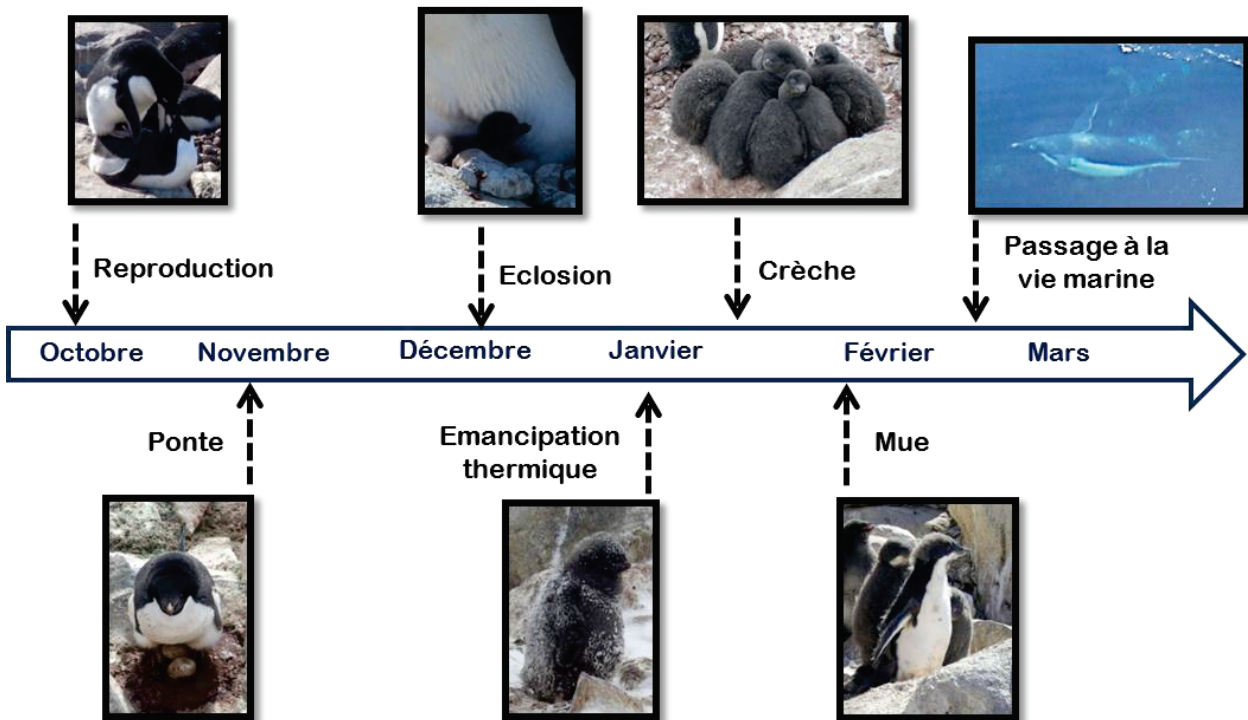


Figure 29 : Période de reproduction et croissance du poussin manchot Adélie durant le court été antarctique. Les 15 premiers jours après éclosion, le poussin vit sous la protection thermique de ses parents puis de 15 à 30 jours il s’émancipe thermiquement petit à petit. A partir de 30 jours les poussins se regroupent en crèches en attendant d’être nourris par leurs parents. Après 50 jours, ils sont totalement indépendants de leurs parents et sont prêts à passer en mer. (D’après Bucher *et al.*, 1990).

II - Protocole expérimental *in vivo*

1 - Les canetons de Barbarie

a - Provenance et stabulation

Les canetons issus de l’établissement spécialisé Eclosion (groupe Grimaud la Corbière, 49450 ROUSSAY) sont livrés à 1 jour avec une masse moyenne de 45 g et élevés à l’animalerie où la température ambiante est contrôlée (Figure 30). Durant les 3 premiers jours, la température des enceintes était de 30°C puis diminuée progressivement jusqu’à 25°C, température dite de neutralité thermique, au terme de la première semaine. Après 7 jours, la masse des canetons était supérieure à 100 g et ils étaient donc capables de mettre en place une thermogénèse de régulation leur permettant de résister à des basses températures (4°C).

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



Figure 30 : Enceintes de stabulation des canetons. La température est régulée et contrôlée en permanence, l'eau de boisson et la nourriture sont fournies *ad libitum*.

Les canetons ont été élevés avec une photopériode 8h jour/16h nuit pour reconstituer artificiellement la période hivernale. En fonction des expérimentations, les canetons ont été soumis à différentes contraintes énergétiques, acclimatation au froid, jeûne alimentaire ou modifications du statut endocrine, dont les paramètres seront détaillés précisément dans les différentes études.

b - Suivi de la croissance et mesure de la dépense énergétique

Les canetons ont été pesés quotidiennement afin de suivre leur croissance.

La dépense énergétique des animaux a été mesurée par calorimétrie indirecte en circuit ouvert à thermoneutralité (25°C) et à partir de différents paramètres acquis en continu (Pression barométrique, taux d'humidité dans l'air, poids du caneton, $F_{E}O_2$, $F_{E}CO_2$). L'enceinte métabolique était ventilée avec un débit d'air constant (pompe principale) déterminé par un débitmètre massique Platon. L'air sortant de l'enceinte était desséché dans un piège à glace. Une fraction de cet air était prélevé et sa composition en gaz déterminée par un analyseur d'oxygène paramagnétique Servomex et un analyseur de CO_2 infrarouge (Figure 31).

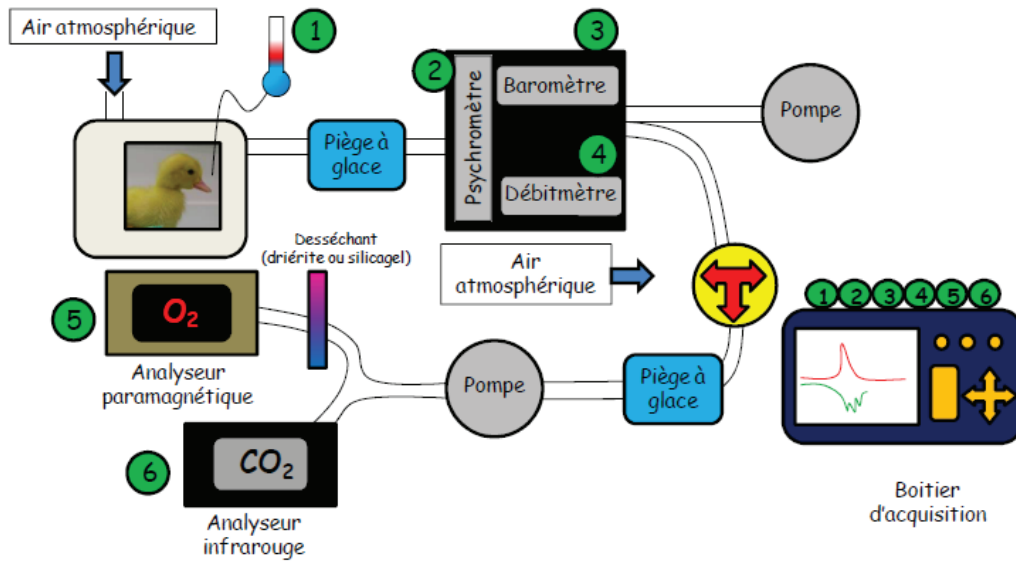


Figure 31 : Illustration des différents éléments composant la chaîne métabolique. 1) capteur de température ambiante, 2) psychromètre mesurant l'humidité relative de l'air, 3) capteur de pression atmosphérique, 4) débitmètre massique mesurant le débit d'air dans le circuit, 5) analyseur d'oxygène, 6) analyseur de dioxyde de carbone. Les données sont enregistrées par un boîtier d'acquisition à une fréquence de 0,05 Hz. (Teulier 2010).

La dépense énergétique des animaux (en W/kg) en condition STPD (*Standard Temperature and Pressure, Dry* : 0°C, 760 mmHg, air sec) a ensuite été calculée à partir de la consommation d'oxygène et du coefficient calorique de l'oxygène, déterminé d'après le coefficient respiratoire (Barré, 1984). Une représentation schématique des échanges respiratoires est présentée sur la figure 32, lorsqu'un organisme consomme de l'oxygène et produit du CO₂ dans l'enceinte métabolique.

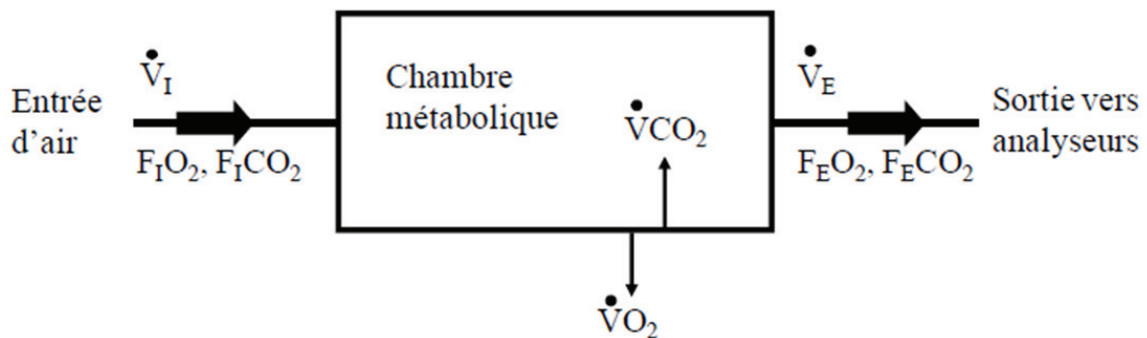


Figure 32 : Représentation schématique des échanges respiratoires dans une chambre métabolique (D'après Barré H, 1984).

V_I : Débit d'air entrant dans la chambre métabolique en L/h

$F_I O_2$: 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)

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 :

$$VO_2 = [V_E F_I O_2 \times (1 - F_E CO_2) - V_E F_E O_2 \times (1 - F_I CO_2)] / (1 - F_I O_2 - F_I CO_2)$$

$$VCO_2 = [V_E (F_I O_2 - F_E O_2) - VO_2 (1 - F_I O_2)] / F_I O_2$$

$$QR = VCO_2 / VO_2$$

Métabolisme = $VO_2 \times [4,687 + (((QR - 0,707) / 0,293) \times 0,361)]$ en kcal/h si VO_2 en L/h

Avec 4,687 kcal/h = coefficient calorifique des lipides, 0,707 = QR des lipides, 0,293 = $QR_{glucides} - QR_{lipides}$, 0,361 = coefficient calorifique des lipides - coefficient calorifique des glucides

Pour convertir ce résultat en Watts, il suffit de le multiplier par 1,162 (1cal = 4,184 J et 1 W = 1 J/s, donc kcal/h = 1000 cal/3600s = 41,84/36 = 1,162)

c - Prélèvements des tissus

Les canetons ont été mis à mort par décapitation à différents âges et temps d'acclimatation au froid. Différents tissus et notamment les muscles : pectoral, gastrocnémien interne et quadriceps ont été prélevés et pesés. Une partie a immédiatement été conservée dans le tampon d'isolement utilisé pour la respiration des fibres perméabilisées à 4°C. Le reste a été immédiatement congelé à -80°C en vue des études moléculaires.

2 - Les Manchots Adélie

L'étude des manchots Adélie a été réalisée sur la base scientifique Dumont D'Urville en Terre Adélie au cours de la campagne d'été 2011-2012, entre décembre 2011 et Février 2012 (Programme 131 soutenu par l'IPEV).

Pour étudier la mise en place des processus bioénergétiques au cours de la croissance, nous avons utilisé des poussins âgés de 1, 7, 15 et 30 jours. Ces âges

correspondent aux différentes phases d'émancipation thermique avec de 1 à 7 jours une protection totale des parents puis à 15 jours des sorties du nid de plus en plus fréquentes mais la présence permanente d'un des deux parents sur le nid, et enfin à 30 jours, l'émancipation thermique totale et la formation de crèches (cf. Figure 29). Nous avons comparé ces différents âges au stade adulte qui représente l'adaptation à toutes les contraintes énergétiques : la contrainte thermique de l'air puis de l'eau, ainsi que la contrainte physique imposée par les longs voyages en mer en quête de nourriture.

Des biopsies du muscle pectoral ont été réalisées par un vétérinaire. La chirurgie se passait dans un espace aseptisé et à l'aide de matériel chirurgical stérilisé (Figure 33). L'anesthésie était induite par inhalation d'isoflurane (Aerrane©, Baxter Laboratories, UK). Un suivi de l'anesthésie (constantes cardiaque et ventilatoire) par une personne formée par le vétérinaire a été réalisé pour chaque prélèvement.

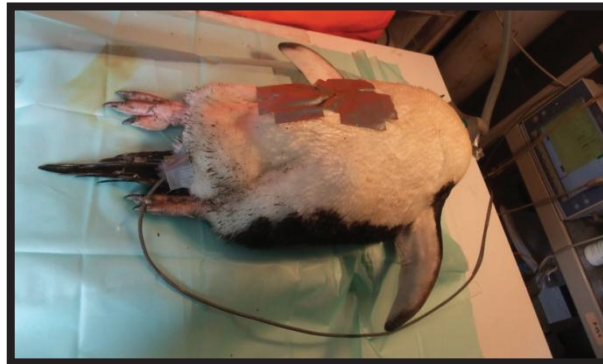


Figure 33 : Biopsie du muscle pectoral. Le manchot est placé dans un espace aseptisé et anesthésié par inhalation d'isoflurane.

Comme pour les expérimentations sur le canard de Barbarie, une partie de la biopsie a été immédiatement conservée dans des tampons d'isolement à 4°C et le reste a été immédiatement congelé à -80°C en vue des études moléculaires.

III - Etudes biochimiques

1 - Préparation des fibres musculaires perméabilisées

La technique de l'étude de la bioénergétique des fibres musculaires a été adaptée de la méthode décrite par Kuznetsov *et al.* et Picard *et al.* (Kuznetsov *et al.*, 2008; Picard *et al.*, 2008).

Un des principaux avantages de cette technique est qu'elle n'utilise que très peu de tissu. En effet, une petite biopsie de 50 mg suffit pour faire une dizaine de mesures. De plus, cette technique permet de travailler sur une fibre « intacte » qui contient encore toute sa structure interne avec à la fois des réseaux mitochondriaux organisés et une interaction étroite entre mitochondries et réticulum sarcoplasmique.

La biopsie musculaire avait été conservée immédiatement après prélèvement dans le tampon d'isolement (K_2EGTA 7,23 mM, CaK_2EGTA 2,77 mM, Imidazole 20 mM, DTT 0,5 mM, Taurine 20 mM, ATP 5,7 mM, Phosphocréatine 15 mM, $MgCl_2$ 6,5 mM et K-MES 60 mM, pH 7,2) puis les fibres musculaires ont été séparées mécaniquement à l'aide de pinces fines. Les paquets de fibres dissociées ont été transférées dans du tampon d'isolement contenant de la saponine (50 $\mu g/mL$) sous agitation légère, à 4°C pendant 30 minutes. Les fibres perméabilisées ont ensuite été rincées 3 fois 10 minutes à 4°C dans un tampon de lavage correspondant au tampon d'isolement sans ATP ni Phosphocréatine mais avec du KH_2PO_4 10 mM et 5 mg/mL de BSA-FFA (Bovine Serum Albumin - Free Fatty Acid). Les paquets de fibres musculaires ont été pesés et la consommation d'oxygène d'environ 5 mg de fibres a été enregistrée avec un oxymètre de haute résolution, Oroboros® (Figure 34) dans du tampon de respiration (K-MES 100 mM, KCL 30 mM, KH_2PO_4 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 1 mM, BSA-FFA 5 mg/mL) en utilisant différents substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire.

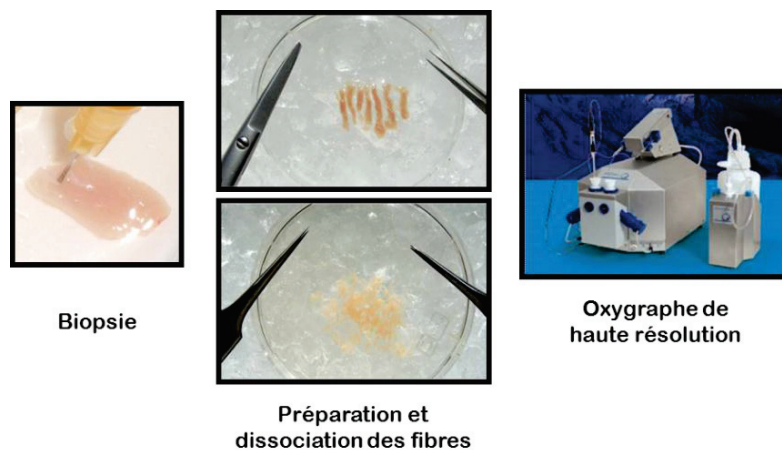


Figure 34 : Protocole de dissociation des fibres musculaires. A partir d'une biopsie de muscle pectoral, des paquets de fibres sont séparés aux ciseaux puis les fibres sont dissociées les unes des autres à l'aide de pinces fines. L'enregistrement de la respiration se fait dans un oxygraphe de haute résolution, Oroboros®. (D'après Kuznetsov et al, 2008)

2 - Isolement des mitochondries

L'isolement des mitochondries a eu lieu en parallèle de la perméabilisation des fibres sur un fragment de muscle placé dès son prélèvement dans du milieu d'isolement (sucrose 100 mM, KCL 50 mM, EDTA 5 mM, Tris-Base 50 mM, pH 7,4), à raison de 10 mL/g de tissu. Le tissu a ensuite été broyé par 5 passages au potter (600 rpm). L'homogénat obtenu a été centrifugé à 800g pendant 10 minutes. Le culot (contenant les mitochondries intermyofibrillaires) a été re-suspendu dans 15 mL de milieu d'isolement puis incubé avec de la protéase (1 mg/g) pendant 5 minutes dans la glace. L'action de la protéase a été stoppée par dilution avec le surnageant (contenant les mitochondries subsarcolemales) puis 3 passages au potter ont été effectués. L'homogénat a été centrifugé à 1000g pendant 10 minutes.

Le surnageant, contenant les mitochondries, a été filtré puis centrifugé à 8700g pendant 10 minutes. Le culot, contenant les mitochondries, a ensuite été lavé par 2 centrifugations à 8700g pendant 10 minutes dans 10 mL de milieu d'isolement.

L'ensemble de l'isolement a été fait à 4°C. La concentration de protéines mitochondriales a été dosée par la méthode de Biuret avec de l'albumine sérique de bœuf 10% comme standard.

3 - Respiration mitochondriale

Que ce soit pour les mitochondries isolées (0,3 mg/mL) ou pour les fibres perméabilisées, la respiration mitochondriale a été mesurée dans une cuve thermostatée contenant le même tampon de respiration (K-MES 100 mM, KCL 30 mM, KH_2PO_4 10 mM, MgCl_2 5 mM, EGTA 1 mM, BSA-FFA 5 mg/mL). Les enregistrements ont été réalisés à 38°C pour les échantillons de manchots et à 41°C pour les échantillons de canard afin de respecter leur température interne physiologique.

La respiration a été initiée par l'addition de pyruvate/malate (PM : 5 mM/2,5 mM). Le pyruvate est un substrat glucidique dont la métabolisation dans le cycle de Krebs donne majoritairement l'équivalent réduit NADH qui est oxydé au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire. Le malate permet d'alimenter en continu le cycle de Krebs pour que la respiration ne soit pas limitée par la production d'équivalents réduits. Ensuite, l'ajout de succinate (S : 5mM) qui est directement oxydé par le complexe II (succinate déshydrogénase) nous a permis d'avoir une activation complète (I + II) de la chaîne respiratoire (Figure 35). En parallèle un deuxième protocole a consisté à remplacer les

substrats glucidiques par un substrat lipidique (Palmitoyl-carnitine (PC : 40 μ M)) toujours en présence de malate 2,5 mM.

L'état phosphorylant (Etat 3) est obtenu par ajout de 1 mM d'ADP (500 μ M pour les mitochondries isolées). L'ADP est le substrat de l'ATP synthase qui entraîne la formation d'ATP à partir d'ADP. Après cette étape, l'intégrité des membranes mitochondriales au sein des fibres perméabilisées a systématiquement été vérifiée par l'absence de stimulation de la respiration après addition de cytochrome-c (10 μ M). En effet, en cas de perméabilisation trop importante des fibres, la membrane externe des mitochondries pourrait être touchée et le cytochrome-c qui se trouve normalement dans l'espace inter-membranaire, se retrouverait à l'extérieur. Ainsi, il ne permettrait plus le passage d'électron au complexe IV, la respiration serait donc sous-estimée.

L'état respiratoire non-phosphorylant (Etat4) a été obtenu par ajout d'oligomycine (1,25 μ g/mL pour les fibres et 2,5 μ g/mL pour les mitochondries), un puissant inhibiteur de l'ATP synthase.

Le rapport entre l'état 3 phosphorylant, induit par l'ajout d'ADP dans le milieu de respiration et l'état 4 non phosphorylant, obtenu en inhibant l'ATP synthase par ajout d'oligomycine est appelé RCR (Rapport de Contrôle Respiratoire). Il renseigne sur le niveau de couplage mitochondrial. Par convention, si le RCR est inférieur à 2 alors les mitochondries musculaires sont considérées comme découplées (Roussel *et al.*, 1998).

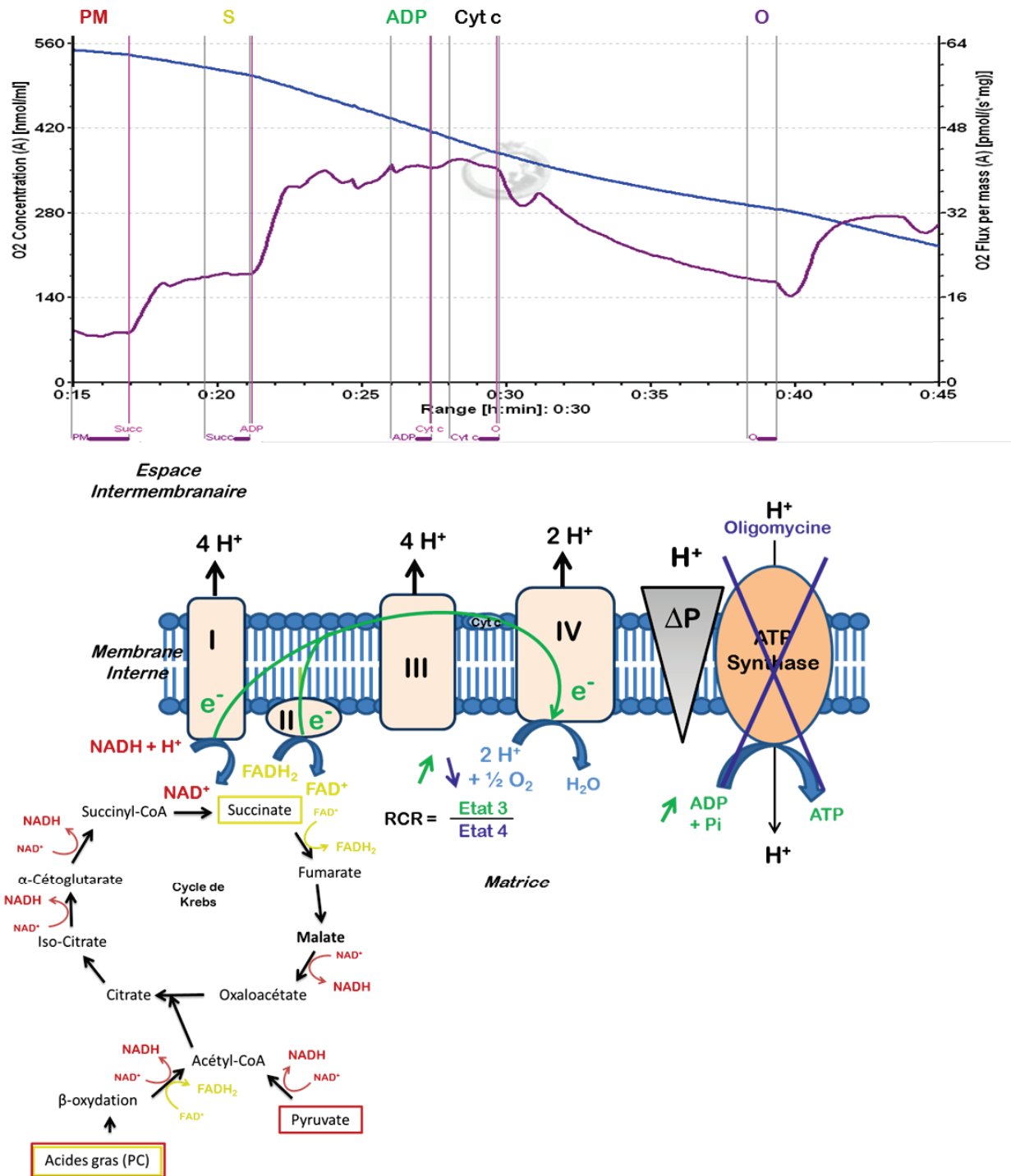


Figure 35 : Illustration des courbes obtenues lors d'une respiration mitochondriale classique et des effets des substrats sur les différents complexes de la chaîne respiratoire. La courbe bleue représente la concentration d'O₂ à chaque instant dans la cuve en nmol/mL et la courbe violette représente le flux d'O₂ en fonction du temps et de la masse de l'échantillon en pmol/(s.mg). Lorsque le flux est constant on obtient un plateau dont la valeur moyenne correspond à la consommation d'O₂ de la fibre. La respiration mitochondriale est étudiée à partir de substrats qui vont être métabolisés dans le cycle de Krebs et ainsi donner des coenzymes réduits (NADH et FADH₂) qui seront oxydés sur la chaîne respiratoire. Deux types de substrats ont été utilisés : Des dérivés glucidiques ou des dérivés lipidiques. Pour les glucides, la respiration est initiée par le pyruvate/malate (PM) qui alimente le complexe I, puis par le succinate (S) qui alimente le complexe II. Pour les lipides, du palmitoyl-carnitine (PC) a été utilisée. Il est d'abord métabolisé par la β-oxydation avant d'entrer dans le cycle de Krebs sous forme d'Acétyl-CoA. Il alimente à la fois les complexes I et II. L'ajout d'ADP active la chaîne respiratoire pour produire de l'ATP (Etat 3). Le blocage de l'ATP synthase par l'oligomycine (O) fait revenir l'activité mitochondriale à son état basale, l'état non-phosphorylant (Etat 4). Le cytochrome-c (Cyt c) est un contrôle interne permettant de s'assurer de l'intégrité des fibres.

4 - Activité de la Cytochrome-c Oxydase (COX ; Complexe IV)

L'activité maximale de la COX a été mesurée de façon isolée sur mitochondries et sur fibres perméabilisées, après ajout dans la cuve de 2 μM de FCCP, 2,5 μM d'antimycine A, 2,5 mM d'ascorbate et 0,25 mM de TMPD. Dans certaines conditions cette mesure a été effectuée sur homogénats musculaires suivant la méthode de Chappel et Perry comme décrit dans (Barré *et al.*, 1986b).

5 - Mesure de l'efficacité mitochondriale (rapport ATP/O)

La consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP ont été mesurées à 41°C sur mitochondries isolées (0,3mg/mL) dans du milieu de respiration, supplémenté par du glucose (20 mM), de l'hexokinase (1.5 U/mL) et du pyruvate/malate (5 mM/ 2.5 mM) plus succinate (5mM).

Le principe de cette méthode repose sur trois réactions enzymatiques (Figure 36). La première correspond à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase mitochondriale à partir d'ADP et la deuxième à 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 deshydrogenase (G6PDH), transforme le G6P en gluconolactone-6-phosphate. Cette réaction utilise comme cofacteur le NAD^+ et produit du $\text{NADH} + \text{H}^+$. Ce NADH ainsi formé est dosé au spectromètre à 340 nm et permet d'estimer la synthèse d'ATP mitochondriale.

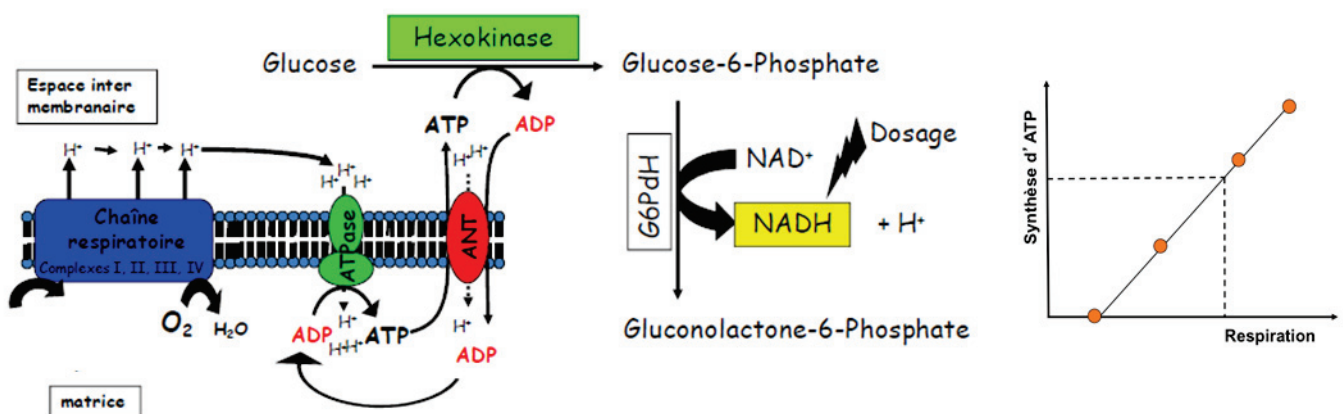


Figure 36 : Principe de la mesure du rapport ATP/O.

La synthèse d'ATP a été initiée par addition de 100 μM , 20 μM , 10 μM d'ADP ou 100 μM d'ADP + oligomycine. Pour chaque condition la consommation d'oxygène a été enregistrée pendant 3 minutes, puis 4 prélèvements de 100 μL de suspension ont été effectués, à raison d'un prélèvement par minute, et les réactions ont été immédiatement stoppées par une solution d'acide perchlorique 10 % / 25 mM EDTA. Après centrifugation des protéines dénaturées (21000 g pendant 5 minutes) et neutralisation du surnageant, la production d'ATP a été déterminée par le contenu en G6P des prélèvements. Les dosages ont été réalisés par spectrophotométrie. Ainsi, le G6P accumulé au cours d'une minute, représente la quantité d'ATP synthétisé par minute.

Les données obtenues permettent de déterminer l'efficacité mitochondriale représentée par une relation linéaire entre la synthèse d'ATP et la consommation d'oxygène (Figure 36).

IV - Etude moléculaire

1 - Etude des transcrits des mitofusines

a - Extraction et dosage des acides ribonucléiques (ARN) totaux

60 à 80 mg de tissus musculaires ont été broyés au broyeur à bille (TissueLyser LT, Qiagen) dans 1 mL de Trizol (Invitrogen). L'extraction des ARN totaux a été obtenue par la méthode classique d'extraction au phénol-chloroforme, celle-ci permettant, par solubilité différentielle et centrifugation, d'isoler les ARN. La concentration en ARN a été dosée par spectrophotométrie en mesurant la densité optique à 260 nm et leur pureté a été vérifiée par la mesure du rapport des densités optiques à 260 et 280 nm (supérieur à 1,6) ainsi que du rapport à 260 et 230 nm (supérieur à 2). L'absence de dégradation des ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%.

b - Transcription inverse (RT) des ARN messagers (ARNm)

La transcription inverse des ARNm en acide desoxyribonucléique complémentaires (ADNc) a été réalisée en trois étapes :

- Linéarisation des ARNm : 1 μg d'ARN, 1 μL d'amorce polyT, 1 μL d'amorce 3' (15 mM) du gène de référence 18S, 1 μL de desoxynucléotides triphosphates (dNTP, 10 mM) pour un volume final de 12 μL , ont été incubés 5 minutes à 65°C puis ont été plongés dans la glace.

- Activation de la RNase-out protégeant les ARN : 4 μ L de tampon MMLV 5X, 2 μ L de DTT et 1 μ L de RNase-out ont été ajoutés au mélange et incubés deux minutes à 37°C.

- Transcription inverse : 1 μ L de RT-MMLV (Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (200 U/ μ L, Invitrogen) a été ajouté puis incubé 50 minutes à 37°C puis 15 minutes à 70°C.

c - Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) semi-quantitative

L'amplification par PCR des ADNc a été réalisée sur un thermocycleur Thermo Hybrid (Ashford, UK) à partir de 1 μ g d'ADNc, 2,5 μ L de tampon PCR 10X, 0,75 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0,75 μ L de dNTP (10 mM), 0,75 μ L d'amorces sens et anti-sens (15 μ M) du gène étudié (Tableau 1), 0,2 μ L de Taq polymérase platinium (5 U/ μ L, Invitrogen) et 17,3 μ L d'eau ultrapure. Après une dénaturation initiale de 3 minutes à 94°C, chaque échantillon a subi un nombre de cycles de PCR (n) variable en fonction du gène étudié (Tableau 1).

Gène amplifié	Séquence des amorces	Taille du fragment amplifié	Nombre de cycles de l'amplification
Mitofusine 1	5' : ATGGACGCCATAAACGTAGC 3' : AAGGCAACAATGGTTTCACG	394 pb	35
Mitofusine 2	5' : GCAGACAATGCAGCAAGAAA 3' : GTGACCATCGACACCATGAG	339 pb	25
18 S	5' : GCTACCACATCCAAGGAAGGC 3' : GTCTTCGAACCTCCGACTTTCG	602 pb	17
β-actine	5' : GACGAGGCCAGAGCAAGAGA 3' : GGGTGTGAAGGTCTCAAACA	225 pb	20

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées en PCR semi-quantitative pour les différents gènes et nombres de cycles de PCR associés.

Afin de déterminer le nombre optimal de cycles pour chaque couple d'amorce, des gammes de cycles ont été préalablement réalisées (Figure 37). Chaque cycle comprenait 45 secondes à 94°C (dénaturation), 30 secondes à 55°C (hybridation) et 1 minute à 72°C (élongation). Une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72°C a été réalisée pour terminer l'amplification.

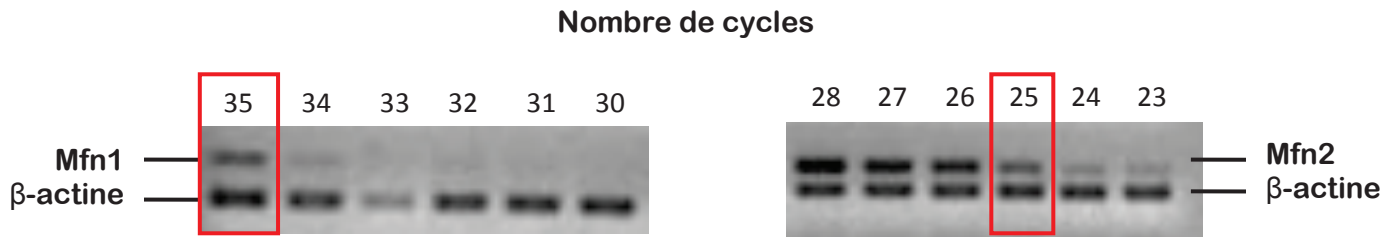


Figure 37 : Gammes de cycles permettant de définir le nombre de cycles d'amplification optimal (rectangle rouge) pour Mfn1 et Mfn2 dans le muscle gastrocnémien de canetons. La β -actine est utilisée comme témoin d'amplification.

d - Analyse des produits PCR

L'analyse des produits d'amplification a été faite par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2%, dilué dans du Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1X, contenant du bromure d'éthidium, un agent intercalant de l'ADN devenant fluorescent lorsqu'il est exposé aux UV. Après migration à 100 V pendant 30 minutes, les produits séparés ont été visualisés sous UV et l'intensité des bandes a été estimée à l'aide d'un système d'analyse d'images Kodak Digital Science™ camera (DC120). L'analyse semi-quantitative de l'expression du gène cible a été déterminée par le calcul du rapport entre l'intensité de la bande du gène cible et celle du gène 18 S co-amplifié.

e - Séquençage des mitofusines

Les amplicons de Mfn1 et Mfn2 ont été séquencés par l'entreprise GATC Biotech puis les séquences obtenus ont été alignées sur celles du poulet grâce au logiciel clustalW2. De nouvelles amorces ont ainsi été dessinées pour la PCR quantitative (Tableau 2).

Gène amplifié	Séquence des amorces	Taille du fragment amplifié
Mitofusine 1	5' : AAGTCTCCTCTGCCATGACC	175 pb
	3' : TTGACTTCACTGGAGCAACG	
Mitofusine 2	5' : GTCTTTGCGAGGCCAGATAG	127 pb
	3' : CCACCCAAGAGAGAAATGGA	
18 S	5' : TGAGGCCATGATTAAGAGGG	182 pb
	3' : AGTCGGCATCGTTTATGGTC	

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour les différents gènes utilisés en PCR quantitative.

2 - Etude protéique de la Mfn2 et d'OPA1

Au vu de la différence d'abondance des isoformes de mitofusines dans le muscle squelettique, nous avons privilégié l'étude protéique de la mfn2, la plus abondante. Il n'existe pas à ce jour d'anticorps anti-mitofusine dirigé contre la mitofusine d'oiseau, nous avons donc utilisé un anticorps anti-mitofusine 2 de rat produit chez le lapin (ab50838, Abcam). Nous avons également mis au point le marquage d'OPA1 grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-OPA1 humaine (612606, BD Transduction Laboratories). Le contrôle positif a été réalisé à partir d'extraits de mitochondries de cerveau ou de muscle squelettique de rat obtenus dans les mêmes conditions que les extraits de mitochondries des différents tissus de canard étudiés.

a - Extraction et dosage des protéines

La mitofusine étant une protéine mitochondriale, les mitochondries des différents tissus ont été extraites. Environ 400 mg des tissus ont été coupés en très petits morceaux à l'aide d'un scalpel puis plongés dans 2 mL de tampon d'isolement (sucrose 100 mM, KCl 50 mM, EDTA 5mM, Tris-base 50 mM, pH 7,4) additionné d'inhibiteurs de protéases 1% (P8340, SIGMA). Les tissus ont été broyés à l'aide d'un « potter », permettant de broyer les cellules sans détruire complètement les membranes. Le broyat a ensuite subi deux centrifugations de 10 minutes à 800 g afin d'éliminer les déchets cellulaires. Seul le surnageant a alors été récupéré. Après une centrifugation de 10 minutes à 10 000 g permettant cette fois de précipiter les mitochondries, le culot a été conservé, puis resuspendu dans 1 mL de tampon d'isolement avant de subir une dernière centrifugation de 10 minutes à 10 000 g. Le culot a ensuite été resuspendu dans 70 µL de tampon de lyse Ripa (triton 1%, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 0,1%, NaCl 140 mM, Tris 10 mM pH 8, Deoxycholate 1%) additionné d'inhibiteurs de protéases 1%.

Les protéines extraites ont ensuite été dosées au spectrophotomètre (UVIKON860, Kontron instruments) à 562 nm, grâce à un kit de dosage (BCATM, Bicinchoninic Acid) Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Une gamme étalon a été réalisée avec des concentrations connues de sérum albumine bovine (BSA).

Une autre technique plus classique d'isolement des mitochondries par centrifugation différentielle a été utilisée (Barré *et al*, 1989 ; Duchamp *et al*, 1991 ; Roussel *et al*, 1998). Dans ce cas, une protéase, la nagarse (1 mg/g) a été utilisée pour séparer les mitochondries intermyofibrillaires des myofibrilles qui les piègent.

b - Préparation des gels de migration et des échantillons

Les gels d'électrophorèse ont été réalisés en deux parties, permettant une première étape de concentration des échantillons jusqu'à l'obtention de zones protéiques très fines qui migreront ensuite dans le gel de séparation. Les protéines recherchées ayant un poids de 86 kDa pour Mfn2 et de 90 à 110 kDa pour OPA1 chez les mammifères, le gel séparateur a été préparé avec 5% d'acrylamide (1,33 mL de Tris (375 mM, pH 8,8), 53 µL de SDS 10%, 2,89 mL d'eau, 0,99 mL d'acrylamide 40%, 39,8 µL de persulfate d'ammonium (APS) 10% et 12 µL de N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (Temed, EUROMEDEX). Une fois le premier gel polymérisé, le gel concentrateur (1,15 mL de Tris-base 0,25 M pH 6,8, 820 µL d'eau, 285 µL d'acrylamide 40%, 23 µL de SDS 10%) a été coulé par-dessus.

Avant d'être déposées, les protéines des échantillons ont subi une dénaturation. Pour cela, 50 µg de protéines mitochondriales ont été ajoutées à du tampon Laemmli 6X puis chauffés 10 minutes à 95°C.

c - Migration et transfert

Après dépôt des échantillons et d'un marqueur moléculaire (Prestained Protein Ladder Plus, EUROMEDEX) dans les puits, la migration a été lancée à 110 V pendant 1h30 dans du tampon de migration (Tris-base 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Figure 38). Cette membrane a préalablement été activée dans du méthanol pour faciliter le transfert. Le transfert a été effectué à 300 mA, dans du tampon de transfert (Tris-base 50 mM, méthanol 20%, glycine 150 mM, pH 8,3) pendant 1h.

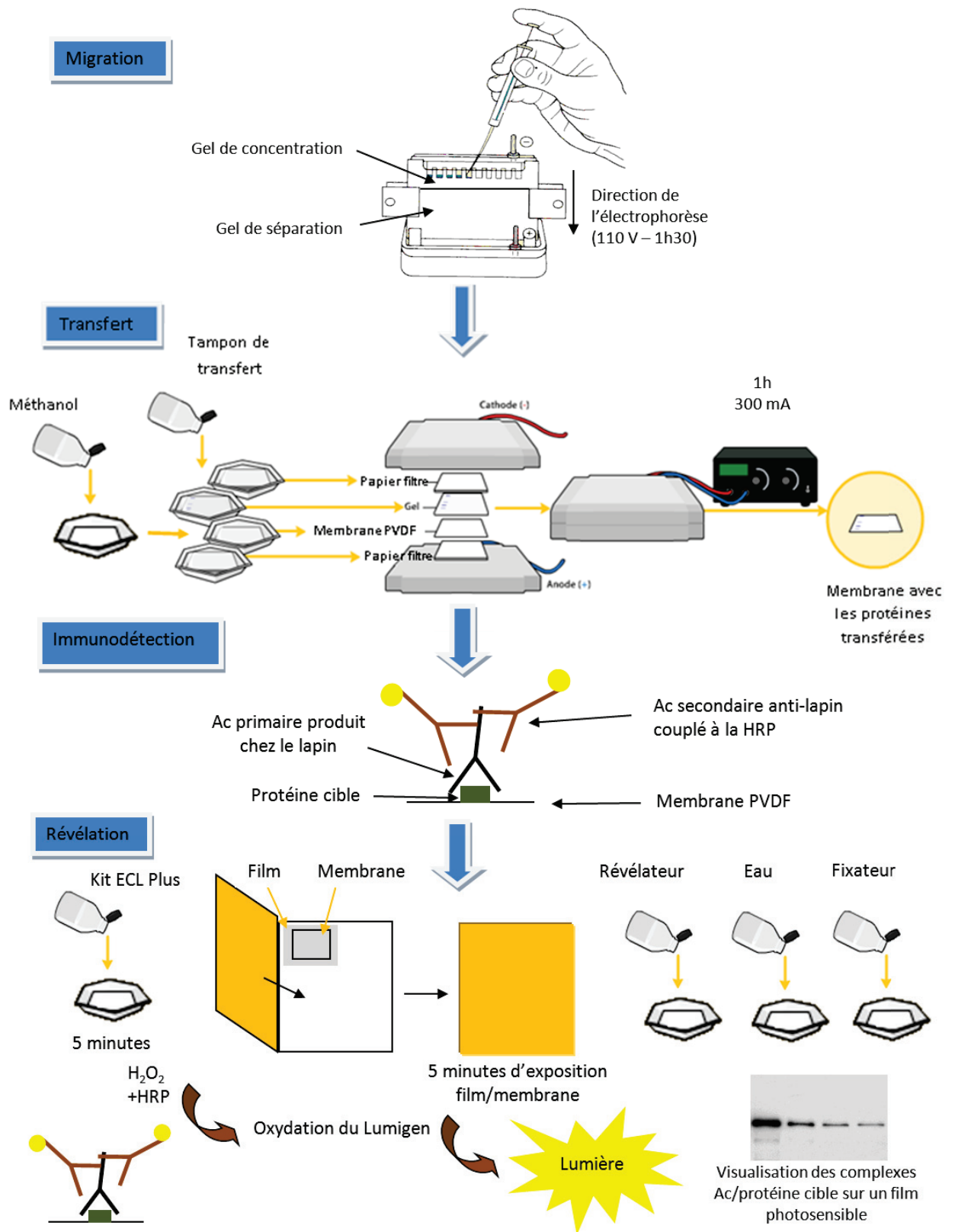


Figure 38 : Principe de la technique de western blot.

d - Immunodétection

Le blocage des sites d'interactions non-spécifiques entre membrane et anticorps a été réalisé en incubant la membrane dans une solution de lait sans matière grasse diluée à 5% pendant 1h à température ambiante. La membrane a ensuite été incubée dans l'anticorps (Ac) primaire de la protéine recherchée (anti-mitofusine 2 (ab50838, Abcam) diluée au 1/200^{ème} ou anti-OPA1 (612606, BD Transduction Laboratories) diluée au 1/1000^{ème}) dans du lait diluée à 2% toute la nuit à 4°C, sous agitation. Après 3 lavages de 10 minutes dans du TBS-Tween 0,4%, la membrane a été incubée dans l'anticorps secondaire approprié (anti-lapin ou anti-souris) couplé à la Horse Radish Peroxydase (HRP), diluée au 1/5000^{ème} dans du lait à 2% pendant 1h. Après 3 lavages dans du TBS-Tween 0,4%, la membrane a été révélée.

e - Révélation

La révélation a été réalisée par chimiluminescence grâce à un kit de révélation (ECL Western Blotting Detection System, AmershamTM, GE Healthcare). Le substrat (Lumigen) émet de la lumière lorsqu'il est oxydé par la réaction entre l' H_2O_2 et la HRP présente sur l'anticorps secondaire. Le film photosensible a été exposé 5 minutes au contact de la membrane dans une chambre noire puis immergé successivement dans trois bains : révélateur (GBX, Kodak), eau et enfin fixateur (GBX, Kodak) (Figure 38).

L'intensité des bandes a été quantifiée grâce au logiciel Scion Image (Scion Corporation, USA).

Une coloration au rouge ponceau (0,1 g dans 100 mL d'acide acétique 5%) a été réalisée comme indicateur de charge pour contrôler la quantité de protéines déposées dans chaque puits. Pour cela les membranes ont été incubées 5 minutes dans le rouge ponceau puis ont été rincées à l'eau. La moyenne d'intensité des bandes obtenues pour chaque puits a été quantifiée afin de vérifier qu'il n'y ait pas de différence significative de quantité de protéines entre les puits.

V - Etude statistique

Les résultats expérimentaux présentés correspondent à des moyennes \pm sem (erreur standard à la moyenne). Pour tester les différences entre les groupes, les moyennes ont été comparées en effectuant des ANOVA suivies de tests *post-hoc* de Fisher. Le seuil de significativité a été choisi à $p < 0,05$. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statview 5.0 software (Abacus Concept, Berkeley).

Etude 1

Etude 1

Caractérisation des protéines de fusion mitochondriale chez l'oiseau, mise au point des techniques de détection génique et protéique

I - Introduction

Les oiseaux ne possèdent pas d'équivalent du tissu adipeux brun, le tissu thermogène des petits mammifères. Pourtant ils sont capables de développer des capacités accrues de thermogénèse de régulation lorsqu'ils sont exposés de façon précoce et prolongée au froid. Cette thermogénèse accrue est principalement liée à un remodelage morpho-fonctionnel des muscles squelettiques qui présentent une typologie différente, des capacités métaboliques plus importantes et une altération du rendement des processus bioénergétiques mitochondriaux après exposition prolongée au froid (Duchamp *et al.*, 1991).

Chez l'oiseau, aucune étude n'a exploré l'organisation des réseaux mitochondriaux et leur plasticité en fonction des conditions environnementales. Une première étape serait de caractériser l'expression potentielle d'analogues de protéines de fusion des mitochondries. C'est donc dans ce contexte que s'inscrit notre première étude qui vise à caractériser chez l'oiseau la présence des protéines de fusion connues chez les mammifères.

II - Animaux

48 canetons de Barbarie (*Cairina moschata*) mâles (pedigree R51, INRA, Eclosion Grimaud-la-corbrière, France) ont été utilisés pour cette étude.

Les canetons obtenus à l'âge d'un jour ont été placés à 30°C durant les 3 premiers jours puis la T_a a été baissée progressivement jusqu'à 25°C. Six canetons ont été abattus dès leur arrivée à l'animalerie, soit un jour après l'éclosion (1j) puis 6 autres à l'âge de 8 jours (8j), 16 jours (16j), 30 jours (30j) et 43 jours (43j).

En parallèle, après 9 jours d'élevage à TN, 18 canetons de masse corporelle supérieure à 100 g ont été placés à 4°C (CA pour Cold-Acclimated). Les témoins ont été élevés à 25°C, température de thermoneutralité (TN). Les animaux ont été mis à mort aux

différents temps de l'étude (Figure 39) en alternant 1 caneton de chaque groupe (TN ou CA) soit :

- 12 canetons à 16j : 6 CA après 1 semaine d'acclimatation et 6 TN de même âge
- 12 canetons à 30j : 6 CA après 3 semaines d'acclimatation et 6 TN de même âge
- 12 canetons à 43j : 6 CA après 5 semaines d'acclimatation et 6 TN de même âge

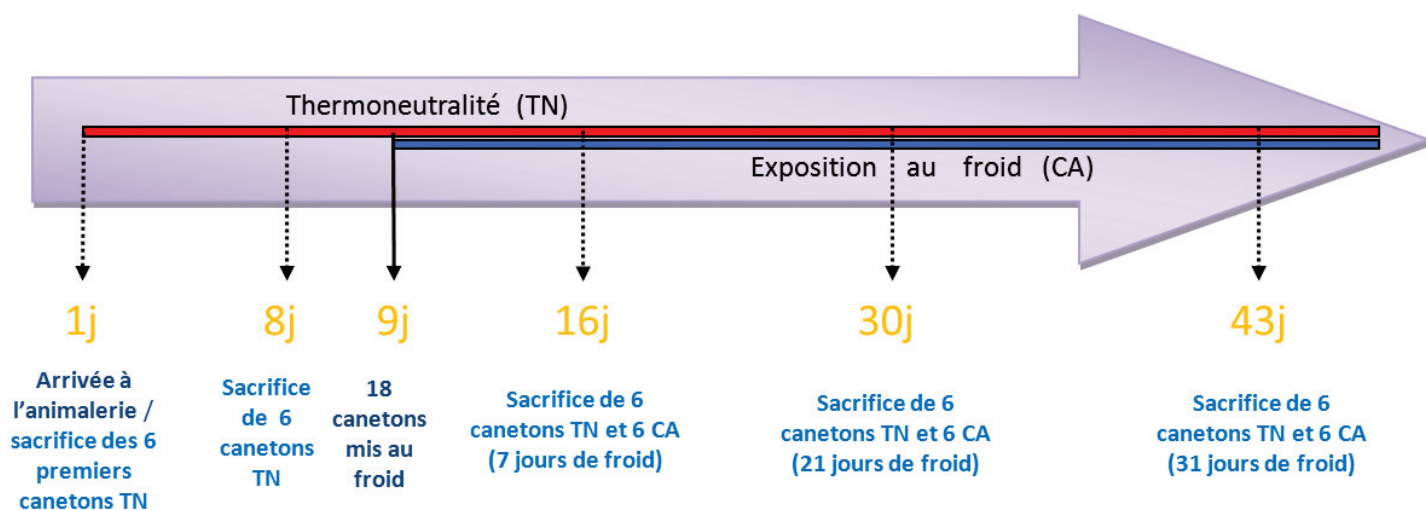


Figure 39 : Protocole expérimental pour l'étude de l'effet de l'âge et de l'acclimatation au froid sur l'expression des protéines de fusion.

III - Objectifs de l'étude

Cette étude s'est déroulée en trois étapes successives :

- Détecter l'expression d'homologues des mitofusines 1 et 2 chez le canard en recherchant des transcrits grâce à la technique de PCR semi-quantitative.
- Mettre au point la technique de western blot afin de mesurer le niveau d'expression protéique de la Mfn2 et d'OPA1 à partir d'un anticorps dirigé contre les protéines de mammifères.
- Déterminer si des contraintes énergétiques telles que la croissance et le froid peuvent modifier l'expression relative de ces protéines de fusion.

IV - Résultats

1 - Détection des transcrits des mitofusines 1 et 2

a - RT-PCR

A partir d'ARN totaux extraits de muscle squelettique de canetons élevés à thermoneutralité (TN), la RT-PCR classique a permis d'amplifier des fragments d'ADN avec des amorces dessinées d'après les séquences des gènes des Mfns 1 et 2 de poulet. Après migration sur gel des produits PCR, on détectait une bande de 394 paires de bases (pb), taille attendue de l'amplicon de la Mfn1, et une bande de 339 pb, taille attendue de l'amplicon de la Mfn2 (Figure 40).

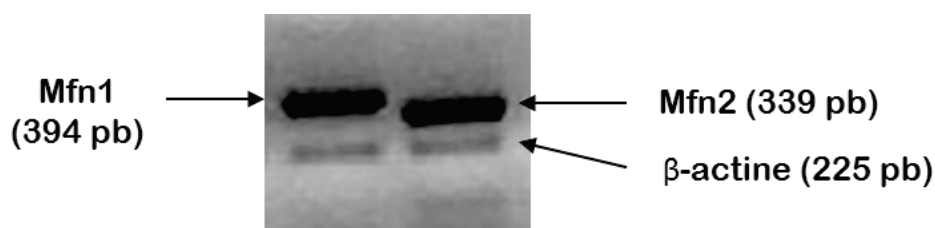


Figure 40 : Photographie d'un gel de migration des produits PCR illustrant l'amplification des Mfns 1 et 2 dans le muscle gastrocnémien interne de canard. La β -actine est utilisée comme témoin d'amplification.

Ces résultats indiquaient que les amorces sélectionnées permettaient d'amplifier avec une assez bonne spécificité un fragment d'ADN avec la taille attendue suggérant l'expression musculaire de gènes codant des homologues des Mfns 1 et 2 chez le caneton. La grande différence du nombre de cycles (35 pour la Mfn1 et 25 pour la Mfn2) de PCR nécessaires suggérait une plus forte expression de la Mfn2 dans ce tissu.

b - Séquençage des ADNc amplifiés

Afin de s'assurer de la spécificité de l'amplification réalisée, les amplicons des Mfns 1 et 2 obtenus chez le canard ont été séquencés. Les séquences obtenues ont été alignées avec celles du poulet dont le génome a été entièrement séquencé (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004) montrant une forte similitude de séquences entre les deux espèces avec près de 93% de similitude pour la Mfn1 et la Mfn2 (Figure 41). Les ADNc amplifiés correspondaient donc bien aux transcrits d'homologues des gènes des mitofusines.

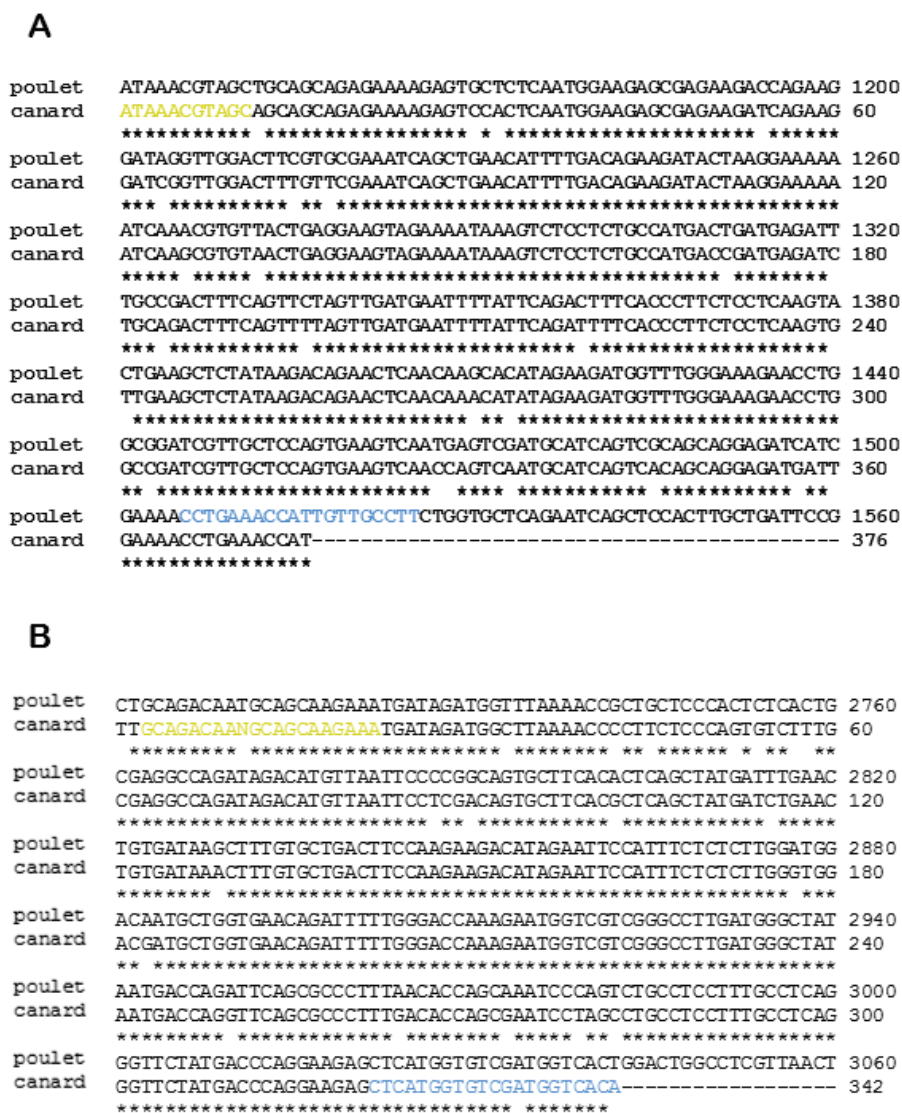


Figure 41 : Séquences nucléotidiques d’une partie des gènes codant les Mfns 1 (A) et 2 (B) de poulet alignées avec les séquences des produits d’amplification obtenus chez le canard avec les amorces Mfn1 (A) et Mfn2 (B). Les séquences surlignées correspondent aux amorces de PCR. Les étoiles indiquent les nucléotides conservés.

c - Profil d’expression génique des mitofusines chez le canard

Par RT-PCR classique, nous avons détecté les transcrits codant la Mfn1 et la Mfn2 dans tous les tissus (Figure 42) mais leurs répartitions tissulaires apparaissaient différentes. Pour la Mfn1, l’intensité du fragment amplifié était plus grande dans le muscle gastrocnémien interne, le foie et le cerveau alors que pour la Mfn2, l’intensité était plus grande dans le quadriceps, le cœur et le cerveau. En faisant l’hypothèse d’une efficacité similaire de rétro-transcription et d’amplification pour les 2 transcrits, ces résultats suggéraient de fortes différences d’abondance relative des transcrits et d’expression tissulaire des gènes.

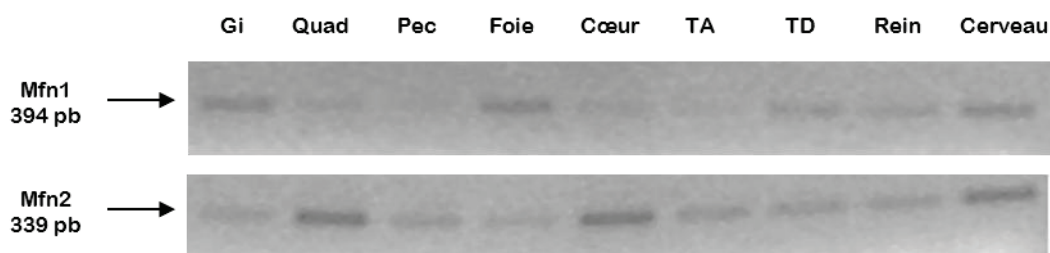


Figure 42 : Expression tissulaire des ARNm de la Mfn1 et de la Mfn2. Photographie d'un gel d'électrophorèse après amplification de la Mfn1 (35 cycles) ou de la Mfn2 (25 cycles) dans différents tissus : le muscle gastrocnémien interne (Gi), le quadriceps femoris (Quad), le muscle pectoral (Pec), le foie, le cœur, le tissu adipeux sous cutané (TA), le tube digestif (TD, duodénum), le rein et le cerveau.

Chez l'oiseau, le muscle pectoral subit des modifications morphologiques, accompagnées d'un phénomène de maturation au cours des premiers jours de vie (Bandman and Rosser, 2000; Choi *et al.*, 1993; Rosser *et al.*, 1998). Le muscle, et plus particulièrement le muscle pectoral, est également le tissu thermogène des oiseaux lorsque ceux-ci sont exposés au froid. Pour cette étude nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement à ce tissu. Comme l'expression musculaire de la Mfn1 apparaissait faible dans le muscle pectoral, nous avons privilégié la détection de la protéine Mfn2.

2 - Détection des protéines de fusion par western blot

a - Dans les muscles squelettiques

Dans un premier temps, nous avons tenté de détecter la protéine Mfn2 à partir d'homogénats tissulaires, mais nous n'avons pas obtenu de signal satisfaisant. Nous avons donc travaillé sur une solution enrichie en mitochondries extraites du muscle pectoral (Pec) de canard. La détection de la protéine a été réalisée avec un anticorps anti-Mfn2 de rat. Nos résultats montraient que cet anticorps détectait une protéine similaire à la mitofusine de rongeur. La spécificité de reconnaissance de l'anticorps était attestée par la similitude de taille de la protéine détectée chez le canard avec celle d'un témoin positif correspondant à des mitochondries de cerveau de rat (Figure 43 A). L'abondance relative de la protéine Mfn2 suivait l'abondance des transcrits observée par PCR, avec une expression plus importante dans le quadriceps et le cœur que dans les autres muscles squelettiques (pectoral, gastrocnémiens interne et externe) (Figure 43 B).

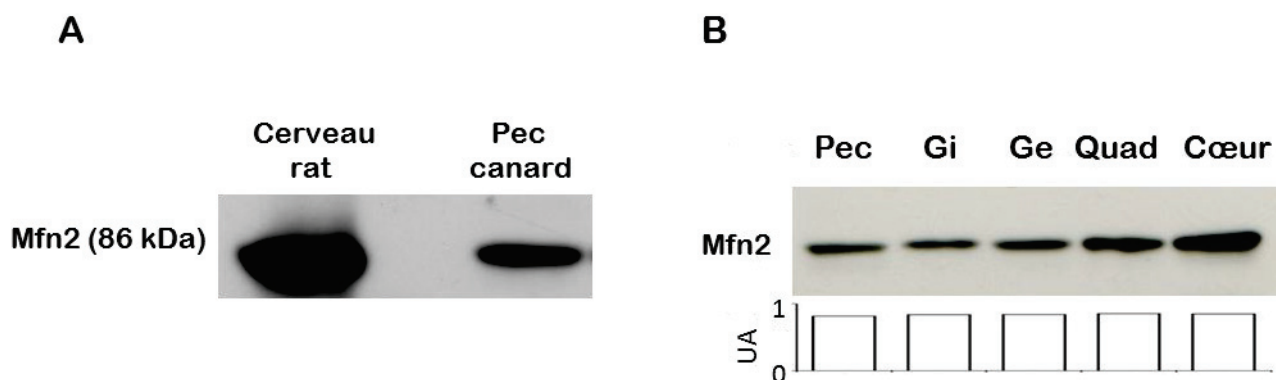


Figure 43 : Détection par Western Blot d'un homologue de la protéine Mfn2 (86 kDa). (A) Comparaison entre des mitochondries musculaires de canard (60 μ g) isolées du muscle pectoral (Pec) et des mitochondries de cerveau de rat (20 μ g) utilisées comme témoin positif. (B) Comparaison de l'abondance relative de la Mfn2 dans les mitochondries isolées (50 μ g) de différents muscles squelettiques : le muscle pectoral (Pec), les muscles gastrocnémiens interne (Gi) et externe (Ge), le quadriceps femoris (Quad) et le cœur. La quantité de protéines mitochondriales déposée a été contrôlée par une coloration au rouge ponceau et les intensités relatives ont été représentées sous forme d'histogramme.

En suivant le même protocole, nous avons également réussi à obtenir, chez le canard et le manchot, les 4 à 5 bandes (comprises entre 90 et 110 kDa) caractéristiques de la protéine OPA1, avec l'utilisation d'un anticorps anti-OPA1 de mammifère (Figure 44).

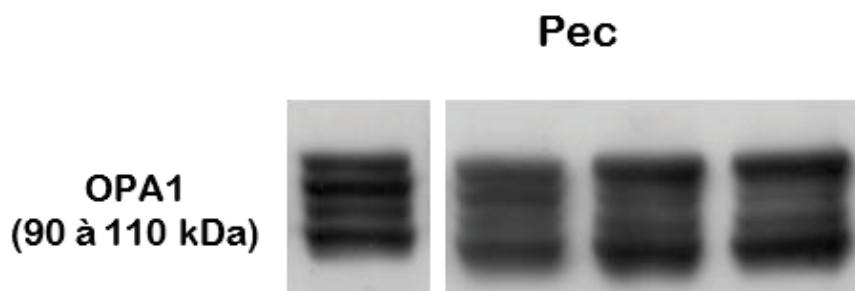


Figure 44 : Détection par Western Blot d'un homologue de la protéine OPA1 (90 à 110kDa). Exemple de signal dans les mitochondries isolées du muscle pectoral (Pec) de manchot. 50 μ g de protéines mitochondriales ont été chargés sur les gels.

b - En fonction du type de mitochondries

Classiquement, l'isolation de mitochondries IMF nécessite l'utilisation d'une protéase alors que quelques passages du tissu au potter suffisent à obtenir une population de mitochondries SS (Barré *et al.*, 1989; Roussel *et al.*, 1998). Lorsqu'on utilisait ces techniques d'isolation de mitochondries IMF et SS, on observait que l'abondance relative de la Mfn2 était plus faible pour les mitochondries IMF ayant subi la digestion enzymatique (Figure 45). Cependant, la Mfn2 étant localisée au niveau de la membrane externe mitochondriale, nous nous sommes questionnés sur l'impact de la potentielle digestion enzymatique sur l'intégrité

de cette protéine au niveau membranaire. Afin de vérifier cela, dans un deuxième protocole, les mitochondries IMF ont été extraites sans protéase en augmentant le nombre de passages au potter du culot de myofibrilles. Dans ces conditions, l'abondance relative de la Mfn2 était similaire dans les deux types de mitochondries. Ces résultats montraient la dégradation probable de la Mfn2 mitochondriale par la protéase. Pour la suite des expérimentations de quantification protéique, nous avons extrait les mitochondries avec un traitement sans protéase permettant d'obtenir un mélange des deux populations de mitochondries IMF et SS, préservant l'intégrité de la Mfn2.

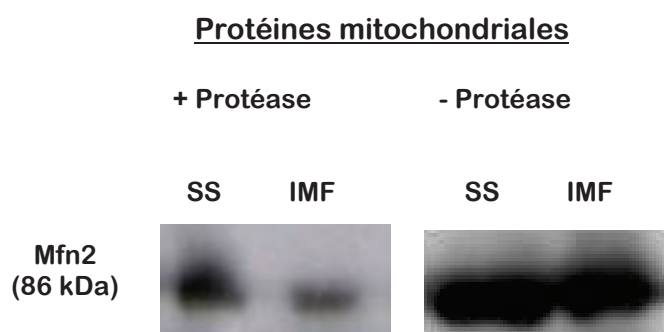


Figure 45 : Détection par Western Blot d'un homologue de la protéine Mfn2 (86 kDa) dans les 2 populations de mitochondries (SS et IMF) du muscle squelettique de canard. Les extraits de mitochondries ont été obtenus à partir du muscle gastrocnémien interne de canard selon 2 méthodes d'extraction, avec ou sans protéase. La libération des mitochondries IMF sans protéase a été obtenue en augmentant le nombre de cycles de potterisation. 50 µg de protéines mitochondriales ont été chargés dans chaque cas sur les gels.

3 - Effets de l'âge et de la température d'élevage sur l'expression musculaire des protéines de fusion chez le canard

a - Croissance pondérale

L'influence de la température d'acclimatation sur la vitesse de croissance a été contrôlée par pesées quotidiennes des canards (Figure 46). Comme attendu, la croissance pondérale était ralentie chez les canards élevés au froid. Ces résultats suggèrent un investissement d'énergie supérieur pour des besoins de thermorégulation, au détriment de la croissance.

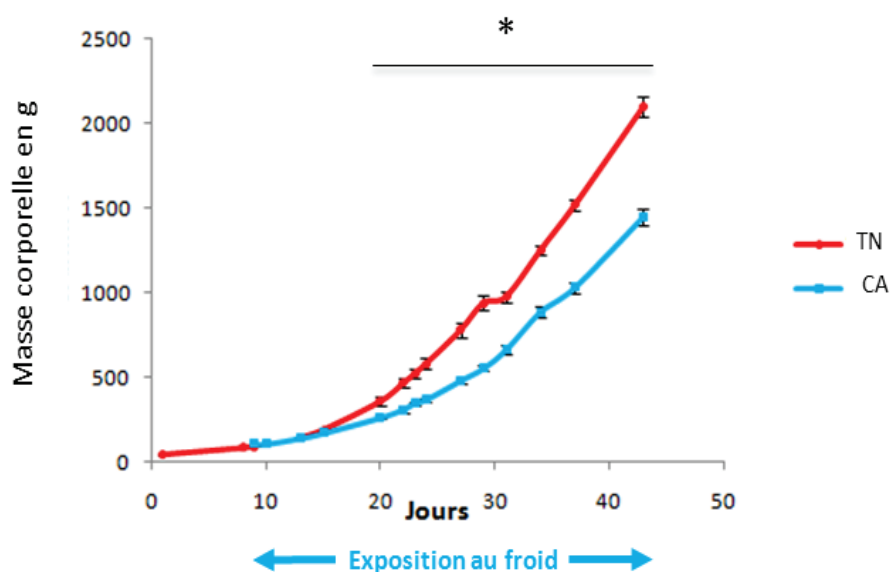


Figure 46 : Suivi de la masse corporelle (en g) en fonction de l'âge (en jours) des canards élevés à 25°C (TN ; n=6) et à 4°C (CA ; n=6). Les valeurs correspondent aux moyennes \pm sem. Dès 10 jours d'exposition au froid, une différence significative (*) de masse corporelle apparaît entre les 2 groupes.

b - Abondance relative des ARNm codant les mitofusines

- Dans le muscle gastrocnémien interne (Gi)

Par RT-PCR semi-quantitative, nous avons observé que l'abondance relative des ARNm codant la Mfn1 dans le Gi augmentait significativement entre les âges de 1 et 16 jours pour les canetons élevés à thermoneutralité (TN) avant de diminuer et revenir à un niveau post-éclosion par la suite (Figure 47A). L'exposition au froid réduisait significativement l'expression de la Mfn1 dans le Gi après une et cinq semaines par comparaison avec les canetons élevés à TN.

Le gène de la mitofusine 2 ne suivait pas le même profil d'expression dans le Gi (Figure 47B). L'abondance des ARNm codant la Mfn2 augmentait significativement avec l'âge sur toute la période étudiée mais l'exposition au froid n'avait pas d'influence.

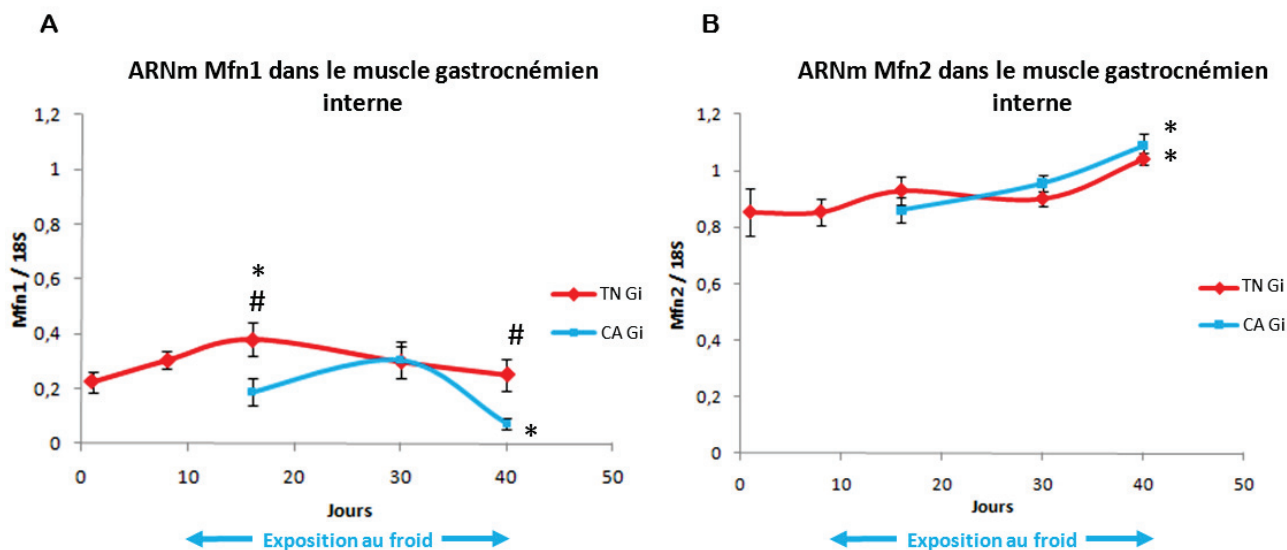


Figure 47 : Variation de l'abondance relative des transcrits codant les mitofusines 1 et 2 en PCR semi-quantitative : (A) Mfn1 et (B) Mfn2 dans le muscle gastrocnémien interne (Gi) en fonction de l'âge et de l'acclimatation thermique. Les valeurs sont rapportées au gène de référence 18S et représentent les moyennes \pm sem (n=6). Les étoiles (*) correspondent aux variations significatives au cours de la croissance ($p < 0,05$ vs 1j) et les dièses (#) correspondent aux différences significatives entre des canetons de même âge élevés à thermoneutralité (TN) ou acclimatés au froid (CA).

- Dans le muscle pectoral

Dans le muscle pectoral de canetons élevés à TN, l'expression de l'ARNm de la Mfn1 montrait une augmentation significative entre le jour 1 et la 4^{ème} semaine de croissance (Figure 48A). L'exposition au froid augmentait l'abondance relative de l'ARNm de la Mfn1 avec un effet net après une semaine à 4°C (+150% vs TN) mais l'effet tendait ensuite à disparaître dès 3 semaines d'exposition au froid, pour revenir au même niveau que les canetons élevés à thermoneutralité. Les mêmes effets étaient globalement observés pour l'abondance des transcrits de la mitofusine 2 dans le muscle pectoral (Figure 48B).

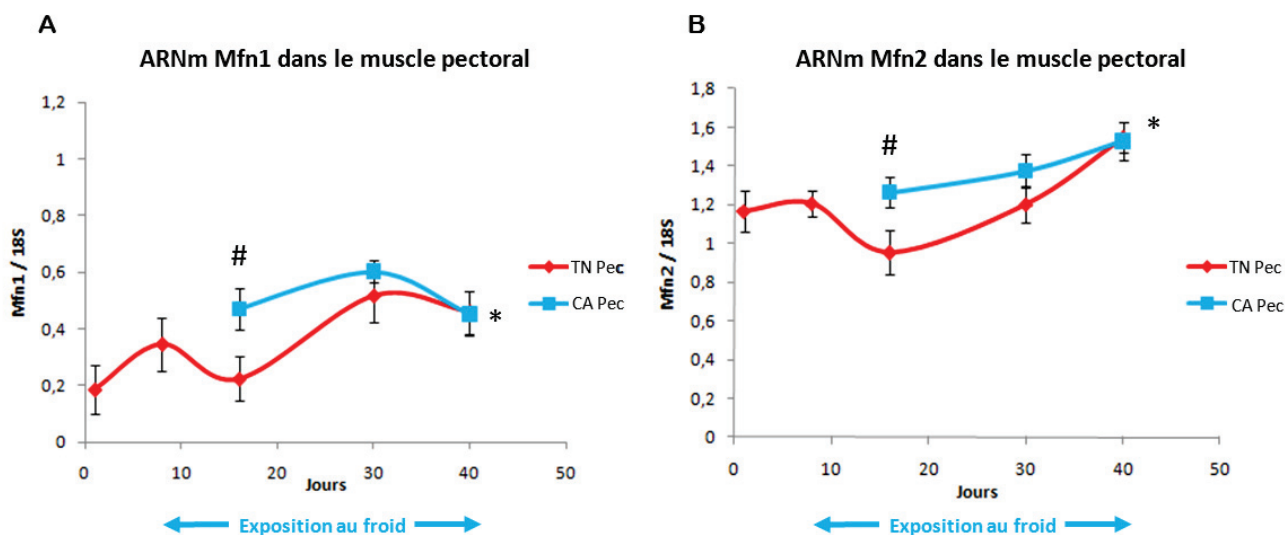


Figure 48 : Variation de l'abondance relative des transcrits codant les mitofusines 1 et 2 en PCR semi-quantitative : (A) Mfn1 et (B) Mfn2 dans le muscle pectoral (Pec) en fonction de l'âge et de la température d'élevage (TN : 25°C et CA : 4°C). Les valeurs sont rapportées au gène de référence 18S et représentent les moyennes \pm sem (n=6). Les étoiles (*) correspondent aux variations significatives au cours de la croissance ($p < 0,05$ vs 1j) et les dièses (#) correspondent aux différences entre les canetons élevés à thermoneutralité (en rouge) et ceux acclimatés au froid (en bleu).

c - Abondance relative des protéines de fusion Mfn2 et OPA1

- La protéine Mfn2

Parallèlement à l'étude génique, nous avons tenté de quantifier le niveau d'expression de la protéine Mfn2 dans le muscle pectoral de canard par western-blot. Nous avons observé que contrairement aux variations des transcrits, l'abondance relative de la protéine Mfn2 ne variait pas significativement chez les canetons au cours de la croissance (7j vs 43j) (Figure 49B). De manière également surprenante, par comparaison avec les résultats sur les transcrits, aucune variation de l'abondance relative de la protéine Mfn2 n'était observée par western-blot chez les canetons après 1 semaine d'exposition au froid (Figure 49A) en comparaison aux canards élevés à thermoneutralité. De plus, une forte hétérogénéité individuelle était observée dans les niveaux d'expression protéique de la Mfn2 de ce groupe (16j CA) en réponse à l'exposition au froid. L'exposition prolongée au froid (5 semaines) n'induisait pas de différence de contenu en Mfn2 (Figure 49B).

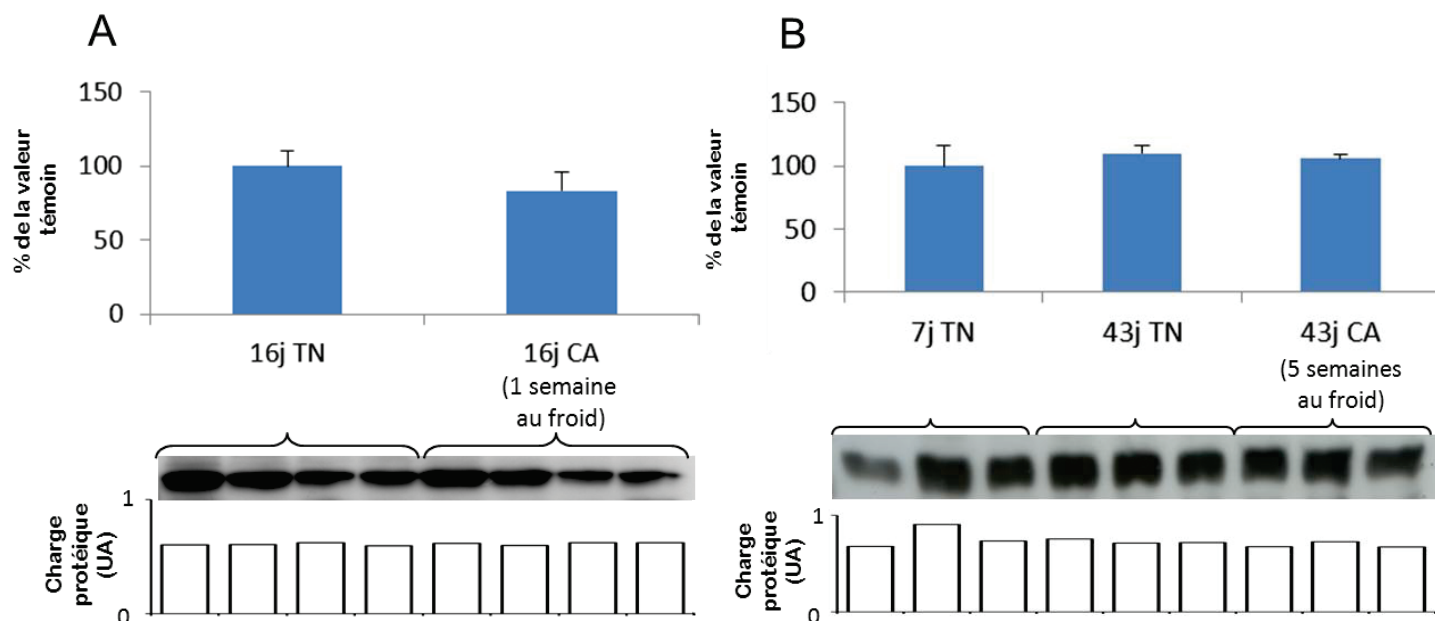


Figure 49 : Effet de la croissance et de l'exposition au froid sur l'abondance relative de la protéine Mfn2 dans le muscle pectoral de canard. (A) Western blot sur des mitochondries isolées de pectoral de canards (n=4) âgés de 16 jours (16j) et exposés au froid depuis une semaine (CA) ou élevés à thermoneutralité (TN). (B) Comparaison de l'abondance relative de l'expression de la Mfn2 chez des canetons âgés de 7 jours (7j ; n=3) et de 43 jours (43j ; n=3) élevés au froid (CA) ou à thermoneutralité (TN). Les résultats sont exprimés en % de la valeur témoin correspondant à 16j TN (A) et 7j TN (B). La quantité de protéines mitochondriales déposée a été contrôlée par une coloration au rouge ponceau et les intensités relatives (UA) ont été représentées.

- La protéine OPA1

Comme pour la Mfn2, on n'observait aucune modification de l'abondance relative de la protéine OPA1 au cours de la croissance dans les mitochondries du muscle pectoral (Figure 50B).

Par contre, contrairement à la Mfn2, l'abondance relative de la protéine OPA1 augmentait significativement (+52% ; $p < 0,05$) dans les mitochondries extraites du muscle pectoral des canetons acclimatés au froid pendant 1 semaine (16j CA) en comparaison avec ceux élevés à TN (Figure 50A). En revanche, lorsque l'exposition au froid était prolongée (5 semaines), on n'observait plus de différence de contenu en protéine OPA1 (Figure 50B).

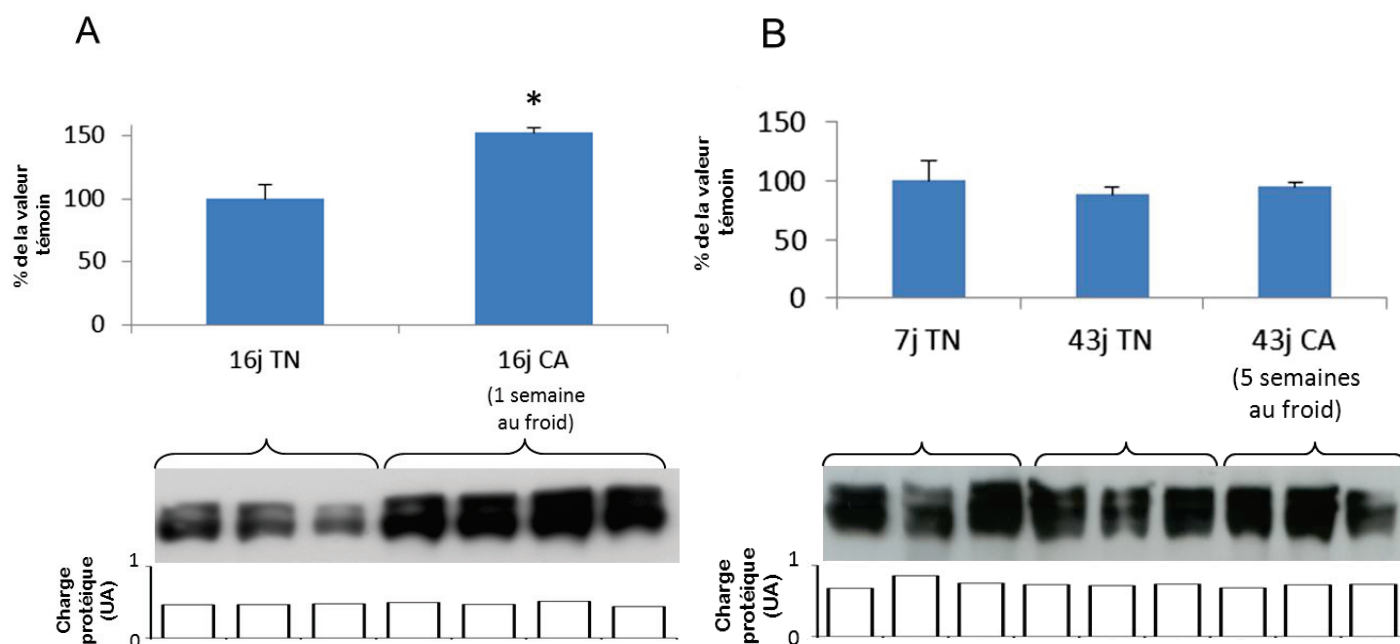


Figure 50 : Effet de la croissance et de l'exposition au froid sur l'abondance relative de la protéine OPA1 dans le muscle pectoral de canard. (A) Western blot sur des mitochondries isolées de pectoral de canards âgés de 16 jours (16j) et exposés au froid depuis une semaine (CA ; n=4) ou élevés à thermoneutralité (TN ; n=3). (B) Comparaison de l'abondance relative de l'expression de la protéine OPA1 chez des canetons âgés de 7 jours (7j ; n=3) et de 43 jours (43j ; n=3) élevés au froid (CA) ou à thermoneutralité (TN). Les résultats sont exprimés en % de la valeur témoin correspondant à 16j TN (A) et 7j TN (B). La quantité de protéines mitochondriales déposée a été contrôlée par une coloration au rouge ponceau et les intensités relatives (UA). Les étoiles (*) représentent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les groupes.

V - Discussion

Cette étude a permis pour la première fois de caractériser l'expression d'homologues aviaires des protéines de fusion dans les tissus de canetons au niveau ARNm pour les Mfn1 et 2 et au niveau protéique pour la Mfn2 et OPA1. Nous avons montré que l'expression des deux mitofusines variait selon les tissus. De plus, au sein du muscle pectoral, cette expression variait également en fonction de l'âge et de la température d'élevage des canetons avec des effets spécifiques selon les protéines.

1 - Expression d'homologues des protéines de fusion chez le canard

Les fragments d'ADNc amplifiés par PCR chez le canard montrent une forte similitude (93%) de séquence avec les Mfns 1 et 2 identifiées sur le génome séquencé du poulet. Ces séquences sont également similaires à celles décrites chez les mammifères (80% avec le rat) suggérant l'expression chez le canard d'homologues des gènes codant les Mfns 1 et 2. Ces analogies de séquences se doublent d'une analogie d'expression tissulaire. En effet, leur répartition est similaire à celle qui est décrite chez les mammifères (Bach *et al.*, 2003). On observe ainsi une expression relativement ubiquitaire de ces ARNm dans les organes étudiés mais avec certains tissus présentant des niveaux d'expression plus élevés comme les muscles squelettiques, le foie et le cerveau pour la Mfn1 et les muscles squelettiques, le cœur et le cerveau pour la Mfn2. Au vu de la différence de nombre de cycles de PCR nécessaires à l'amplification de chaque transcrits (35 pour Mfn1 et 25 pour Mfn2), la Mfn2 semble être l'isoforme majoritairement exprimée dans les tissus notamment le muscle squelettique. En plus de son rôle dans la fusion mitochondrial, la Mfn2 est décrite comme une protéine jouant un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial (Bach *et al.*, 2003; Pich *et al.*, 2005), c'est pourquoi, pour la suite de notre étude nous sommes préférentiellement intéressés à la Mfn2 par rapport à la Mfn1.

Malgré de nombreux essais sur homogénats musculaires, nous n'avons pas pu visualiser Mfn2 et OPA1 avec les anticorps dirigés contre ces deux protéines. Comme chez le mammifère, l'utilisation d'une suspension enrichie en protéines mitochondriales apparaît essentielle pour détecter les protéines d'intérêt. En effet, chez le rat la Mfn2 n'a pu être détectée que dans un homogénat de tissu adipeux brun, mais sans résultat sur des homogénats de cœur et de rein (Bach *et al.*, 2003).

Il est apparu que les techniques classiques d'isolement des mitochondries, et plus particulièrement de la population de mitochondries IMF mettant en jeu l'utilisation d'une protéase, diminuaient la détection de la Mfn2. Nous avons donc supposé que l'utilisation d'une protéase pouvait dégrader les protéines présentes sur la membrane externe des mitochondries, comme c'est le cas pour la Mfn2 de mammifère. Par la suite, pour la réalisation des western-blot, nous avons opté pour un isolement des mitochondries sans protéase, ce qui a diminué notre rendement d'extraction, mais nous a permis de conserver de manière relativement intacte les protéines de la membrane externe mitochondriale. Nous avons également pris soin d'utiliser des inhibiteurs de protéases pour extraire les mitochondries et préserver au mieux les protéines lors de l'extraction.

Ces résultats nous confortent sur le fait que la protéine que nous détectons est bien un homologue de la Mfn2, sur la base de sa localisation mitochondriale, potentiellement sur les membranes externes mitochondriales où elle serait plus exposée à une action protéolytique. Ce positionnement est conforme à ce qui est décrit chez les mammifères, la Mfn2 étant une protéine située sur la membrane externe mitochondriale, possédant un domaine transmembranaire et deux segments orientés vers le cytosol permettant l'accrochage de deux mitofusines (Griffin *et al.*, 2006). Nous avons également montré que l'abondance de la protéine Mfn2 n'est pas différente entre les populations de mitochondries musculaires (intermyofibrillaires ou subsarcolemmales) mais qu'elle dépend largement du tissu étudié. La Mfn2 apparaît en effet très fortement exprimée au niveau des transcrits dans le muscle quadriceps et le cœur qui ont un métabolisme très oxydatif. En revanche, elle est moins fortement exprimée dans le muscle pectoral qui présente un métabolisme plus glycolytique. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir une gradation de l'expression de la Mfn2 en fonction de l'activité oxydative du muscle squelettique. Plus le muscle est composé de fibres oxydatives plus la Mfn2 apparaît exprimée au niveau transcrits, ce qui irait dans le sens des différences d'organisation des réseaux mitochondriaux observés en fonction du type de fibres musculaires (Ogata and Yamasaki, 1997).

L'utilisation d'anticorps anti-Mfn2 et anti-OPA1 de mammifères sur nos préparations mitochondriales de muscle d'oiseau, nous a donc permis de détecter des protéines de poids moléculaire voisin (86 kDa et 5 bandes entre 90 et 110 kDa) à celle exprimée chez le rat. La détection de ces protéines de fusion chez l'oiseau avec des anticorps de mammifères nous laisse supposer une similitude de séquence en acides aminés entre ces espèces. Nous n'avons malheureusement pas pu séquencer les protéines détectées afin de confirmer que ces anticorps détectaient effectivement Mfn2 et OPA1 chez le canard.

2 - Variation de l'expression des mitofusines avec la croissance

Si une tendance globale à l'augmentation de l'expression des ARNm des mitofusines est observée avec l'âge des canetons, la situation est contrastée selon l'isoforme et le type de muscle squelettique. L'abondance relative des ARNm codant Mfn1 et Mfn2 augmente globalement avec l'âge dans le muscle pectoral mais les effets sont moindres pour le muscle gastrocnémien interne. En revanche, aucune modification de l'expression protéique de la Mfn2 et d'OPA1 n'est observée entre 7j et 43j dans le muscle pectoral. Ces résultats discordants entre transcrits et protéines indiquent une possibilité de régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la Mfn2 chez l'oiseau. L'observation d'une absence

d'effet « âge » sur l'expression des mitofusines ne semble pas indiquer chez le canard de développement post-éclosion des réseaux mitochondriaux contrairement à ce qui est décrit chez la souris où ces réseaux s'organisent progressivement au sein des cellules musculaires (Boncompagni *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent une maturation précoce chez le caneton des réseaux mitochondriaux musculaires dans les muscles locomoteurs comme le muscle gastrocnémien. En effet, dès l'éclosion, les canetons sont très mobiles et capables d'une activité contractile et locomotrice importante contrairement à la souris nouveau-née par exemple. L'effet « âge » pourrait également être masqué par les variations de typage de fibres qui se produisent avec l'âge des oiseaux. Il a en effet été montré que la proportion des fibres lentes oxydatives se réduisait avec l'âge dans le muscle gastrocnémien au profit des fibres rapides oxydo-glycolytiques (FOG) (Duchamp *et al.*, 1992). De plus, chez les canards âgés de 5 semaines, la typologie diffère fortement entre le pectoral et le gastrocnémien interne avec des fibres rapides dans le pectoral (85% FOG et 15% FG) et des fibres rapides et lentes dans le Gi (67% FOG 33% SO) (Duchamp, 1990). On pourrait alors proposer une gradation de l'expression des mitofusines selon les types de fibres musculaires chez l'oiseau (SO \geq FOG \gg FG). Il faut toutefois relativiser un peu ces résultats. En effet, les fibres de pectoral de canards âgés de 5 semaines présentent de fortes différences de taille (FOG 74 μm^2 vs FG 437 μm^2), tendant à équilibrer la contribution pondérale de chaque type de fibre pour une masse donnée de muscle pectoral. Il est cependant probable que du fait de la différence de contenu en mitochondries, les extraits mitochondriaux obtenus doivent être plus représentatifs des FOG que des FG dans le muscle pectoral. En l'absence d'étude de l'expression par type de fibres, il n'est pas possible pour l'instant de confirmer cette hypothèse.

3 - Variation des protéines de fusion avec l'exposition au froid

Lors d'une exposition d'une semaine à 4°C des canetons, l'expression des ARNm codant les Mfns 1 et 2 est fortement accrue dans le muscle pectoral (respectivement +150% et +34% ; $p < 0,05$). De façon similaire, chez la souris, une exposition aiguë de 48h à 4°C augmente l'expression des ARNm (x2) codant la Mfn2 (Soriano *et al.*, 2006). L'activité de frisson intense dans les premiers jours d'exposition au froid pourrait participer à une augmentation rapide de l'expression des mitofusines sur la base de l'influence positive de l'activité contractile (exercice) sur l'expression de ces protéines chez les mammifères (Cartoni *et al.*, 2005). Nos résultats chez le caneton indiquent que cet effet « froid » serait spécifique du pectoral puisque le muscle gastrocnémien interne montre au contraire une petite diminution de l'abondance relative des ARNm codant la Mfn1 sans variation

d'expression de la Mfn2. Cette différence entre muscles pourrait correspondre à une plus forte stimulation de l'activité contractile du muscle pectoral au froid pour le frisson thermique alors que ce muscle était jusque-là peu stimulé, contrairement au muscle gastrocnémien dont l'activité contractile était déjà fortement stimulée même à thermoneutralité pour la locomotion dès l'éclosion.

Nos résultats chez le caneton montrent que les variations d'abondance des transcrits de la Mfn2 suite au froid aigu n'étaient pas associées à des variations de niveau protéique renforçant de nouveau l'hypothèse d'une régulation post-transcriptionnelle. Alternativement la cinétique de variation des transcrits pourrait être plus rapide que celle de la protéine et il aurait peut-être fallu attendre quelques jours pour avoir des variations parallèles entre transcrits et protéines. En revanche l'abondance de la protéine OPA1 était clairement augmentée après une semaine d'exposition au froid (+52 %; $p < 0,05$). Aucune autre étude à notre connaissance n'a étudié les variations d'OPA1 en liaison avec le froid. Nos résultats indiquent que la régulation des différentes protéines de fusion peut ne pas être coordonnée lors de l'exposition aiguë au froid. La protéine OPA1 pourrait jouer un rôle particulier, peut-être plus précoce, dans l'organisation des réseaux mitochondriaux lors de l'exposition au froid. La protéine Mfn2 pourrait intervenir de façon plus tardive.

Après une exposition prolongée au froid (5 semaines), la stimulation de l'expression des ARNm des mitofusines ou de l'abondance de la protéine OPA1 dans le muscle pectoral s'estompe puisque leurs niveaux d'expression ont rejoint ceux des animaux élevés à thermoneutralité. Il n'est pas possible de comparer ce résultat avec la littérature puisqu'aucune autre étude n'a montré l'influence de l'exposition prolongée au froid sur l'expression des protéines de fusion. On peut rapprocher cette disparition de l'effet sur leur expression à la disparition du frisson thermique à ce stade. En effet, si le frisson thermique assure l'essentiel de la production de chaleur, il est progressivement remplacé par une NST et disparaît à partir de 4 à 5 semaines d'acclimatation à 4°C des canetons (Barré *et al.*, 1986b). On peut également imaginer que les variations de typage de fibres qui se produisent au froid, avec un maintien des fibres lentes oxydatives dans le muscle gastrocnémien, masquent en partie les variations d'expression par type de fibres musculaires si l'hypothèse d'une gradation de l'expression des mitofusines selon les fibres musculaires formulée précédemment est correcte. Alternativement, si les mitofusines interviennent effectivement dans l'organisation des réseaux mitochondriaux, il est possible que des variations de leur expression ne soient nécessaires qu'au moment de l'établissement de ces réseaux lors des variations brutales de l'énergétique cellulaire (Benard and Rossignol, 2008). L'augmentation rapide et transitoire des mitofusines au moins au niveau transcrit et d'OPA1 au niveau

protéique dans le muscle pectoral lors d'une exposition au froid indique une réponse aiguë associée à la thermogenèse de frisson déclenchée activement à ce stade. On peut penser que dès l'exposition au froid, l'augmentation de l'expression des mitofusines permettrait une réorganisation optimale des mitochondries. Une fois ce réseau constitué et efficace, l'expression des mitofusines reviendrait à son taux basal. La vérification de cette hypothèse sera l'objet de la partie 2 de l'étude 2.

4 - Mitofusines et mécanismes thermogènes

Comme nous venons de le discuter, nos résultats pourraient indiquer une relation entre le frisson thermique et l'expression des protéines de fusion sur la base d'une augmentation de l'expression des ARNm des protéines Mfn2 ainsi que de l'abondance de la protéine OPA1 après une exposition d'une semaine au froid, période pendant laquelle le frisson thermique est le principal mécanisme thermogène. Le développement tardif de la NST ne semble par contre pas être associé à une surexpression des protéines de fusion. Il reste à interpréter le(s) rôle(s) physiologique(s) d'une telle variation d'expression de ces protéines dans le muscle pectoral lors du frisson thermique et déterminer les mécanismes régulant ces variations d'expression. Si ces protéines participent effectivement chez les oiseaux comme chez les mammifères, à la modulation des phénomènes de fusion entre membranes externes des mitochondries (Benard and Rossignol, 2008), on peut imaginer qu'une augmentation de leur abondance dans le muscle pectoral de canetons exposés au froid contribue à augmenter l'aspect fusionné des mitochondries et la constitution de réseaux de mitochondries accolées ou filiformes. Cela pourrait notamment contribuer à la plasticité mitochondriale observée dans le muscle pectoral de manchots royaux exposés au froid subantarctique avec mitochondries plus nombreuses et accolées, et présentant des crêtes mitochondriales plus abondantes par rapport aux manchots élevés à thermoneutralité (Duchamp *et al.*, 1991). Si comme chez les mammifères (Olichon *et al.*, 2002), la protéine OPA1 aviaire est principalement exprimée sur la membrane interne et les crêtes mitochondriales et participe à des processus de fusion de ces membranes, elle pourrait intervenir dans la configuration des crêtes mitochondriales au froid, et de cette manière participer à la modulation du fonctionnement de la chaîne respiratoire. Sur un plan fonctionnel, cela pourrait correspondre à un fonctionnement plus coordonné des populations mitochondriales pour subvenir aux besoins en ATP lors du frisson thermique. Ce fonctionnement pourrait correspondre à l'hypothèse de fonctionnement coordonné des mitochondries IMF et SS (Skulachev, 2001) mais il faudrait confirmer que de tels réseaux

entre populations de mitochondries musculaires sont effectivement plus abondants au froid et contribuent à ce fonctionnement coordonné.

De plus, comme les mitofusines, et en particulier la Mfn2, peuvent également servir d'ancrage avec d'autres compartiments cellulaires comme le réticulum sarcoplasmique (Merkwirth and Langer, 2008), l'augmentation d'expression de la Mfn2 au froid pourrait contribuer à faciliter les interactions entre mitochondries et réticulum. Cela pourrait faciliter l'activation métabolique des mitochondries par le Ca^{2+} libéré du réticulum sarcoplasmique lors de la contraction musculaire. Enfin, on pourrait suggérer que la surexpression des mitofusines pourrait activer directement l'expression de certains gènes comme ceux codant pour les protéines de la chaîne respiratoire (Pich *et al.*, 2005), contribuant ainsi à l'augmentation des capacités bioénergétiques musculaires au froid. Les mécanismes d'une telle régulation restent à explorer. Pour appuyer ces hypothèses, on peut observer que la surexpression de la Mfn2 sur des modèles cellulaires améliore la capacité mitochondriale à produire de l'ATP et à oxyder du glucose, ce qui peut être associé à un taux de fusion plus élevé et une stimulation de la biogenèse mitochondriale, deux mécanismes activés par la Mfn2 (Benard *et al.*, 2010). L'exposition au froid représente donc une situation où l'augmentation potentielle de la fusion mitochondriale, suggérée par les variations d'abondance relative de certaines protéines de fusion, pourrait être associée à une activation des oxydations phosphorylantes mitochondriales. Dans la littérature, on trouve de multiples exemples où un défaut des oxydations phosphorylantes mitochondriales est en relation avec un défaut de fusion ou de fission (Benard and Rossignol, 2008). Nos résultats suggèrent donc des rôles similaires pour ces protéines de fusion entre les mammifères et les oiseaux.

VI - Conclusion

- **Cette étude a permis de montrer pour la première fois l'expression, chez le canard, d'homologues des mitofusines qui présentent une forte similitude de séquence nucléotidique et protéique avec les mitofusines de poulet et de mammifères.**
- **L'expression des ARNm de ces mitofusines diffère selon les tissus avec une prédominance de la Mfn2 dans le muscle squelettique.**
- **L'abondance relative de la Mfn2 semble varier selon le type de muscle avec une plus forte expression dans les muscles à forte tendance oxydative, mais elle ne diffère pas en fonction de la population**

mitochondriale (intermyofibrillaires ou subsarcolemmales) d'un même muscle.

- Il apparaît également que l'abondance relative des protéines de fusion ne varie pas significativement dans les premières semaines post-éclosion mais est fortement accrue par une exposition de courte durée (1 semaine) au froid pour OPA1. Si l'exposition au froid se prolonge, l'effet stimulateur disparaît.
- On peut donc suggérer que les protéines de fusion musculaires, pourraient jouer un rôle important dans la thermogenèse de frisson activée chez les endothermes exposés au froid, potentiellement en modulant la conformation des réseaux mitochondriaux ou les connections entre mitochondries et autres compartiments cellulaires, améliorant ainsi les capacités énergétiques musculaires afin de répondre au mieux aux besoins de l'organisme.

Etude 2

Etude 2

Mise en place des processus bioénergétiques au cours de la croissance au froid chez l'oiseau

Il ressort de l'étude 1 que des protéines de fusion analogues à celles des mammifères sont exprimées chez les oiseaux et que le niveau d'expression de ces protéines peut être modulé par de fortes contraintes métaboliques comme, par exemple, l'exposition au froid de jeunes oiseaux en croissance. Ces variations d'expression pourraient contribuer à une plasticité mitochondriale améliorant les capacités énergétiques musculaires afin de répondre au mieux aux besoins de l'organisme. Nous avons donc mené une étude cinétique de la mise en place des processus bioénergétiques mis en jeu lors de cette contrainte thermique, en liaison avec les variations de l'expression des protéines de fusion.

Cette étude a été réalisée chez deux espèces d'oiseaux : une espèce semi-nidicole, le manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*), et une espèce nidifuge, le canard de Barbarie (*Cairina moschata*). Le manchot Adélie est un modèle naturellement adapté à des températures extrêmement froides alors que le canard de Barbarie est un modèle de laboratoire qu'on peut artificiellement acclimater au froid. Le modèle « canard » nous permettra de développer des protocoles visant à séparer les effets de la croissance et du froid, ce qu'on ne peut pas faire chez le manchot Adélie qui grandit dans des zones polaires.

Partie 1 : Le manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*)

Article accepté pour publication le 30 Août 2013

American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology

Ontogeny of muscle bioenergetics in Adélie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*)

Anaïs Fongy, Caroline Romestaing, Coralie Blanc, Nicolas Lacoste-Garanger, Jean-Louis Rouanet, Mireille Raccurt and Claude Duchamp

Université de Lyon ; Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés ; Université Lyon 1 ; Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat ; Centre National de la Recherche Scientifique ; 6 rue Raphaël Dubois, 69622, Villeurbanne, France.

Running title: Muscle bioenergetics in growing Adélie penguin chicks

Corresponding Author : Pr Claude Duchamp ; Université de Lyon ; UMR5023 Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés ; Université Lyon 1 ; ENTPE ; CNRS ; 6 rue Raphaël Dubois, 69622 , Villeurbanne, France Tel : 00 33 4 7244 8138 - fax : 00 33 4 7243 1172 - email : claudeduchamp@univ-lyon1.fr

RESUME

L'ontogénèse des processus bioénergétiques propre au muscle pectoral a été étudiée chez les poussins de manchots Adélie lors de leur premier mois de croissance, mois suivant l'éclosion, et comparée à celle des adultes en utilisant à la fois des fibres perméabilisées et des mitochondries isolées. En réponse aux substrats énergétiques pyruvate/malate/succinate ou palmitoyl-carnitine, la respiration des fibres perméabilisées était fortement augmentée durant la croissance des poussins (X 3) mais aussi, plus tard, chez les adultes (X 1,4). Plusieurs marqueurs de l'activité oxydative des fibres musculaires (cytochrome oxydase, citrate synthase, hydroxy-acyl-CoA dehydrogénase) étaient augmentés d'un facteur 6 à un facteur 19 avec l'âge. Ces augmentations étaient associées à une forte augmentation du contenu en mitochondries intermyofibrillaire (IMF) et subsarcolemmale (SS) (3 à 5 fois) ainsi qu'à une augmentation des activités oxydatives (1,5 à 2,4 fois). La proportion relative des mitochondries IMF par rapport aux mitochondries SS augmentait avec l'âge des poussins mais surtout chez les adultes. Les différences d'activité oxydative entre les deux fractions de mitochondries étaient réduites chez les adultes comparés aux poussins après éclosion. L'extrapolation de la respiration mitochondriale à la respiration musculaire a révélé le même profil de résultats entre mitochondries isolées et fibres perméabilisées avec les substrats dérivés des glucides mais pas avec les substrats dérivés des lipides, suggérant ainsi une diffusion difficile des substrats lipidiques dans les fibres perméabilisées. Deux protéines de fusion immunoréactives, la Mitofusine 2 (Mfn2) et la protéine Optic Atrophy 1 (OPA1) ont été détectées par western blot sur les extraits de mitochondries et leur abondance relative augmentait avec l'âge. La respiration des fibres musculaires était positivement corrélée à l'abondance relative de la Mfn2 et d'OPA1. Ainsi, les résultats montraient, par deux techniques complémentaires, une forte augmentation des capacités oxydatives musculaires permettant probablement aux oiseaux de faire face à leur émancipation thermique, à leur croissance et au passage à la vie en mer lorsqu'ils deviennent adultes. L'augmentation concomitante de l'abondance des protéines de fusion mitochondriale suggère un rôle des réseaux mitochondriaux dans les processus bioénergétiques relatifs aux muscles squelettiques permettant aux manchots de supporter les contraintes environnementales extrêmes.

Mots clés : Croissance, fibres perméabilisées, mitochondries isolées, protéines de fusion, mitofusine

ABSTRACT

The ontogeny of pectoralis muscle bioenergetics was studied in growing Adélie penguin chicks during the first month after hatching and compared with adults using permeabilized fibers and isolated mitochondria. With pyruvate/malate/succinate or palmitoyl-carnitine as substrates, permeabilized fiber respiration markedly increased during chick growth (3-fold) and further rose in adults (1.4-fold). Several markers of muscle fiber oxidative activity (cytochrome oxidase, citrate synthase, hydroxyl-acyl-CoA dehydrogenase) increased 6-19 fold with age together with large rises in intermyofibrillar (IMF) and subsarcolemmal (SS) mitochondrial content (3-5 fold) and oxidative activities (1.5-2.4 fold). The proportion of IMF relative to SS mitochondria increased with chick age but markedly dropped in adults. Differences in oxidative activity between mitochondrial fractions were reduced in adults as compared with hatched chicks. Extrapolation of mitochondrial to muscle respirations revealed similar figures with isolated mitochondria and permeabilized fibers with carbohydrate-derived but not with lipid-derived substrates suggesting diffusion limitations of lipid substrates with permeabilized fibers. Two immunoreactive fusion proteins, Mitofusin 2 (Mfn2) and Optic Atrophy 1 (OPA1), were detected by western blots on mitochondrial extracts and their relative abundance increased with age. Muscle fiber respiration was positively related with Mfn2 and OPA1 relative abundance. Present data showed by two complementary techniques large ontogenic increases in muscle oxidative activity that may enable birds to face thermal emancipation and growth in childhood and marine life in adulthood. The concomitant rise in mitochondrial fusion protein abundance suggests a role of mitochondrial networks in the skeletal muscle processes of bioenergetics that enable penguins to overcome harsh environmental constraints.

Key words: Growth, permeabilized fibers, isolated mitochondria, fusion proteins, mitofusin

I - Introduction

Growing in the cold represents a major challenge for most polar endotherms as energy allocation for growth and development is impaired by excessive energy expenditure for thermoregulation. Regulatory heat production is thus classically associated with reduced growth rate (Ricklefs, 1979). In Polar Regions, endotherms face an additional constraint of temporal limitation as the summer period is rather short. This situation is particularly challenging for Adélie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*) that must rapidly grow, build up energy reserves, molt and develop efficient thermogenic mechanisms to succeed in their departure to sea within the short Antarctic summer (Bucher *et al.*, 1990; Raccurt *et al.*, 2008). Such rapid growth requires a maturation of tissue energetic processes able to sustain metabolic activity but this remains unexplored.

Among tissues, the rapid development of skeletal muscle bioenergetics may be of primary importance as skeletal muscle is the major tissue contributing to whole-body energy expenditure and regulatory thermogenesis in birds (Duchamp and Barré, 1993; Duchamp *et al.*, 1991; Olson, 1994; Olson, 2001) and is essential for locomotion by walking on land or swimming at sea in adulthood. Mitochondria provide most of the ATP required for metabolic muscle cell processes *via* oxidative phosphorylation and the rapid response of energy demanding skeletal muscles to metabolic challenges like growth, exercise or cold thermogenesis may depend on the plasticity of their mitochondria (Romanello and Sandri, 2012). Increased metabolic capacity has been documented in skeletal muscle mitochondria from cold-acclimated birds such as ducklings (Barré *et al.*, 1986b; Roussel *et al.*, 1998) or king penguins (Duchamp *et al.*, 1991; Talbot *et al.*, 2004). No study has so far addressed the ontogeny of muscle mitochondrial bioenergetics in growing penguins.

Two distinct populations of mitochondria exist in skeletal muscles on the basis of their sub cellular localization, morphology and biochemical properties and they constantly adapt to cellular needs. Subsarcolemmal (SS) mitochondria are located just underneath the sarcolemma and have a large, lamellar shape while intermyofibrillar (IMF) mitochondria are smaller, more compact, and inserted between contractile filaments (Barré *et al.*, 1989; Duchamp *et al.*, 1991; Hoppeler, 1986; Palmer *et al.*, 1977; Riva *et al.*, 2006). SS mitochondria exhibit lower enzymatic activities, rates of oxidative phosphorylation and ATP synthase activity than IMF mitochondria. It was thus postulated that SS mitochondria may provide energy for membrane-related events like signalling and transport of ions and other substrates, while IMF mitochondria supply ATP for the interaction between myofilaments leading to muscle contraction. In penguins or ducklings, SS mitochondria were more affected

by cold acclimation than the IMF ones with regards of their biochemical parameters of protein content (Duchamp *et al.*, 1991; Roussel *et al.*, 2000).

Mitochondria are dynamic organelles that adapt their morphology, number and activity by fusion and fission events to the energetic requirements of the cell (Otera and Mihara, 2011; Westermann, 2012). Fusion of isolated mitochondria induces the formation of an extended interconnected mitochondrial network, possibly enabling mitochondria to mix their contents within the network and preventing the local accumulation of defective/abnormal mitochondria which may be advantageous under conditions of high energy demand (Romanello and Sandri, 2012). Various proteins are known to be tightly implicated in these fusion processes. In mammals, mitofusin 1 (Mfn1), mitofusin 2 (Mfn2) and optic atrophy protein 1 (OPA1) are required for fusion of both outer and inner mitochondrial membranes (Griffin *et al.*, 2006). Perturbations in mitochondrial fusion processes by skeletal muscle-specific knockout for Mfn1 and Mfn2 in mice have been related to muscle loss and impairment in bioenergetics (Chen and Chan, 2010). Conversely, mitochondrial fission or fragmentation will segregate components of the mitochondrial network and excessive fission will generate isolated mitochondria with lower ATP production and lower energetic efficiency than fused ones (Otera and Mihara, 2011; Romanello and Sandri, 2012). Accordingly, tissues with high energy requirements (e.g., heart and skeletal muscle) have a predominantly fused mitochondrial network with tightly packed cristae. Fused mitochondria with intermixing of mitochondrial content may thus be preferred when optimal mitochondrial function and increased cellular metabolic capacity is needed such as during rapid growth but experimental data are lacking to support this point.

The aim of this work was to investigate the ontogeny of bioenergetics in skeletal muscle of growing Adélie penguin chicks and ascertain whether it may be related with modifications of intrinsic mitochondrial activity and modifications of mitochondrial fusion protein expression. To answer these questions, we measured the respiratory activity of either isolated muscle mitochondria or permeabilized muscle fibers preserving intact mitochondrial networks. Further, we aimed at characterizing the mitochondrial fusion proteins expressed in Adélie penguin muscles and investigating whether their expression would be correlated with muscle respiratory activity.

II - Materials and Methods

Ethical approval for all procedures was granted by the ethics committee of the French Ethic Committee of the Institut Polaire Paul Emile-Victor (IPEV) and by the Polar Environment Committee of the Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF). Our experiments conformed to the Code of Ethics of Animal Experimentation in the Antarctic.

1 - Animals

Experiments were conducted in Antarctica at French Research Station Dumont D'Urville, Adélie Land (66°40'S – 140°00E) during two summer campaigns. The Adélie penguin colony of Pointe Geologie archipelago is composed of nearly 34,000 pairs of breeding birds (*Pygoscelis adeliae*) every year (Jenouvrier *et al.*, 2006). A total number of 62 birds were biopsied to perform the experiments and separated according to their age. Chicks were either 1-, 7-, 15- or 30-days old (D1, D7, D15, D30; n = 5, 16, 15 and 8, respectively). These groups were defined according to Adélie penguin biology. After hatching, chicks are protected against climatic hazards by the brood pouch of their incubating parent. This protection occurs until their body size prevents them to be completely covered by the brood pouch. Chicks are thus progressively exposed to harsh climatic conditions in parallel with progressive down growth. Thermal emancipation occurs around 15 days and by 30 days of age, chicks that ensure their thermal autonomy can group into chick crèches enabling both parents to fish at sea. We thus chose five different ages corresponding to different developing steps from hatching time (D1), an immature stage, day 7 (D7), a stage characterized by parental thermal protection and down growth, day 15 (D15), a stage corresponding to the gradual acquisition of thermal emancipation and more frequent standing outside the brood pouch, and day 30 (D30) when chicks are continuously exposed to cold environment and group in crèches. Chick age was determined from nest marks at hatching and daily monitoring on the colony. Adélie penguins mostly lay two eggs and the smallest chick does not usually survive, we therefore only used the second chicks in our experiments to minimize the impact of our experiments on breeding success. Chicks were compared to fully mature adult penguins (Adult, n=18) able to face cold water immersion and endurance swimming exercise at sea. Penguins were weighed before experiments.

2 - Experimental design

All the experiments were performed on superficial pectoralis muscle. Biopsies were surgically performed under general isoflurane anesthesia. A small sample of muscle was

immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until molecular analysis. The remainder of the biopsy was used immediately for analysis of bioenergetics.

3 - Permeabilized muscle fiber preparation and respiration

Muscle fiber bioenergetics was investigated *in vitro* in 20 animals belonging to 4 groups: D7 (n=8), D15 (n=8), D30 (n=2) and adult (n=10) using a method adapted from those described previously by Kuznetsov et al. and Picard et al. (Kuznetsov *et al.*, 2008; Picard *et al.*, 2008). Muscle biopsy (50 mg) was immersed in ice-cold isolation solution containing K_2EGTA 7.23 mM, CaK_2EGTA 2.77 mM, Imidazole 20 mM, DTT 0.5 mM, Taurine 20 mM, ATP 5.7 mM, Phosphocreatine 15 mM, MgCl_2 6.5 mM, K-MES 60 mM, pH 7.2 and muscle strips were dissected to separate muscle fibers. Fiber bundles were transferred in isolation solution containing saponin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and mixed gently at 4°C for 30 min. Then, permeabilized fibers were washed 3 times by gentle mixing for 10 min at 4°C in the isolation solution without ATP and phosphocreatine but with KH_2PO_4 10 mM and free fatty acid BSA (5 mg/mL). Muscle fibers were weighed and their respiration was monitored with an Oroboros® oxymeter at 38°C , the core temperature in penguins, in a respiration buffer (K-MES 100 mM, KCL 30 mM, KH_2PO_4 10 mM, MgCl_2 5 mM, EGTA 1 mM, fatty acid-free bovine serum albumin (FAF-BSA) 0.5%) using various substrates or inhibitors (Pyruvate/Malate (PM) 5/2.5 mM, Succinate 5 mM, Palmitoyl-carnitine/Malate (PCM) 40 $\mu\text{M}/2.5$ mM). Phosphorylating state of respiration was determined in the presence of ADP (1 mM). Non phosphorylating state was obtained by addition of oligomycin (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The integrity of mitochondria within permeabilized fibers was systematically verified by the absence of stimulation of respiration by cytochrome c (10 μM) addition. Because of the late arrival on field of the Oroboros oxymeter, measurements could not be measured immediately at hatching but only from D7.

4 - Mitochondrial respiration and isolation

Pectoralis muscle intermyofibrillar (IMF) and subsarcolemmal (SS) mitochondria were isolated following published protocols from our group (Barré *et al.*, 1989; Duchamp *et al.*, 1991; Roussel *et al.*, 1998), involving potter homogenization, partial protease digestion, and differential centrifugations in an ice-cold isolation buffer (100 mM sucrose, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-base, pH 7.4) with all steps performed at 4°C . Final pellets were re-suspended in 150-400 μL of storage buffer (250 mM sucrose, 1 mM EGTA, and 20 mM Tris base, pH 7.4). Protein concentration of final mitochondrial suspensions was determined by the Biuret method using bovine serum albumin as standard. Oxygen uptake was determined

at 38°C in a respiration buffer (120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 3 mM Hepes, 1 mM EGTA, 0.3% FAF-BSA, pH 7.4) with a Clark oxygen electrode (Rank Brother LTD). Respiratory substrates were 5 mM pyruvate plus 2.5 mM malate or 30 µM palmitoyl-carnitine plus 1 mM malate. The phosphorylating respiration rate was initiated by the addition of 500 µM ADP. The basal non-phosphorylating respiration rate was obtained by the addition of 1.25 µg.mL⁻¹ oligomycin. Cytochrome-c oxidase (COX) activity was measured polarographically as described previously (Barré *et al.*, 1987a; Barré *et al.*, 1989; Duchamp *et al.*, 1991) on tissue homogenates, isolated mitochondria and aliquots that were sampled at different steps of the isolation procedure to estimate mitochondrial isolation recovery (Duchamp *et al.*, 1991). Briefly, the COX activities of the two fractions obtained after the first centrifugation of muscle homogenate, the supernatant containing SS mitochondria and the pellet containing IMF mitochondria, were used to calculate the mitochondrial recovery within the SS versus IMF compartments.

The activities of citrate synthase (CS; E.C. 4.1.3.7) and 3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase (HAD; E.C. 1.1.1.35) were used respectively as indicators of the capacity for aerobic flux through the tricarboxylic acid cycle and for flux through the β-oxidation pathway in the catabolism of fatty acids and determined by fluorimetric techniques (Olson, 2001). Briefly, activities were determined on muscle samples (10 mg) that were weighed and immediately homogenized in 0.3M phosphate buffer containing 0.05% bovine serum albumin (pH 7.7) with a glass Potter-Elvehjem homogenizer. Homogenates were frozen and thawed three times to disrupt the mitochondrial membrane. Enzyme activities were determined at 25°C. Enzyme activities were expressed as µmoles of substrate per minute per gram wet mass.

5 - Western blot analysis

Mitochondrial extracts were prepared from frozen pectoralis muscles that were homogenized in a glass Potter homogenizer in 5 mL of sucrose buffer (sucrose 100 mM, KCL 50 mM, EDTA 5 mM, Tris-base 50 mM, pH 7.4 + protease inhibitor cocktail (10 µL/mL, SIGMA P8340)). Cellular membranes were eliminated by two centrifugations (800 g; 10 min; 4°C). Mitochondria were pelleted by two high speed centrifugation (10000 g; 10 min; 4°C) and then resuspended in 70 µL of Ripa buffer containing protease inhibitor cocktail (10 µL/mL). Mitochondrial protein concentration was determined by bicinchoninic acid assay (Pierce, Rockford, IL) and 50 µg of denatured protein were loaded for western blotting. All samples were separated by electrophoresis on 7.5% SDS-polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes. Monoclonal antibody was used to detect optic atrophy 1

protein (OPA1) (1:1000; 612606, BD Transduction Laboratories). Polyclonal antibody was used to detect mitofusin 2 protein (Mfn2) (1:250; ab50838, Abcam). Preliminary data showed that these antibodies developed against mouse proteins detected proteins of similar sizes in penguin mitochondrial extracts. Ponceau staining was used to ensure consistent loading and transferring. Blots were revealed using the ECL chemiluminescence method (ThermoScientific). Densitometric analysis of specific bands on immunoblots was performed by Scion software (Scion Corporation, USA).

6 - Statistical analysis

All data presented are means \pm SE and were analyzed with Statview 5.0 software (Abacus Concept, Berkeley). Results were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by *post hoc* test (Fisher). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

III - Results

1 - Body growth

Despite harsh climatic conditions encountered in the colony during Antarctic summer, chick growth was remarkably rapid since body weight increased more than 25 fold during the first month of life (Table 1).

Table 1. Body weight, tissue and mitochondrial enzymatic activities and mitochondrial protein content in pectoralis muscle of Adélie penguin chicks or adults.

		Chicks				Adults
		0-1 day	7 days	15 days	30 days	
Body weight, kg		0.094 ± 0.004 <i>a</i>	0.39 ± 0.05 <i>b</i>	0.86 ± 0.13 <i>c</i>	2.62 ± 0.29 <i>d</i>	5.02 ± 0.13 <i>e</i>
Mitochondrial yield, mg/g	IMF	0.54 ± 0.07 <i>a</i>	1.7 ± 0.2 <i>b</i>	2.4 ± 0.4 <i>bc</i>	3.0 ± 0.3 <i>c</i>	4.4 ± 0.2 <i>a</i>
	SS	0.25 ± 0.03 <i>a</i>	0.5 ± 0.1 <i>b</i>	0.7 ± 0.1 <i>b</i>	0.7 ± 0.1 <i>b</i>	2.0 ± 0.2 <i>c</i>
Homogenate	COX, $\mu\text{Atom O}/(\text{min} \times \text{g tissue})^{-1}$	8.4 ± 0.2 <i>a</i>	20.7 ± 1.9 <i>b</i>	25.2 ± 1.8 <i>bc</i>	27.3 ± 1.6 <i>c</i>	46.9 ± 1.8 <i>d</i>
	CS, $\mu\text{mole}/(\text{min} \times \text{g tissue})^{-1}$	7.6 ± 0.4 <i>a</i>	nd	65 ± 3 <i>b</i>	nd	147 ± 5 <i>c</i>
	HAD, $\mu\text{mole}/(\text{min} \times \text{g tissue})^{-1}$	4.5 ± 0.2 <i>a</i>	nd	24 ± 2 <i>b</i>	nd	58 ± 1 <i>c</i>
Mitochondria	COX, $\mu\text{Atom O}/(\text{min} \times \text{mg protein})^{-1}$					
	IMF	0.90 ± 0.07 <i>a</i>	1.16 ± 0.05 <i>b</i>	1.15 ± 0.11 <i>b</i>	1.28 ± 0.04 <i>bc</i>	1.35 ± 0.04 <i>c</i>
	SS	0.45 ± 0.02 <i>a</i>	0.49 ± 0.04 <i>a</i>	0.62 ± 0.05 <i>b</i>	0.64 ± 0.06 <i>b</i>	1.09 ± 0.05 <i>c</i>
Mitochondrial recovery, %	IMF	6.8 ± 0.8 <i>a</i>	10.4 ± 1.0 <i>a</i>	13.1 ± 2.5 <i>b</i>	16.3 ± 2.1 <i>b</i>	17.5 ± 1.8 <i>b</i>
	SS	12.6 ± 1.6 <i>a</i>	14.1 ± 1.6 <i>b</i>	22.5 ± 3.5 <i>b</i>	22.4 ± 2.0 <i>b</i>	22.1 ± 1.8 <i>b</i>
Mitochondrial protein content, mg/g tissue						
	IMF	7.9 ± 0.5 <i>a</i>	16.5 ± 1.1 <i>b</i>	19.4 ± 1.2 <i>b</i>	18.9 ± 1.1 <i>b</i>	26.5 ± 1.9 <i>c</i>
	SS	2.0 ± 0.1 <i>a</i>	3.7 ± 0.4 <i>b</i>	3.1 ± 0.3 <i>b</i>	3.0 ± 0.2 <i>b</i>	9.0 ± 0.3 <i>c</i>
	IMF/SS ratio	3.9 ± 0.2 <i>a</i>	4.7 ± 0.5 <i>ab</i>	6.5 ± 0.6 <i>bc</i>	6.4 ± 0.5 <i>c</i>	2.9 ± 0.2 <i>d</i>

COX, cytochrome *c* oxidase. CS, citrate synthase. HAD, 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase. IMF, intermyofibrillar. SS, subsarcolemmal mitochondria. Mitochondrial yield was calculated from protein concentrations in final mitochondrial suspension and muscle mass. Muscle mitochondrial content was calculated from mitochondrial yields and extraction recoveries. Data are means ± SE calculated from n = 5 (0-1 day old), n = 8-16 (7-days old), n = 7-15 (15-days old), n = 6-8 (30-days old) and n = 11-18 in adults. For CS and HAD activities, n were 4, 4 and 5 in 0-1-day-old, 15-days-old and adult birds, respectively. nd, not determined. For a given parameter, mean values with different letters were significantly different at $p < 0.05$.

2 - Permeabilized muscle fiber respiration rates

The ontogeny of muscle bioenergetics was first investigated by measuring the oxygen consumption of permeabilized muscle fibers at different ages. Figure 1 reports fiber respiration using either carbohydrate (Figure 1A) or lipid-derived substrates (Figure 1B). When energized with pyruvate/malate/succinate (PMS), a standard carbohydrate substrate that provides electrons to complex I+II of the respiratory chain, fibers exhibited a higher respiratory activity (two fold) than when providing electrons to the same complexes, but with a donor originating from lipid metabolism (palmitoyl-L-carnitine/malate (PCM)). During chick growth, respiratory activity markedly increased after D15 (state 3: +164%; state 4: +151%). Fibers from adult birds showed the highest respiration rate being 3-fold higher than at D15. Phosphorylating respiration rate was always higher than nonphosphorylating respiration although the difference between both rates was smaller than expected (+40-50%, $p < 0.05$) indicating a small respiratory control ratio. This low ratio with pyruvate/malate/succinate appeared to be based on a high stimulatory effect of succinate addition on nonphosphorylating state while no major stimulation of phosphorylating state was observed. Respiration rates with pyruvate/malate only (state 2) were much smaller than rates measured when succinate was added (Figure 1A). Respiration with ascorbate/TMPD, a substrate of cytochrome *c* oxidase (COX), increased from D15 (Figure 1C) and was 5-fold higher in adult fibers than at D7 ($p < 0.05$), suggesting a rise in the oxidative potential and mitochondrial abundance within fibers.

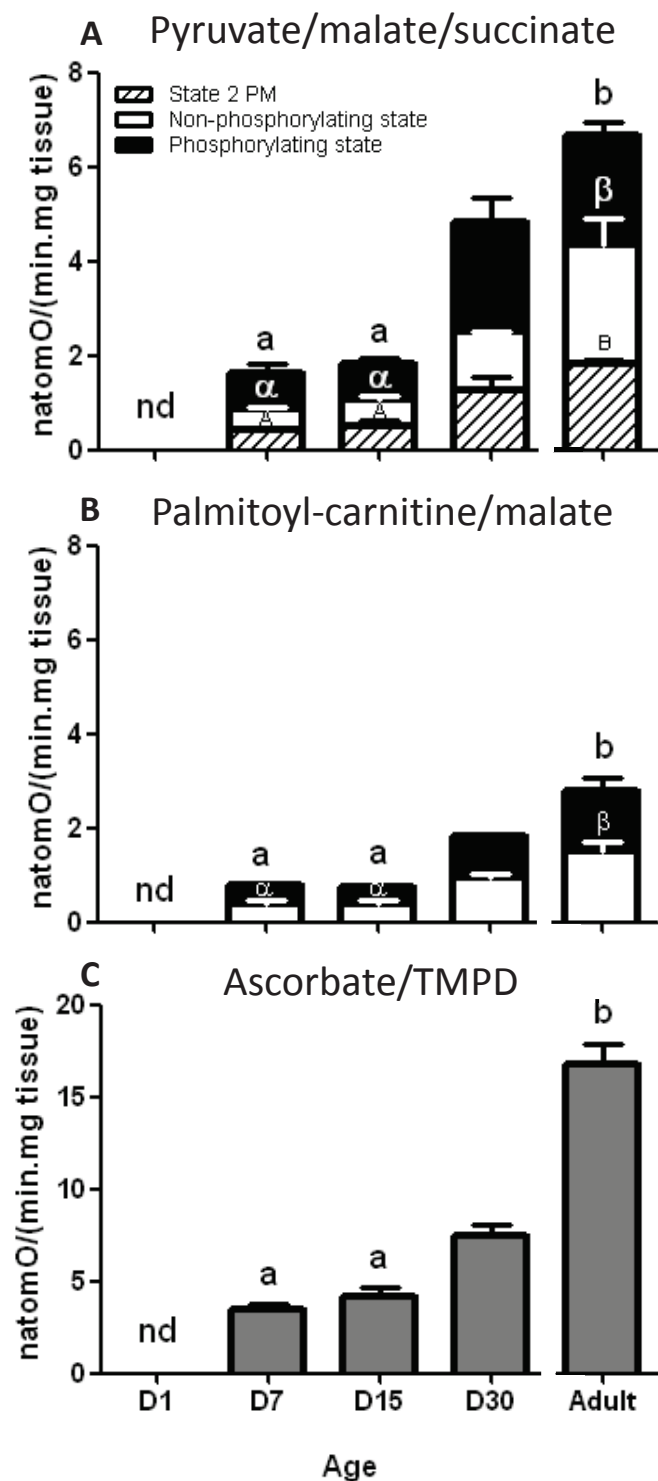


Figure 1. Respiration rates of permeabilized muscle fibers from pectoralis muscle of growing Adélie penguin chicks from 7 to 30 days old and in adults. Fiber mitochondria were energized with either: (A) 5 mM pyruvate, 2.5 mM malate and 5 mM succinate (PMS) or (B) 40 μ M palmitoyl-L-carnitine and 2.5 mM malate (PCM). Phosphorylating respiration was initiated with 1 mM ADP. Non-phosphorylating respiration was obtained by addition of 1.25 μ g.mL⁻¹ oligomycin. The respiratory rate measured with pyruvate/malate as substrates before addition of succinate is also shown (state 2 PM). (C) 2.5 mM ascorbate, 0.25 mM TMPD and 2.5 μ M FCCP. Data are means \pm SE; n=8 (D7 and D15); n=2 (D30); n=10 (Adult); nd, not determined. Data with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$.

3 - Tissue mitochondrial protein content and COX activity

In growing chicks, the protein yield of isolated mitochondria per gram pectoral muscle markedly increased with age in both muscle mitochondrial subpopulations (Table 1). Subsarcolemmal (SS) mitochondria protein yield increased between D1 and D7 (+108%; $p < 0.05$), remained stable until D30 and then rose again between D30 and Adult (+200%; $p < 0.05$). Intermyo-fibrillar (IMF) mitochondria protein yield increased to a larger extent between D1 and D7 (+220%; $p < 0.05$) than between D7 and D30 (+73%; $p < 0.05$) and between D30 and Adults (+46%; $p < 0.05$). Altogether, both the SS (8-fold) and IMF (8.2-fold) mitochondrial yield per g muscle markedly increased from hatching to adulthood. The increase in mitochondrial yield with age was associated with a large rise in COX activity of muscle homogenates (Table 1) between D1 and D7 (+146%; $p < 0.05$) and a smaller rise until D30 (+32% vs D7; +227% vs D1). COX activity was further increased in adult pectoralis muscles (+458% vs D1; +72% vs D30; $p < 0.05$). Changes in COX activity occurred in parallel with striking rises in CS and HAD activities. CS activity increased 8.7-fold between hatching and 15-days of age ($p < 0.05$) and then more than doubled between 15 days and adults. CS activity in adult pectoralis muscle was 19-fold higher than in newly hatched chicks. HAD activity increased 8.7-fold between hatching and 15-days of age ($p < 0.05$) and then doubled between 15 days and adults. HAD activity in adult pectoralis muscle was 13-fold higher than at hatching.

In isolated mitochondria, COX activity was twice as high in the IMF as in the SS fraction in chick pectoralis muscle (e.g. 0.9 ± 0.07 vs 0.45 ± 0.02 $\mu\text{atom O} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg protein})^{-1}$ at hatching in IMF and SS mitochondria, respectively) but the difference was much less marked in adult muscle (1.35 ± 0.04 vs 1.09 ± 0.05 $\mu\text{atom O} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg protein})^{-1}$ in IMF and SS mitochondria, respectively). Apparent mitochondrial COX activity rose with increasing age in the isolates but this could reflect in part a greater mitochondrial purity in the isolates with increasing age. COX activity was used to estimate mitochondrial isolation recovery that varied with age, ranging between 6 to 25% for the IMF fraction and between 12 to 23% for the SS fraction. Taking isolation recoveries and mitochondrial yields into account, tissue mitochondrial content was calculated. Chick growth was associated with an increase in the mitochondrial content of both muscle fractions but the rise mainly occurred during the first week and mainly affected the IMF fraction (Table 1). This led to a gradual increase in the proportion of the IMF fraction in pectoralis muscle with an IMF/SS ratio doubling (+164%) between hatching and 1 month of age. In adults, the mitochondrial content of both fractions was further increased but this rise affected more the SS (+200% vs D30, $p < 0.05$) than the

IMF (+40% vs D30) fraction. Consequently the IMF/SS ratio markedly dropped in adult pectoralis muscles and the SS fraction accounted for one fourth of total pectoralis muscle mitochondria.

4 - Mitochondrial respiration rates

Figure 2 shows the mitochondrial respiration rates measured with either carbohydrate (PM) or lipid-derived (PCM) substrates. With both substrates, the respiration rate of IMF mitochondria was higher than that of SS mitochondria but the differences between populations were reduced in adults as compared with hatched chicks (e.g. phosphorylating rate of IMF with PM was 3.8-fold higher than that of SS at hatching but only 2.1 higher in adults, Figure 2A & 2B). In both populations phosphorylating respiration rate was always higher (10-fold in IMF and 6-fold in SS) than nonphosphorylating rate ($p < 0.05$) in a respiration buffer rich in FAF-BSA (0.3%). In IMF mitochondria, except at D7 with PM (Figure 2A), nonphosphorylating respiration increased ($p < 0.05$) from D15 and respiration rates at D30 were similar to those attained in adults that were 81% (PM, Figure 2A) and 57% (PCM, Figure 2C) higher than at hatching ($p < 0.05$). Phosphorylating respiration of IMF mitochondria followed a similar ontogenic profile with both substrates, with a transient rise at D7 and then a marked increase from D15. The respiration rates attained in adults were 74% (PM, Figure 2A) and 120% (PCM, Figure 2C) higher than at hatching ($p < 0.05$). Respiration of SS mitochondria followed a different ontogenic profile. With both substrates (Figure 2B and 2D), nonphosphorylating respiration decreased during the first 2 weeks post-hatching and then gradually increased but the respiration rate in adults did not exceed that measured at hatching. Phosphorylating respiration of SS mitochondria gradually increased with lipid-derived substrates (Figure 2D) during the first month post-hatching (+76% between D1 and D30; $p < 0.05$) while there was a non-significant trend with carbohydrate substrates. With both substrates, the phosphorylating respiration rates of SS mitochondria were markedly increased in adults being nearly doubled as compared with hatching.

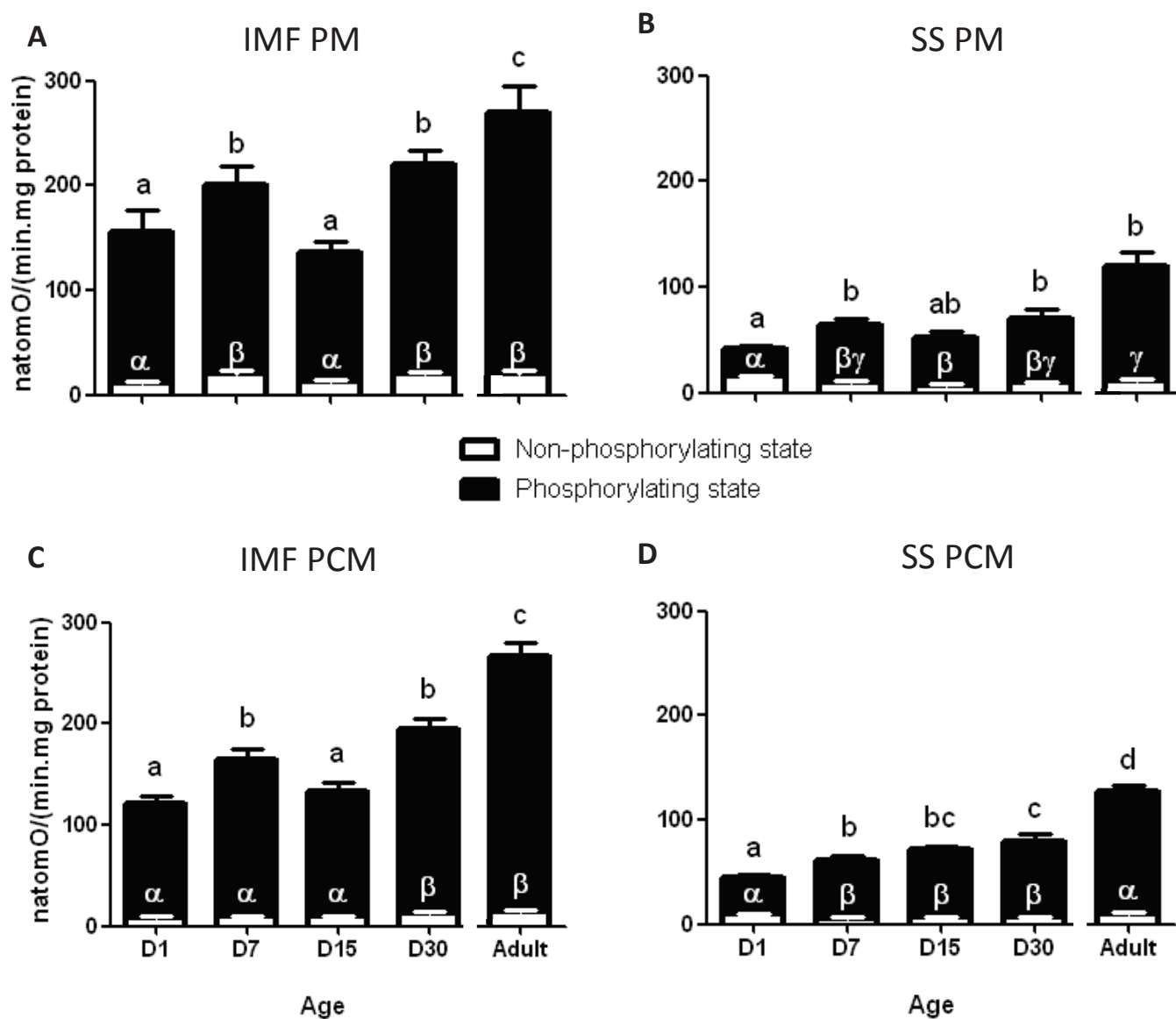


Figure 2. Respiration rates of intermyofibrillar mitochondria (IMF) (A, C) and subsarcolemmal mitochondria (SS) (B, D) isolated from pectoralis muscle of growing Adélie penguin chicks from 1 to 30 days old and adults. Mitochondria were energized with either (A, B) 5 mM pyruvate, 2.5 mM malate (PM) or (C, D) 40 μ M palmitoyl-L-carnitine and 2.5 mM malate (PCM). Phosphorylating respiration was stimulated with 1 mM ADP. Non-phosphorylating respiration was obtained by addition of 1.25 μ g.mL⁻¹ oligomycin. Data are means \pm SE; n=5 (D1); n=8 (D7); n=7 (D15); n=6 (D30); n=11 (Adult). Data with different superscript letters are significantly different at p<0.05.

5 - Extrapolation of mitochondrial to pectoral muscle fiber respiration

When mitochondrial respiration was extrapolated to pectoralis muscle taking into account both mitochondrial respiration (Figure 2) and muscle total (IMF+SS) mitochondrial content (Table 1), an ontogenic pattern closely similar to that observed with permeabilized fibers was found (Figure 3). With a carbohydrate substrate, respiration rate increased between D1 and D7 (phosphorylating: +168%; non phosphorylating: +158%; $p < 0.05$), remained stable until D15 and then increased again between D15 and D30 and between D30 and Adult (respectively phosphorylating: +52% and +80%; non phosphorylating: +17% and +75%; $p < 0.05$). With a lipid derived substrate, phosphorylating respiration increased between D1 and D7 (+131%), between D7 and D15 (+12%), and then between D15 and D30 and D30 and adult (respectively +34% and +90%). The phosphorylating respirations calculated in this way (Figure 3) were in the same order of magnitude as those measured with permeabilized fibers (Figure 1) with carbohydrate-derived substrates but not with a lipid-derived substrate. With palmitoyl-carnitine, indeed, extrapolated respiratory rates exceeded fiber data by a factor 2-2.5. With both substrates, extrapolated nonphosphorylating respirations were markedly lower than those of permeabilized fibers, indicating a much better coupling state of isolated mitochondria.

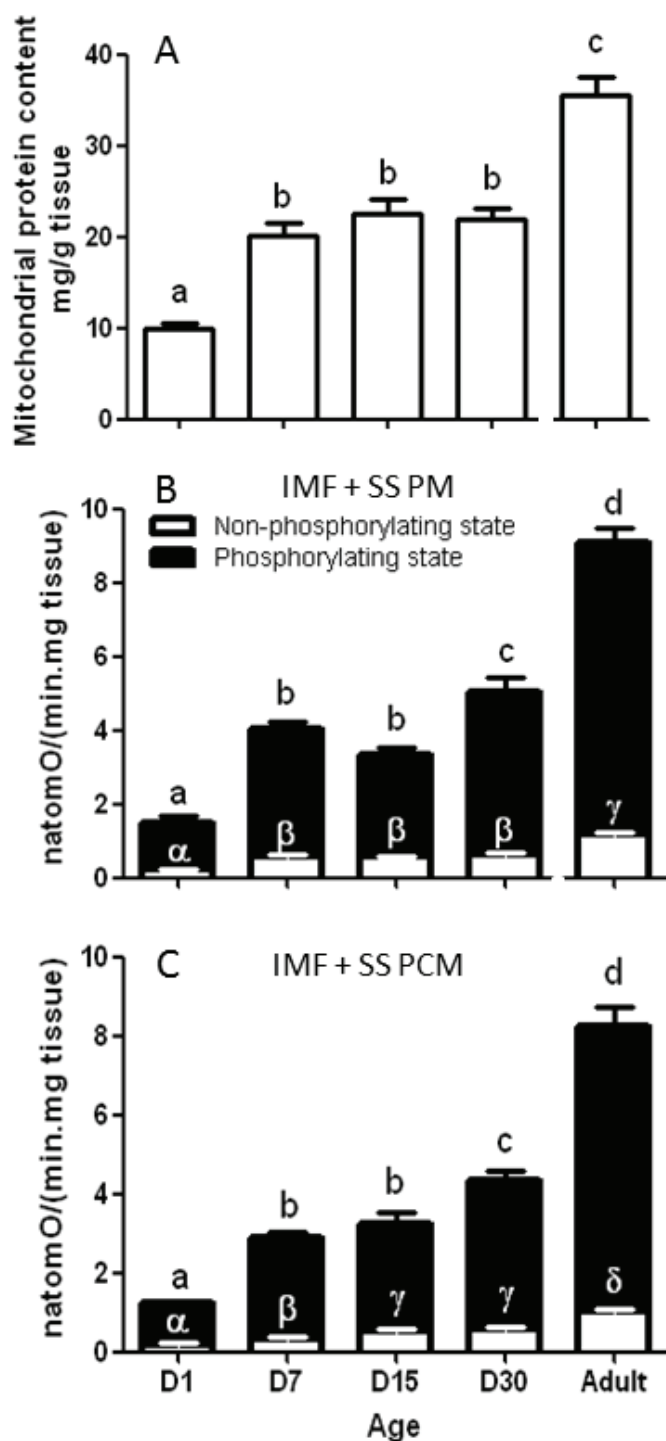


Figure 3. Muscle content and respiration rates of total pectoralis muscle mitochondria (IMF+SS) in growing Adélie penguin chicks from 1 to 30 days old and adults. Data were calculated from mitochondrial yields (A) and recoveries (Table 1). Mitochondria were energized with either (B) 5 mM pyruvate and 2.5 mM malate (PM) or (C) 40 μ M palmitoyl-L-carnitine and 2.5 mM malate (PCM). Phosphorylating respiration was stimulated with 1 mM ADP. Non-phosphorylating respiration was obtained by addition of 1.25 μ g.mL⁻¹ oligomycin. Data are means \pm SE; n=5 (D1); n=8 (D7); n=7 (D15); n=6 (D30); n=11 (Adult). Data with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$.

6 - Expression of fusion proteins in growing chicks and adults

Two immunoreactive mitochondrial fusion proteins, mitofusin 2 protein (Mfn2) and optic atrophy 1 protein (OPA1), were detected by western-blots in penguin muscle mitochondria (Figure 4). Mfn2 penguin analog appeared as a duplicated band around 86

kDa. The relative abundance of both bands decreased between D1 and D7 (-51%; $p < 0.05$) then increased back to the initial level until D30 (+125% between D7 and D30; $p < 0.05$) and further rose between D30 and Adult (+48%; $p < 0.05$). The relative abundance of Mfn2 bands was therefore 73% higher in muscle mitochondria from adult penguins than in those at hatching. OPA1 penguin analogs appeared as 4 to 5 bands around 90-110 kDa. The relative abundance of all bands (without discriminating individuals bands) was measured and data showed a slight rise (+30%) during the first month of growth and a further increase in adults (+27%; $p < 0.05$). The overall relative abundance of all OPA1 bands was therefore 90% higher in muscle mitochondria from adult penguins than in those at hatching. Homogeneity of protein gel loading was assessed by ponceau staining and the relative mean intensity of each lane was not significantly different between ages (Figure 4).

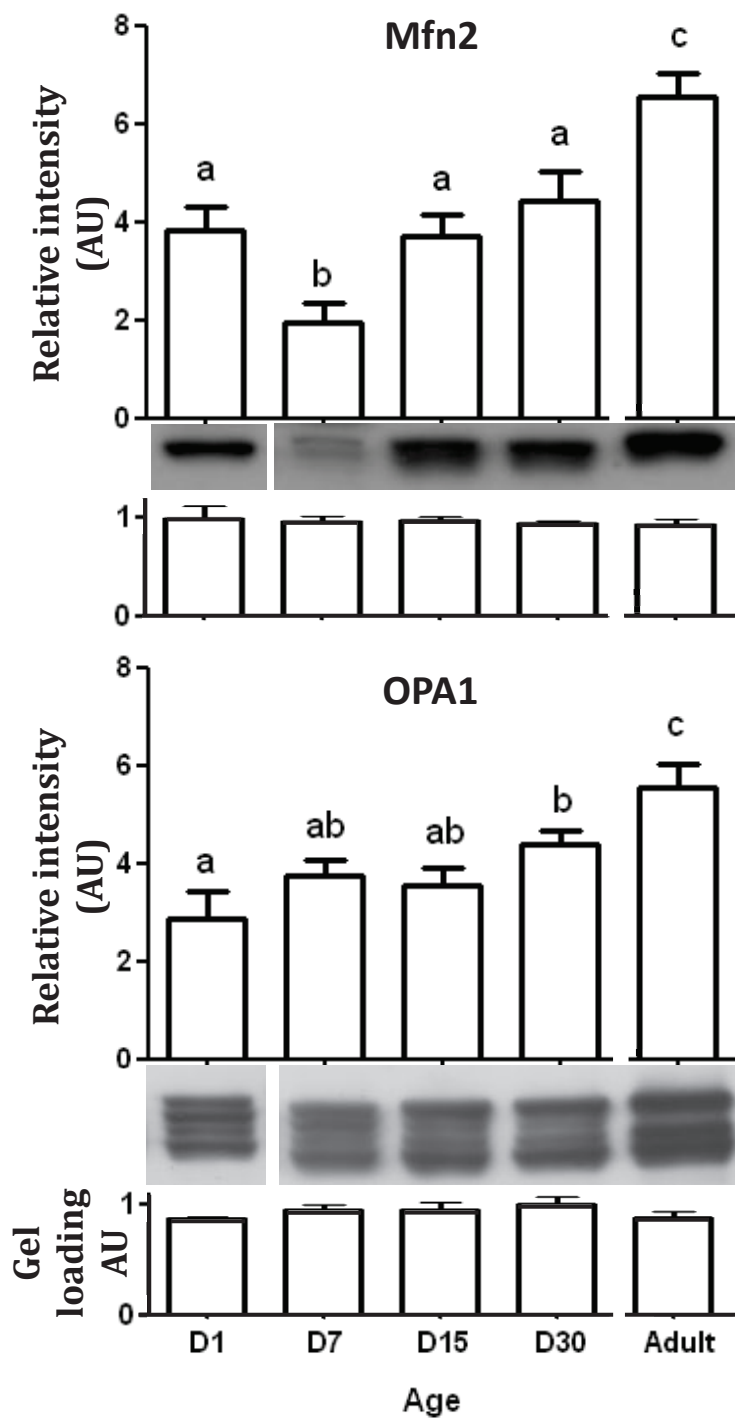


Figure 4. Relative abundance of immunoreactive mitofusine 2 protein (Mfn2 ; 86 kDa) and optic atrophy 1 protein (OPA1 ; 90-110 kDa) analyzed by western-blot in mitochondria isolated from growing chicks from 1 to 30 days old and adults. Gel loading was assessed by ponceau staining and the relative mean intensity of each lane is presented under the blots. Data are means \pm s.e.m.; $n=3$ (D1) and $n=5$ (D7, D15, D30 and Adult). Data with different superscript letters are significantly different at $p<0.05$. Noncontiguous lanes of the same gel were rearranged in the appropriate ontogenic order.

7 - Correlation between respiratory activity of muscle fibers and fusion protein relative abundance in muscle mitochondria

As shown in Figure 5, muscle fiber phosphorylating respiratory activity with a carbohydrate substrate was significantly related with the relative abundance of either Mfn2 (n=11; $R^2=0.76$; $p<0.05$) or OPA1 (n=11; $R^2=0.59$; $p<0.05$) penguin analogs. This suggested that the degree of expression of the penguin analogs of these two fusion proteins in pectoral muscle may play a role in the energetic activity of permeabilized muscle fibers i.e. an experimental model preserving the integrity of mitochondrial networks.

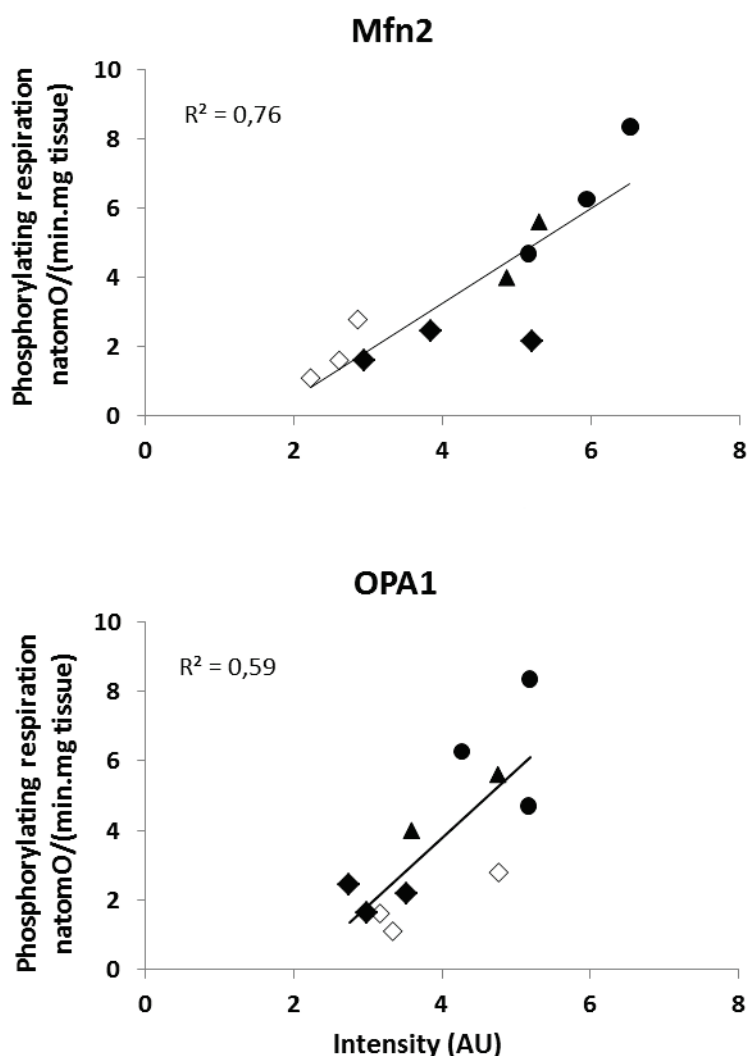


Figure 5. Correlation between respiratory activity of muscle fibers and the relative abundance of immunoreactive mitochondrial Mfn2 and OPA1 in growing chicks from 7 to 30 days old and adults. Analysis was restricted to birds where both respiration and relative protein abundance were determined (n=11; \diamond D7; \blacklozenge D15; \blacktriangle D30; \bullet Adult; $p<0.05$). Correlation was significant in both cases ($p<0.05$).

IV - Discussion

The present study showed for the first time the ontogeny in muscle bioenergetics in growing Adélie chicks using permeabilized muscle fibers and isolated mitochondria. Data underlined the marked increase in skeletal muscle oxidative activity from hatching to adulthood, the differential regulation of mitochondrial muscle fractions and the parallel rise in mitochondrial fusion protein expression.

1 - Comparison of permeabilized fibers and isolated mitochondria

Muscle bioenergetics was investigated using two complementary approaches, permeabilized myofibres, where the sarcolemme is selectively permeabilized leaving the mitochondrial networks intact within their native cytoarchitectural environment (Kuznetsov *et al.*, 2008; Saks *et al.*, 1991), and isolated mitochondria, where organelles are extracted by mechanical homogenization and differential centrifugations. Both approaches differ in the morphological aspects of mitochondria that present either branched elongated structures of heterogeneous size and shape in intact muscle fibers (Ogata and Yamasaki, 1997) or quasi-spherical units of relatively homogeneous size and shape when isolated (Barré *et al.*, 1989; Picard *et al.*, 2011). Recovery was low with isolated mitochondria but within the range of published data in penguin muscle (Duchamp *et al.*, 1991). Low recovery in newly-hatched chicks might potentially rely on small fibers more difficult to homogenize and to more fragile organelles possibly lost during the isolation process. Both methods showed similar ontogenic changes in Adélie penguin pectoralis muscle with clear increases in respiratory activity and COX activity with age. Tissue state 3 respiratory capacity measured in permeabilized myofibers (Figure 1) increased to a greater extent than biochemically measured COX activity in tissue homogenates (Table 1), as shown by the higher phosphorylating state with pyruvate/malate/ascorbate to COX ratio in adults than at D7 (0.14 ± 0.02 vs 0.08 ± 0.01), supporting the notion of increased respiratory capacity per mitochondrion during penguin growth and development. Fiber respirations compared with rates extrapolated from mitochondrial data taking recovery into account (Figure 1 and 3) with substrates derived from carbohydrates. However, with more complex substrates such as palmitoyl-carnitine or ascorbate-TMPD, higher respirations were obtained with isolated mitochondria than with permeabilized fibers as already observed by others using ascorbate-TMPD in rats (Picard *et al.*, 2011). From differences between both techniques, it was postulated that the isolation-induced fragmentation of mitochondria may have altered some key functions because of the loss of soluble matrix enzymes from the mitochondrial matrix during isolation-induced fragmentation-resealing (Picard *et al.*, 2011; Picard *et al.*, 2012b). Present data cannot

support nor refute this hypothesis but suggested that permeabilized fibers may encounter substrate delivery limitations to deep mitochondrial fractions, particularly those located within myofibrils, while isolated organelles have full access to added substrates. Accordingly, in very young chicks, i.e. when fiber size is expected to be small, phosphorylating respiration estimated from total mitochondrial content matched that measured with permeabilized fibers with palmitoyl-carnitine as substrate (difference of only 13% at hatching). In adults, by contrast, muscle respiration estimated from isolated mitochondria exceeded 2.5-fold the value of permeabilized fibers. It cannot be excluded that within permeabilized fibers, some lipophilic substrates such as PC might be used by other cellular enzymes or trapped in subcellular compartments thus reducing the availability to mitochondrial carnitine palmitoyltransferases. With simpler substrates such as those derived from carbohydrates, diffusion limitation may not occur as respiratory rates were similar in both cases. Another difference between both techniques was the higher coupling state of oxidative phosphorylation of isolated mitochondria, as assessed by phosphorylating to non phosphorylating respiration ratio, than that measured with permeabilized fibers. Similarly respiratory control ratio was twice as high in isolated mitochondria as in permeabilized fibers (Picard *et al.*, 2011). The high respiratory control ratio of isolated mitochondria is likely related with the abundance of FAF-BSA used to trap most of uncoupling fatty acids in mitochondrial preparations while BSA will hardly attain mitochondria within fibers. A rather low respiratory control ratio of mitochondria within fibers is consistent with the high contribution of proton leak (nearly one-half) to resting respiration reported in perfused skeletal muscle (Rolfe and Brand, 1996).

[2 - Increase in skeletal muscle oxidative capacity during post-hatching ontogenesis](#)

Pectoralis muscle oxidative capacity, as assessed by COX activity of permeabilized fibers (Figure 1) or homogenates (Table 1), was increased nearly 6-fold between hatching and adulthood. This was associated with striking rises in the activities of both CS and HAD (Table 1). This ontogenic pattern is similar to that described in other bird species including barnacle geese (Bishop *et al.*, 1995) or red-winged blackbirds (Olson, 2001). In precocial eider ducklings, by contrast, muscle oxidative activity was much higher at hatching than in adulthood in relation with a large increase in activity rapidly occurring in the peri-hatching period (Grav *et al.*, 1988). It follows that in rather altricial Adélie penguin chicks, pectoralis muscle is rather metabolically immature at hatching, in agreement with poor thermoregulatory ability at that stage (Bucher *et al.*, 1990), but rapidly acquires higher COX

activity within the first week post-hatching (+146%). By 2-wks of age, i.e. at a time where chicks acquire thermal emancipation and improved thermoregulatory ability (Bucher *et al.*, 1990), pectoralis COX activity was increased 3-fold. Similarly, marked increases in aerobic and β -oxidative activities of skeletal muscles coincided with the ontogeny of thermoregulatory ability in red-winged blackbirds (Olson, 2001) or increased thermogenic capacity in cold-acclimated birds (Aulie and Grav, 1979; Barré *et al.*, 1987a) and winter-acclimatized penguin chicks (Duchamp *et al.*, 1991). The development of endothermy in Adélie penguin chicks may therefore depend on the biochemical maturation of skeletal muscles, and especially pectoralis muscles devoid of locomotor function on land. In adults, pectoralis muscle oxidative activity was further increased as compared with growing chicks (Table 1) possibly in relation with further developmental maturation and the living conditions of adults that face the energetic challenges of cold water immersion, increased contractile activity during swimming at sea and hypoxic hunting dives. Increases in skeletal muscle oxidative potential have been documented in relation with the passage from shore to marine life in juvenile king penguins (Teulier *et al.*, 2012) and with endurance exercise training or intermittent tissue hypoxia in a number of organisms (Fluck, 2006; Hood *et al.*, 2006; Hoppeler and Fluck, 2002; Kayar *et al.*, 1986).

3 - Ontogenic changes in mitochondrial characteristics

Present data showed for the first time that the large rise in pectoralis muscle oxidative activity during post-hatching ontogenesis relies on changes in mitochondrial abundance and functional characteristics. Since mitochondrial COX activities measured in Adélie penguin muscle were in the range of published data in birds (Barré *et al.*, 1989; Duchamp *et al.*, 1991; Goglia *et al.*, 1993) while muscle COX activity per unit weight of tissue was much higher, especially in adult penguins, than in other birds, it follows that a large increase in inner membrane area and a marked mitochondrial biogenesis must take place during ontogenesis. It should be large enough to overcome the expected increase in fiber size and myofibrils content that takes place during growth as shown in chickens and that leads to an age-related decreased density of mitochondria in muscle sections (Belichenko *et al.*, 2004). As expected, IMF and SS mitochondria differed in their biochemical and functional characteristics as already noted in birds and mammals (Barré *et al.*, 1989; Cogswell *et al.*, 1993; Duchamp *et al.*, 1991; Hoppeler, 1986; Palmer *et al.*, 1977; Riva *et al.*, 2006) with the SS mitochondria exhibiting lower enzymatic activities and rates of oxidative phosphorylation at all ages. Recent findings also showed that SS and IMF mitochondria also differed in size and shape (Picard *et al.*, 2013). Such regional differences have been related to distinct local energy-

consuming mechanisms, namely muscle contraction for IMF mitochondria and the active transport of metabolites through the sarcolemma for SS mitochondria (Müller, 1976). Present data showed that the ontogenic profile differed between mitochondrial fractions with chick growth mainly affecting the IMF fraction (Table 1) and resulting in a gradual increase (+164%) in the IMF/SS ratio in pectoralis muscle. Such specific effect would be consistent with the expected increases in muscle fiber size and myofibril content during chick growth that may require a concomitant rise in local ATP supply for the myofibril interactions during contraction. This would result in an improved shivering thermogenesis with age in Adélie penguin chicks, as already documented in growing king penguin chicks (Duchamp *et al.*, 2002), and in increased thermoregulatory ability (Bucher *et al.*, 1990). In adults, by contrast, the IMF/SS ratio markedly dropped because of the higher abundance of SS mitochondria (+200% vs D30) suggesting specific roles of the SS mitochondria fraction during marine life. Mechanisms controlling muscle bioenergetics in Adélie penguin chicks may possibly involve thyroid hormones known to control mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in mammals and birds (Schew *et al.*, 1996; Weitzel *et al.*, 2003) and showing parallel development during the ontogenesis of thermoregulation and muscle oxidative capacity in altricial birds (Olson, 2001; Olson *et al.*, 1999; Schew *et al.*, 1996; Weitzel *et al.*, 2003)). Transcriptional regulators such as peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α (PGC-1 α) that also control mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism (Lin *et al.*, 2005), with specific effects on the SS mitochondria at modest muscle overexpression (Benton *et al.*, 2008), may also be involved.

[4 - Expression of immunoreactive fusion proteins in penguin skeletal muscle relates to fiber energetics](#)

Present data described for the first time the expression of penguin analogs of mitochondrial fusion proteins Mfn2 and OPA1 that promote mitochondrial tethering and outer mitochondrial membrane fusion and regulate mitochondrial metabolism in a number of organisms (Zorzano *et al.*, 2010). Immunoreactive proteins of similar sizes have indeed been detected in penguin skeletal muscle using antibodies directed against mammalian proteins indicating some conservation of these proteins across Classes. The relative abundance of immunoreactive Mfn2 and OPA1 increased in penguin muscle mitochondria in conditions of high energy expenditure such as during chick growth in the cold or adult life in cold sea. This is in keeping with the increased Mfn2 gene expression already reported in skeletal muscle of cold-exposed rats and that was shown to be mediated by PGC-1 α (Soriano *et al.*, 2006). If penguin immunoreactive Mfn2 and OPA1 exhibit similar roles in fusion processes, the

ontogenic up-regulation of these proteins between D1 and adulthood (+72% and +94% for Mfn2 and OPA1, respectively, Figure 4) suggests changes in mitochondrial muscle networks with potential increased fusion. The positive correlation between respiratory activity of permeabilized fibers, i.e. a model with preserved mitochondrial networks, and mitochondrial fusion protein relative abundance (Figure 5) suggests a link between mitochondrial networks and muscle bioenergetics in penguins. Morphologically, increased fusion with development is consistent with previous ultramicroscopic observations of elongated IMF and dense SS mitochondria patches in pectoralis muscle from juvenile penguin chicks (Barré *et al.*, 1989; Duchamp *et al.*, 1991; Hoppeler, 1986; Palmer *et al.*, 1977; Riva *et al.*, 2006). This is in keeping with growing evidences showing that increasing mitochondrial fusion maintains a tubular mitochondrial network and optimizes mitochondrial function (Bach *et al.*, 2003; Chen and Chan, 2005; Griffin *et al.*, 2006). Such phenomenon may be of critical interest during post-hatching growth and development. During embryo development, mitochondrial fusion involving Mfn1 and Mfn2 appeared as an essential process for embryonic development, mitochondrial remodelling, muscle bioenergetics and animal thermogenesis (Chen and Chan, 2010; Chen *et al.*, 2003; Hua *et al.*, 2012; Papanicolaou *et al.*, 2012). One might therefore interpret the increased functional properties of SS mitochondria and the reduced IMF/SS ratio in pectoralis muscle of adult Adélie penguins (Table 1) as the result of the organisation of muscle mitochondria into an extended interconnected mitochondrial network, possibly enabling mitochondria to mix their contents within the network that may be advantageous under conditions of high energy demand (Chen and Chan, 2010; Griffin *et al.*, 2006; Otera and Mihara, 2011; Romanello and Sandri, 2012; Westermann, 2012) as faced by these birds during their marine life. Further since penguins face hypothermia during diving at sea (Handrich *et al.*, 1997), an increased expression of mitochondrial fusion proteins may contribute to maintain mitochondrial function and cell survival during cold stress as observed with cellular models *in vitro* (Zhang *et al.*, 2010). The drop in Mfn2 relative abundance concomitant to a marked rise in mitochondrial protein content during the first week of penguin life could be interpreted as a required fission to enable an enhanced dynamic mitochondriogenesis at that stage. However, increasing mitochondrial network complexity (increasing mitochondrial fusion) is not consistently associated with higher respiratory capacity, as phosphorylating respiration did not differ between highly glycolytic muscle where mitochondrial structure is more punctate and very aerobic muscle where mitochondrial structure is more tubular/reticular in nature (Picard *et al.*, 2012a). This suggests that mitochondrial networking may not be the only process regulating respiration and that intrinsic properties of mitochondria also play important roles. It cannot be excluded that the increased

abundance of fusion proteins with age and in adults might also contribute to create more sarcoplasmic reticulum - mitochondrial tethers, as this occurs in mice striated muscle during postnatal development (Boncompagni *et al.*, 2009). Connections between sarcoplasmic reticulum and mitochondria in active pectoralis muscle of penguins at sea may provide a powerful local control mechanism for integrating Ca^{2+} release/reuptake and ATP utilization during muscle contraction with ATP production, muscle bioenergetics and lipid synthesis (Rowland and Voeltz, 2012).

5 - Perspectives

On a technical point of view, present data showed that neither isolated mitochondria nor permeabilized fibers are ideal tools to investigate muscle bioenergetics but the combination of both approaches is of primary interest as noted by others (Picard *et al.*, 2011) and documented here to clarify the ontogenic changes in mitochondrial function in Adélie penguins. Nevertheless the permeabilized fiber technique benefits from the very low amount of biological material requested to investigate muscle bioenergetics opening a wide area of new biological models that could not be addressed with isolated mitochondria approaches. On a biological point of view, present data suggest a potential role of fusion proteins in the ontogeny of muscle bioenergetics. Changes in fusion protein abundance suggest that even in a very constrained and organized cellular environment such as that occurring in myocytes with well-organized contractile machinery, mitochondrial networks dynamics may occur. This is in keeping with recent observations of morphological interactions between mitochondrial membranes in adult mouse skeletal muscle (Picard *et al.*, 2013). Future studies must address the concomitant changes in fission proteins and the impact of mitochondrial interactions and network dynamic within skeletal muscles. The mechanisms controlling such ontogenic changes in fusion and possibly fission proteins also warrant further investigations.

The rapid ontogeny of skeletal muscle energetics is consistent with the brevity of the breeding season in Antarctica that imposes a true race against time to Adélie penguin chicks. Any parameter such as climatic conditions and food availability, that affect rapid chick growth, skeletal muscle development and ontogenesis of bioenergetics, is likely to be detrimental for juveniles during the growing period on land and later at departure to sea. The first weeks post-hatching, characterized by marked changes in skeletal muscle bioenergetics (present study) and development of adipose tissue (Raccurt *et al.*, 2008), are therefore of critical importance for Adélie penguin survival. Noteworthy is the observation that mortality is mainly observed during that early period in tight link with changes in environment and food supply. The capacities to rapidly develop skeletal muscle bioenergetics may represent

metabolic adaptations contributing to select birds able to overcome the energetic challenges of Antarctic life on land and later at sea. The molecular events triggering skeletal muscle development deserve to be more fully investigated.

In conclusion, present data described for the first time the ontogeny in muscle bioenergetics in growing Adélie chicks using permeabilized muscle fibers and isolated mitochondria. Results underlined the marked increase in skeletal muscle oxidative activity from hatching to adulthood and the differential regulation of mitochondrial muscle fractions. The parallel changes in mitochondrial fusion protein expression and muscle bioenergetics suggest a potential role of mitochondrial networks in the adaptation of penguin skeletal muscle energetic to harsh environmental constraints.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the members of the scientific missions in Terre Adélie and to the French Polar Research Institute for their technical and logistical assistance.

GRANTS

This work was funded by a grant from the French polar institute (program 131), by the CNRS and the University of Lyon. AF was in receipt of a fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Partie 2 : le canard de Barbarie (*Cairina moschata*)

I - Introduction

L'existence d'une plasticité mitochondriale aussi bien morphologique que fonctionnelle, semble participer grandement à l'adaptation des organismes aux différentes contraintes énergétiques auxquelles ils sont exposés tout au long de leur vie. L'étude précédente sur le manchot Adélie, une espèce naturellement adaptée au froid, a mis en évidence l'implication potentielle des protéines de fusion Mfn2 et OPA1 dans l'augmentation du métabolisme énergétique musculaire. Cela surviendrait au cours de la croissance, plus principalement au moment de l'émancipation thermique des poussins, et à l'âge adulte où le manchot subit plusieurs contraintes comme le froid des eaux antarctiques, l'activité physique endurante de la nage pour parcourir des centaines de kilomètres afin de se nourrir et l'hypoxie liée à la plongée. Cette étude suggérait fortement que l'évolution des processus bioénergétiques musculaires observés entre la naissance et l'âge adulte pouvaient impliquer des modifications de l'expression des protéines de fusion et de ce fait une réorganisation potentielle des réseaux mitochondriaux pour faire face à ces contraintes énergétiques.

La croissance et l'exposition au froid représentent deux contraintes connues pour entraîner une augmentation du métabolisme énergétique mais on peut se demander si ce sont les mêmes mécanismes qui sont mis en jeu pour faire face à ces contraintes énergétiques. Afin de discriminer, les processus bioénergétiques associés à la croissance de ceux associés à l'exposition au froid, nous avons travaillé sur le canard de Barbarie. Cet oiseau est un modèle bien connu au laboratoire et cela nous permettra de réaliser en parallèle un élevage des canetons à thermoneutralité (TN : 25°C) ou au froid (CA : 4°C). Une étude préliminaire (étude 1) nous avait permis d'émettre l'hypothèse d'une réponse très rapide de l'expression des protéines de fusion au froid, comme cela a été observé dans des études réalisées chez le mammifère (Soriano *et al.*, 2006) ou sur culture cellulaire (Zhang *et al.*, 2010). Nous avons donc étudié la cinétique de l'expression des protéines de fusion au cours de la croissance ainsi que l'impact d'une exposition au froid des canetons. Cette étude peut se subdiviser en 2 parties, une exposition aiguë au froid (de 1 à 4 jours), période durant laquelle le frisson thermique est le plus intense, et une exposition prolongée (de 1 à 4 semaines) correspondant à la diminution progressive de l'intensité du frisson et à la mise en

place de la thermogénèse sans frisson (Barré *et al.*, 1985; Barré *et al.*, 1986b; Duchamp *et al.*, 1999).

Au cours de cette étude nous essaierons de déterminer si comme pour le manchot, il est possible d'établir des corrélations entre de potentielles modifications des capacités énergétiques mitochondriales du tissu musculaires et l'expression des protéines de fusion Mfn2 et OPA1 au cours de la croissance, et au cours d'une exposition au froid.

II - Matériel et Méthode

1 - Animaux

Comme pour l'étude 1 les canetons de Barbarie (pédigrée R51, INRA) ont été élevés à l'animalerie dès l'âge d'un jour à une température de 30°C durant les 3 premiers jours puis celle-ci a été baissée progressivement jusqu'à 25°C. La nourriture et la boisson ont été fournies *ad libitum*.

Après 8 jours d'acclimatation à l'animalerie, 72 canetons ont été séparés en 2 groupes homogènes en nombre et en masse. Le groupe témoin (TN) a été élevé à thermoneutralité (25°C) et le groupe froid (CA) a été élevé à 4°C. Les animaux ont été sacrifiés à différents âges : 9j ; 10j ; 12j ; 15j ; 22j et 36j (correspondant respectivement à 24h ; 48h ; 96h ; 7j ; 14j et 28j d'exposition au froid), en alternant chaque fois un caneton du groupe TN (n=6) et un caneton du groupe CA (n=6).

2 - Protocole expérimental

Comme dans l'étude 1, la croissance des canetons des différentes séries expérimentales a été contrôlée par pesées (Figure 51).

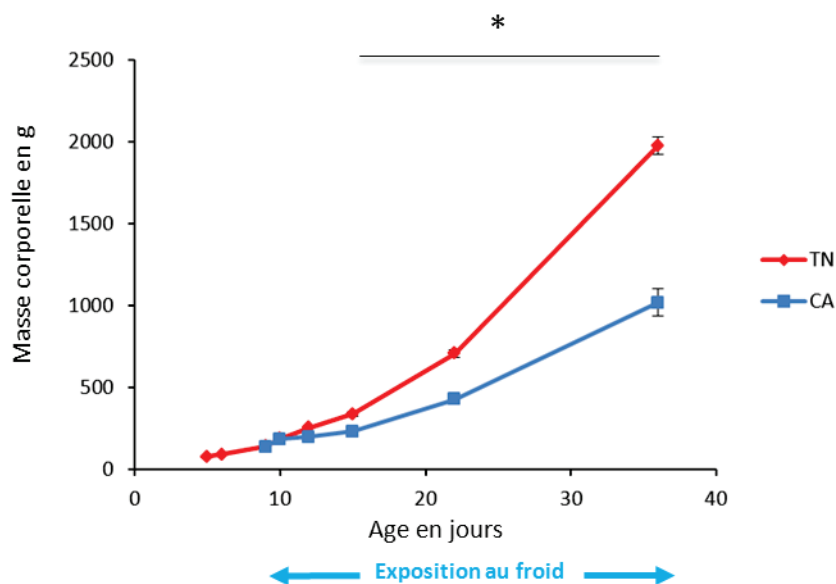


Figure 51 : Suivi de la masse corporelle (en g) en fonction de l'âge (en jours) des canards élevés à 25°C ou à 4°C (n = 6 pour chaque condition). Les valeurs correspondent aux moyennes \pm sem. Dès une semaine d'exposition au froid une différence significative (*) de masse corporelle apparaît entre les 2 groupes.

Les canetons ont été mis à mort par décapitation aux différents âges et temps d'acclimatation au froid. Comme chez le manchot, cette étude a été réalisée sur le muscle pectoral. Une partie de ce muscle a immédiatement été conservée dans le tampon d'isolement utilisé pour la respiration des fibres perméabilisées à 41°C (cf. Matériel & Méthode). Le reste a été immédiatement congelé à -80°C pour l'analyse de l'abondance des protéines de fusion par western blot.

3 - Analyses statistiques

Tous les résultats présentés correspondent aux moyennes \pm sem et ont été analysés avec le logiciel Statview 5.0 (Abacus Concept, Berkeley). Pour tester les différences entre les groupes, les moyennes ont été comparées en effectuant des ANOVA suivies d'un test de Fisher. Le seuil de significativité a été choisi à $p < 0,05$.

III - Résultats

1 - Modifications des capacités énergétiques mitochondriales au cours de la croissance à TN (25°C)

Dans un premier temps, les variations de la bioénergétique musculaire ont été étudiées sur des fibres perméabilisées de pectoral de canetons en croissance à thermoneutralité (Figure 52).

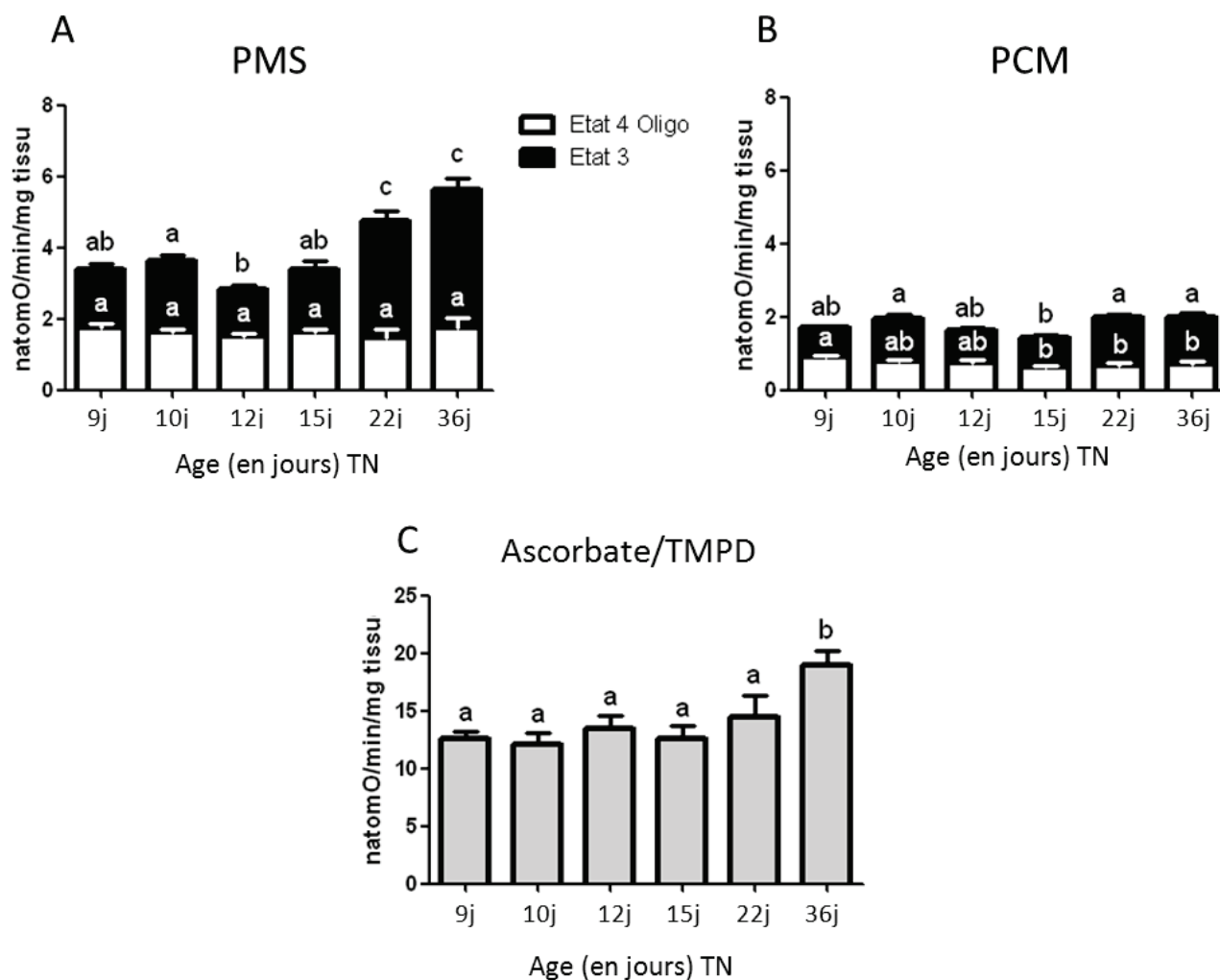


Figure 52 : Consommation d'oxygène (natomO/min/mg de muscle) des fibres perméabilisées du muscle pectoral des canetons en croissance à thermoneutralité, de 9 à 36 jours. La respiration est initiée soit par (A) 5 mM de pyruvate/2,5 mM de malate + 5 mM de succinate (PMS) soit par (B) 40 μM de palmitoyl-L-carnitine/2,5 mM de malate (PCM). L'état phosphorylant est obtenu par ajout de 1 mM d'ADP puis l'état non phosphorylant est déterminé par ajout de 1,25 μg/mL d'oligomycine. (C) L'activité maximale de la Cytochrome-c Oxydase est mesurée après addition de 2 μM de FCCP, 2,5 μM d'antimycine A, 2,5 mM d'ascorbate et 0,25 mM de TMPD. Les résultats représentent les moyennes ± sem ; n=6. Les résultats avec des lettres différentes sont significativement différents avec p<0,05. L'état phosphorylant est toujours significativement supérieur à l'état non phosphorylant.

Deux types de substrats énergétiques ont été utilisés pour mesurer les différents états respiratoire, un substrat d'origine glucidique (pyruvate/malate/succinate : PMS) et un substrat d'origine lipidique (palmitoyl-L-carnitine/malate : PCM). La consommation d'oxygène des fibres perméabilisées présentait des intensités différentes en fonction de la nature des substrats utilisés. L'utilisation d'un substrat d'origine glucidique (PMS) entraînait une activité mitochondriale deux fois plus forte que l'utilisation d'un substrat d'origine lipidique (PCM). En présence de PMS (Figure 52A), aucune modification de l'état non phosphorylant n'était observée au cours de la croissance, alors que l'état phosphorylant augmentait significativement après 15 jours (+40% ; $p < 0,05$), suggérant une augmentation des capacités de synthèse d'ATP. L'utilisation de substrat lipidique par le muscle pectoral ne semble pas être modifiée au cours de la croissance. En effet, aucune variation notable n'était observée que ce soit à l'état phosphorylant ou non phosphorylant en présence de PCM (Figure 52B). L'activité maximale de la cytochrome-c oxydase (COX), était significativement augmentée après l'âge de 22j (+50% vs 9j) (Figure 52C).

2 - Modifications bioénergétiques au cours d'une exposition aiguë au froid

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux capacités énergétiques du muscle pectoral de canetons soumis à 96h d'exposition au froid (Figure 53).

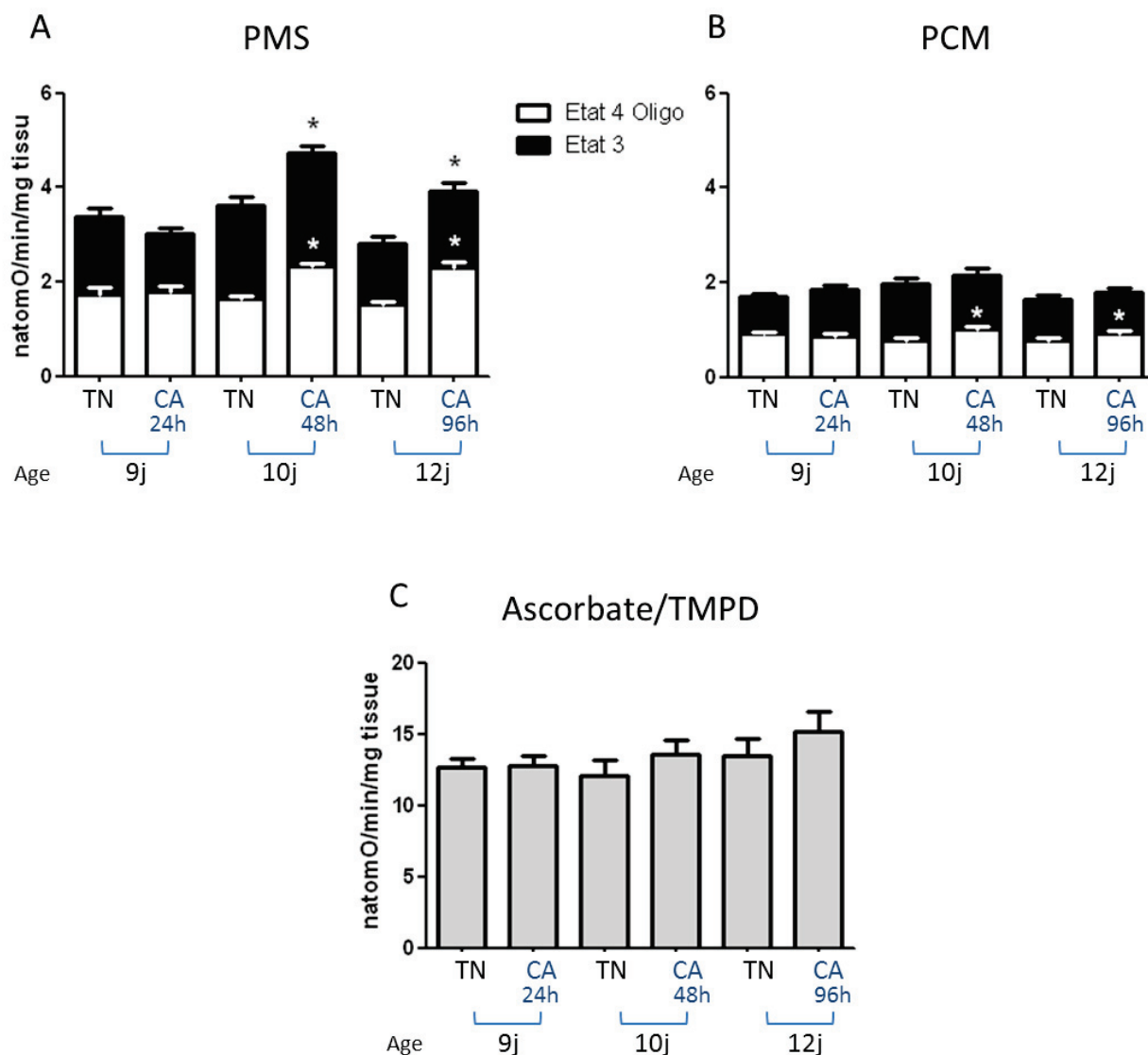


Figure 53 : Consommation d'oxygène (natomO/min/mg de muscle) des fibres perméabilisées du muscle pectoral des canetons au cours d'une exposition au froid (4°C ; CA) de courte durée (24h, 48h, 96h) par comparaison avec des canetons de mêmes âges élevés à neutralité thermique (25°C ; TN). La respiration est initiée soit par (A) 5 mM de pyruvate/2,5 mM de malate + 5 mM de succinate (PMS) soit par (B) 40 µM de palmitoyl-L-carnitine /2,5 mM de malate (PCM). L'état phosphorylant est obtenu par ajout de 1 mM d'ADP puis l'état non phosphorylant est déterminé par ajout de 1,25 µg/mL d'oligomycine. (C) 2 µM de FCCP, 2,5 µM d'antimycine A, 2,5 mM d'ascorbate et 0,25 mM de TMPD permettent de mesurer l'activité maximale de la COX. Les résultats représentent les moyennes ± sem ; n=6. Les étoiles (*) correspondent à des différences significatives entre TN et CA de même âge avec p<0,05. L'état phosphorylant est toujours significativement supérieur à l'état non phosphorylant.

Aucune différence n'était observée entre les canetons TN et CA après 24h de froid. En revanche, une augmentation significative de la respiration mitochondriale était observée après 48h et perdurait jusqu'à 96h d'exposition au froid (Figure 53A). Cette augmentation de la respiration avec le substrat PMS résultait à la fois d'une augmentation de l'état phosphorylant et de l'état non phosphorylant (respectivement à 48h et 96h, état 3 : +31% et

+39% ; état 4 : +42% et +51%). En présence du substrat PCM, les mitochondries de canetons CA présentait une stimulation significative de la consommation d'oxygène à l'état non phosphorylant (Figure 53B) dès 48h d'exposition au froid (respectivement +30% et +20%) mais sans modification de l'état phosphorylant. L'activité maximale de la COX, qui est utilisée comme indicateur du contenu en chaîne respiratoire, n'était pas modifiée dans les premières 96h d'exposition au froid.

3 - Modifications bioénergétiques au cours d'une exposition prolongée au froid

Lorsque l'exposition au froid se prolonge au-delà de 96h, les capacités d'utilisation des substrats énergétiques tendent à s'inverser en comparaison avec les expositions courtes (Figure 54).

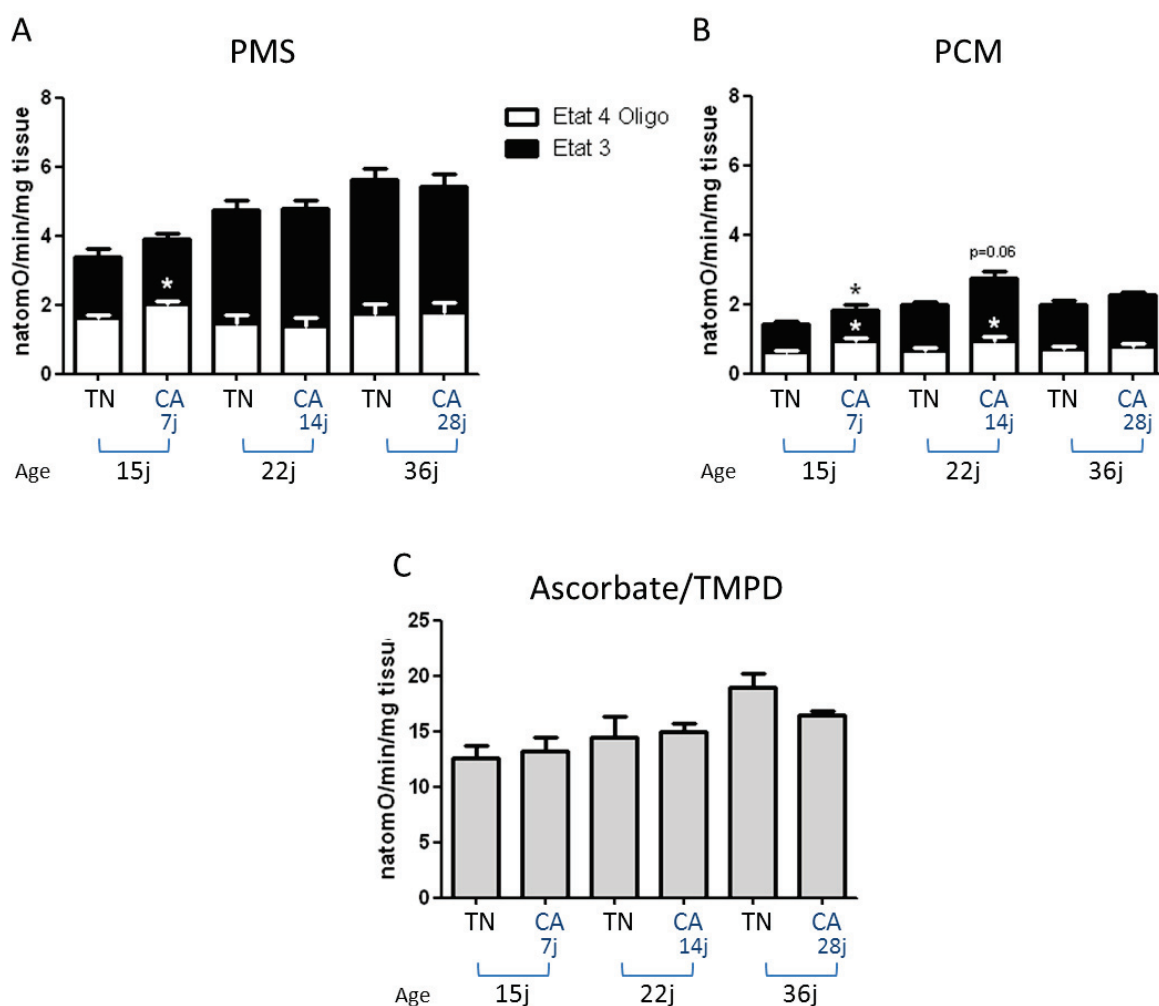


Figure 54 : Consommation d'oxygène (natomO/min/mg de muscle) des fibres perméabilisées du muscle pectoral des canetons au cours d'une exposition au froid (4°C ; CA) prolongée 7j, 14j, 28j en comparaison avec des canetons de mêmes âges élevés à neutralité thermique (25°C ; TN). La respiration est initiée soit par (A) 5 mM de pyruvate/2,5 mM de malate + 5 mM de succinate (PMS) soit par (B) 40 μ M de palmitoyl-L-carnitine/ 2,5 mM de malate (PCM). L'état phosphorylant est obtenu par ajout de 1 mM d'ADP puis l'état non phosphorylant est déterminé par ajout de 1,25 μ g/mL d'oligomycine. (C) 2 μ M de FCCP, 2,5 μ M d'antimycine A, 2,5 mM d'ascorbate et 0,25 mM de TMPD permettent de mesurer l'activité maximale de la COX. Les résultats représentent les moyennes \pm sem ; n=6. Les étoiles (*) correspondent à des différences significatives entre TN et CA de même âge avec $p < 0,05$. L'état phosphorylant est toujours significativement supérieur à l'état non phosphorylant.

Après 7j d'exposition au froid, la consommation d'oxygène des fibres musculaires, en présence de substrats glucidiques, ne présentait plus de différence en comparaison avec les canetons du même âge élevés à thermoneutralité (TN) hormis une légère augmentation de l'état non phosphorylant à 7 jours d'exposition au froid (+25%) (Figure 54A). En revanche, l'utilisation de substrats d'origine lipidique entraînait une augmentation de la consommation d'oxygène, à la fois en états phosphorylant et non phosphorylant, à 7j et 14j d'exposition au froid (respectivement, état 3 : +30% et +39% ; état 4 : +48% et +44%). Après 28j d'exposition au froid, on observait de façon inattendue un retour de l'activité respiratoire au même niveau que les canards TN (Figure 54B). L'activité de la COX n'était toujours pas modifiée après 3 semaines d'acclimatation au froid en comparaison avec les canetons élevés à thermoneutralité (Figure 54C).

4 - Abondance relative des protéines de fusion dans les mitochondries musculaires au cours de la croissance et en fonction de la durée d'exposition au froid

Les protéines de fusion Mfn2 et OPA1 ont été détectées par western blot sur les mitochondries musculaires des canards de différents âges exposés ou non au froid (Figure 55).

Lors de la croissance des canetons (entre 9 et 36 jours) à thermoneutralité, l'abondance relative des protéines de fusion mitochondriale (Mfn2 et OPA1) ne présentait pas de variation dans le muscle pectoral. En revanche, lorsque ces canetons étaient soumis à une exposition aiguë au froid, cela entraînait une augmentation de l'abondance relative de la Mfn2 à 24h et à 48h d'exposition au froid (respectivement +44% et +26% ; Figure 55A). Lorsque l'exposition au froid se prolongeait au delà de 48h, l'abondance relative de la Mfn2 revenait au même niveau que celle des canards TN (Figure 55A et B). On remarquait également que les variations d'expression des protéines Mfn2 et OPA1 ne survenaient pas de manière synchronisée mais plutôt de manière successive. En effet, l'abondance relative de la protéine OPA1, était augmentée à partir de 96h et jusqu'à 7j d'exposition au froid (respectivement +15% et +44%) puis revenait au même niveau que les canards TN dès 15j d'exposition au froid (Figure 55C et D).

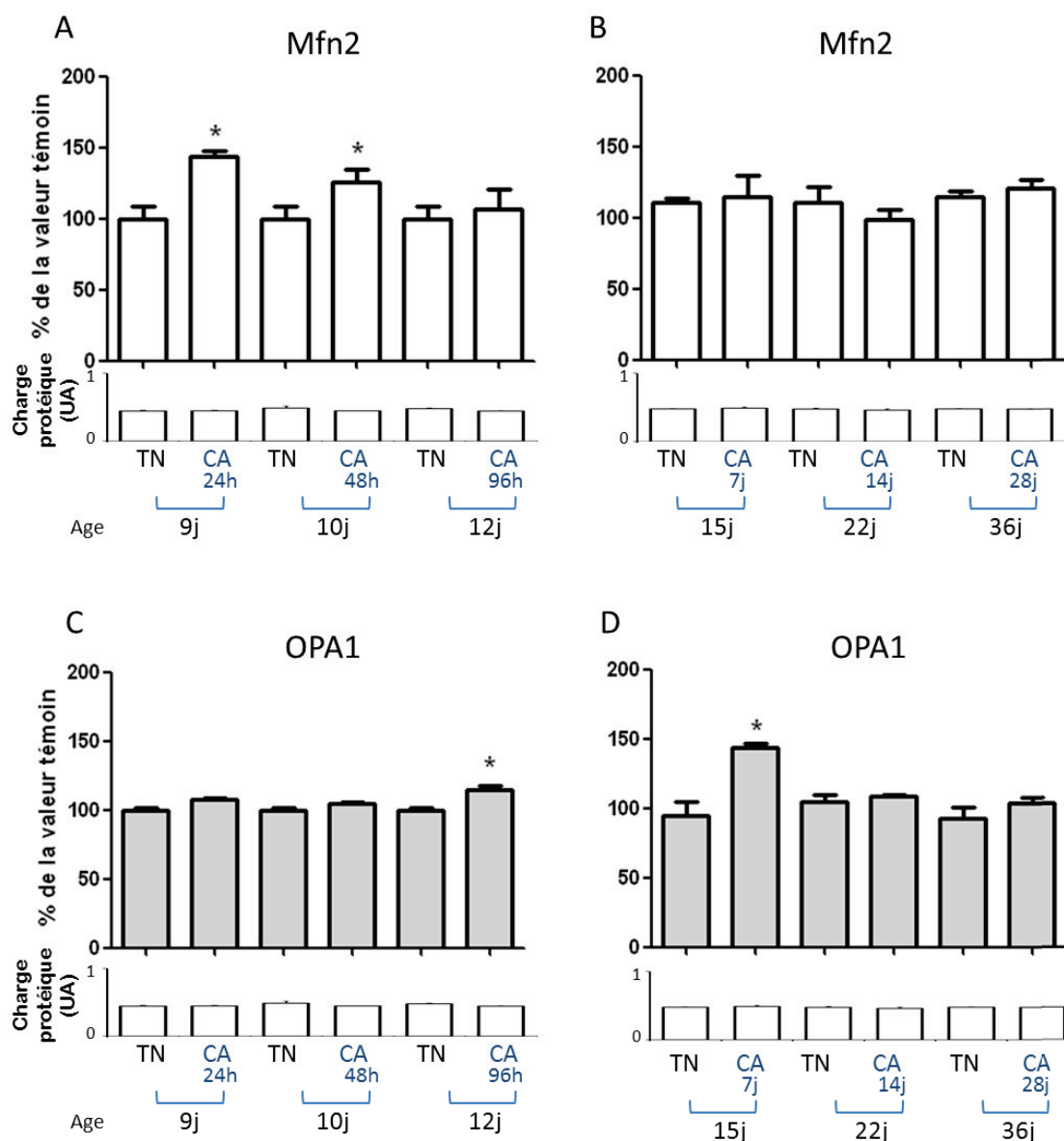


Figure 55 : Abondance relative des protéines de fusion mitochondriale Mfn2 (86 kDa) et optic atrophy 1 (OPA1; 90-110 kDa), analysées par western blot sur des mitochondries isolées de muscle pectoral de canetons élevés à thermoneutralité (TN) ou au froid (CA). La quantité de protéines mitochondriales déposée a été contrôlée par une coloration au rouge ponceau et la moyenne des intensités relatives (UA) a été représentée sous chaque graphique. Les résultats représentent les moyennes \pm sem ; n=4 (CA) ; n=3 (TN). Les étoiles (*) correspondent à des différences significatives entre TN et CA de même âge avec $p < 0,05$.

5 - Activité respiratoire vs abondance relative des protéines de fusion

Comme le montre la figure 56, au cours de la croissance (carrés rouges) les modifications de l'activité respiratoire des fibres musculaires (Figure 52) n'étaient pas corrélées avec les modifications de l'abondance des protéines de fusion mitochondriale (Figure 55). Après une exposition au froid des canetons (de 24h à 28j ; losanges rouges), ces deux éléments n'étaient toujours pas corrélés. L'absence de lien entre activité

mitochondrial et niveau d'expression des protéines de fusion, suggère que l'évolution des capacités énergétiques mitochondriales dans le pectoral au cours de la croissance du caneton ou lors d'une exposition au froid, n'est pas directement associée à une réorganisation du réseau mitochondriale.

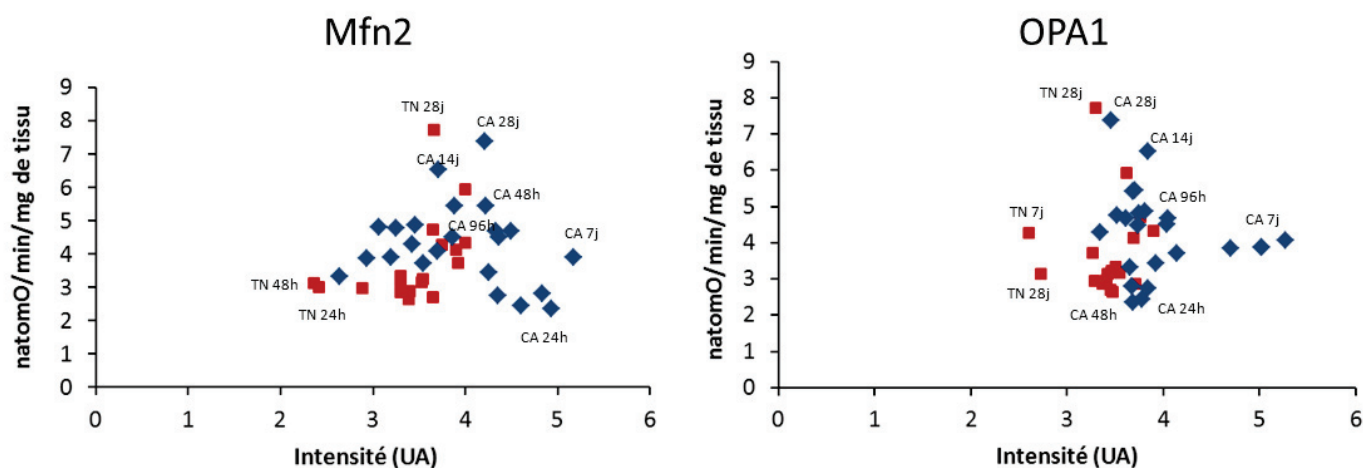


Figure 56 : Expression de l'abondance relative des protéines de fusion en fonction de l'activité respiratoire des fibres musculaires. Aucune corrélation n'est observée entre l'activité respiratoire des fibres musculaires (état phosphorylant (substrats PMS) natomO/min/mg de muscle pectoral) et l'abondance relative des protéines de fusion mitochondriale Mfn2 et OPA1 chez les canetons en croissance et après différentes durées d'exposition au froid. Chaque point correspond à un caneton différent, n=3 (TN) ou 4 (CA) par âge et par durée d'acclimatation au froid.

IV - Discussion

Si les adaptations mitochondriales survenant lors d'une exposition au froid de longue durée (5 semaines) sont relativement bien décrites chez l'oiseau (Barré *et al.*, 1987a; Barré *et al.*, 1986b; Goglia *et al.*, 1993; Roussel *et al.*, 1998), cette étude décrit pour la première fois l'évolution des processus énergétiques musculaires chez le canard de Barbarie au cours de la croissance, et lors d'une exposition au froid aiguë. Elle s'inscrit, de manière complémentaire, dans la suite de la mise en évidence de l'ontogenèse des processus énergétiques chez le manchot Adélie (Fongy *et al.*, 2013). Les résultats obtenus soulignent l'impact important et immédiat de la contrainte froid sur l'augmentation de l'activité mitochondriale associée à une augmentation des protéines de fusion dans les premiers jours d'exposition au froid.

1 - La croissance à thermoneutralité

Au cours des premiers jours de la croissance, les capacités oxydatives du muscle pectoral des canetons ne semblent pas varier. En effet aucune modification de la consommation d'O₂ des fibres musculaires n'est observée, que se soit en état 3 ou 4. Ces résultats semblent indiquer que : soit le muscle pectoral est capable d'assurer une fonction énergétique suffisante à ses besoins dès la naissance, soit ses capacités oxydatives sont limitées et pas encore complètement « matures » et efficaces en termes de machinerie enzymatique. En revanche, lorsque les canetons sont âgés de 3 semaines ou plus, une augmentation nette de la consommation d'oxygène est observée. Ce dernier point est supporté par l'étude de Choi *et al.* montrant que l'activité de certaines enzymes cytoplasmiques et mitochondriales (Pyruvate Kinase et Lactate DésHydrogénase et Citrate Synthase) augmente de manière très importante de l'éclosion à 21 jours de vie (Choi *et al.*, 1993). La modification de la respiration mitochondriale observée résulte d'une augmentation de l'état phosphorylant. Cela pourrait s'expliquer par une amélioration des capacités oxydatives du muscle pectoral avec une augmentation des capacités de synthèse d'ATP et potentiellement de l'activité de l'ATP synthase ou par une biogenèse mitochondriale. Lorsqu'on mesure l'activité de la cytochrome-c oxydase (COX), qui est un indicateur de la quantité de chaîne respiratoire, on observe, qu'elle n'augmente que chez les canetons âgés de plus d'un mois. Il semble donc que les modifications des capacités oxydatives du muscle pectoral survenant au-delà de 3 semaines résultent dans un premier temps d'une augmentation du fonctionnement mitochondrial, avant une augmentation du contenu mitochondrial.

Ces modifications de la bioénergétique mitochondriale ne sont observées qu'avec l'utilisation des substrats d'origine glucidiques. En effet, la respiration mitochondriale ne varie pas avec l'âge en présence de palmitoyl-carnitine (PCM) comme substrat énergétique. Cela peut résulter d'une activation faible de la voie d'oxydation des lipides à ces âges là, ou de l'utilisation préférentielle des glucides comme substrats énergétiques. Il faut également tenir compte de la méthodologie utilisée: les fibres musculaires perméabilisées. Dans ce modèle, la fourniture en substrat à la mitochondrie peut être limitant, et cela plus particulièrement en ce qui concerne les lipides, comme cela a été suggéré lors de l'étude sur le manchot Adélie. En effet, on retrouve une grande différence entre la respiration sur mitochondries isolées et la respiration sur fibres perméabilisées avec l'utilisation de ce substrat d'origine lipidique (Fongy *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent que le palmytoyl-carnitine qui est une molécule complexe de taille importante, pourrait ne pas diffuser correctement jusqu'aux mitochondries

profondément ancrées à l'intérieur des myofibrilles. De plus, à l'intérieur des myofibrilles, ce substrat pourrait être utilisé par d'autres enzymes cellulaires ou séquestré dans des compartiments sub-cellulaires ce qui diminuerait sa disponibilité pour la palmitoyl-carnitine transferase mitochondriale.

Il ressort également de nos études 1 et 2 sur les canetons, que l'abondance relative des protéines Mfn2 et OPA1 au niveau mitochondrial n'est pas modifiée pendant cette phase de la croissance. Si on postule que l'expression de ces protéines de fusion est le reflet de l'organisation mitochondriale cellulaire, cela signifierait qu'il n'y a pas de remodelage important du réseau pendant les 5 premières semaines de croissance chez le caneton de Barbarie. Le modèle canard se distingue donc du modèle souris dans lequel des variations de l'expression de la Mfn2 ont été décrites au cours du 1^{er} mois de vie post-natal (Boncompagni *et al.*, 2009). Cette différence pourrait être liée à la relative maturité d'une espèce nidifuge comme le caneton. Les variations de capacités énergétiques observées au cours de la croissance semblent donc bien résulter d'une modification de l'activité mitochondriale au niveau de la chaîne respiratoire, et/ou d'une biogenèse mitochondriale plus que d'un remodelage du réseau mitochondrial au sein des fibres musculaires en croissance.

2 - Effet d'une exposition aiguë au froid

Dès 48h d'exposition au froid, la respiration mitochondriale (état phosphorylant et état non-phosphorylant) est augmentée avec l'utilisation de substrats d'origine glucidique (PMS) alors que seul l'état non phosphorylant est augmenté avec l'utilisation de substrats d'origine lipidique. Cette utilisation plus faible des lipides pourrait résulter : i) du temps de latence nécessaire à la stimulation de la voie de la β -oxydation en réponse à une augmentation du métabolisme de l'organisme, ou ii) du processus de maturation musculaire qui ne serait pas encore abouti à cet âge (7 jours) et donc à un fonctionnement enzymatique mitochondrial moins efficace. L'augmentation de l'état non phosphorylant peut traduire une augmentation des fuites de protons à travers la membrane interne (découplage) associée à l'augmentation des acides gras circulants observée lors d'une exposition au froid (Barré *et al.*, 1986b). De plus, l'augmentation de l'abondance de certaines protéines découplantes, telles que l'ANT ou l'UCP aviaire (UCPav), avec l'âge pourrait également participer à cette fuite de protons. Des études ont montré une activation de leur expression lors d'une acclimatation au froid d'une semaine ou plus (Collin *et al.*, 2003; Roussel *et al.*, 2000) mais rien n'exclut une augmentation, ou tout du moins une activation, de ces protéines dès les premiers jours d'acclimatation au froid. L'activité COX exprimée par mg de tissu ne varie pas au cours des 4

premiers jours d'exposition au froid, en revanche la quantité de protéines mitochondriales extraites à partir des biopsies du muscle pectorale semble augmentée chez les canetons exposés pendant 24 et 48h au froid (CA) par rapport aux canards élevés à TN ($1,5 \pm 0,1$ vs $1,2 \pm 0,09$ mg/g ; $p < 0,05$), avant de revenir aux valeurs des canards élevés TN à partir de 96h. Ce résultat discordant pourrait être lié à la difficulté d'apprécier l'activité Cox maximale sur le modèle des fibres perméabilisées peut être en raison des propriétés physico-chimiques du substrat. Lors d'une exposition au froid de courte durée, l'augmentation du métabolisme qui est associée induirait donc de manière extrêmement rapide (24h) une augmentation du contenu protéique mitochondrial (cycle de Krebs, β -oxydation) afin d'assurer la fourniture énergétique nécessaire à cette situation. Ce résultat est en accord avec de précédentes données montrant par exemple chez la souris une augmentation des ARNm du facteur de transcription PGC1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator1 α) dès 12h d'exposition au froid. PGC1 α est impliqué dans la régulation de nombreux gènes intervenant dans le métabolisme énergétique (Knutti and Kralli, 2001; Puigserver and Spiegelman, 2003). Il active notamment la biogenèse mitochondriale et la respiration dans les cellules musculaires (Wu *et al.*, 1999). PGC1 α est également impliqué dans la stimulation de l'expression de la Mfn2 dans les cellules musculaires (Soriano *et al.*, 2006) ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'abondance de la protéine Mfn2 observée chez nos canards dès 24h et jusqu'à 48h d'exposition au froid. A partir de 4 jours d'exposition au froid, l'abondance de la Mfn2 revient au même niveau que chez les canards élevés à TN. Dans le cadre d'une augmentation de la fonction mitochondriale en réponse à un hyper métabolisme provoqué par le froid, l'hypothèse d'une activation de l'expression de la Mfn2 *via* l'activation du frisson thermique émise dans l'étude 1 reste tout à fait probable. En effet, suite à l'activation de la fonction contractile aux premiers jours d'exposition au froid, le muscle va devoir augmenter ses capacités oxydatives pour fournir suffisamment d'ATP nécessaire au bon fonctionnement cellulaire. Or il a été montré qu'une ramification du réseau mitochondrial était associée à une amélioration de la fonction mitochondriale (Bach *et al.*, 2003). La Mfn2 est également impliquée dans des mécanismes d'ancrage à d'autres compartiments cellulaires (Merkwirth and Langer, 2008). L'augmentation de cette protéine au froid pourrait notamment contribuer à faciliter les interactions entre mitochondries et réticulum sarcoplasmique. En effet, il a été observé que ces contacts RE-mitochondrie permettent de faciliter les échanges calciques entre ces deux organelles et de ce fait de stimuler la fonction mitochondriale (augmentation du cycle de Krebs, de la production de NADH et d'ATP) (Balaban, 2009; Boncompagni *et al.*, 2009; Seguchi *et al.*, 2005), ce qui dans notre étude permettrait le maintien d'une activité contractile élevée en réponse au froid.

L'augmentation de l'activité mitochondriale des fibres musculaires et l'augmentation de l'abondance relative de la Mfn2 étaient observées à partir de 24 et 48h d'exposition au froid, ce qui suggère un rôle de la protéine Mfn2 dans cette activation métabolique. Notre étude ne nous permet pas de déterminer s'il s'agit d'un rôle métabolique et/ou structural mais l'hypothèse d'une réorganisation des réseaux mitochondriaux très rapide après l'exposition au froid en vue d'une activation optimale des mitochondries n'est pas à exclure. De plus, la surexpression des mitofusines active directement l'expression de certains gènes comme ceux codant pour les protéines de la chaîne respiratoire (Pich *et al.*, 2005), ce qui pourrait contribuer à l'activation énergétique musculaire observée au froid. La protéine de fusion OPA1 augmente également suite à l'exposition au froid mais seulement après 96h. Ces variations de l'abondance des protéines de fusion suggèrent une réorganisation précoce des réseaux mitochondriaux *via* la fusion des membranes externes ou une stimulation directe de la fonction mitochondriale par Mfn2, suivie, après quelques jours, de la fusion des membranes internes (OPA1). La protéine OPA1 est également connue pour son rôle dans le maintien de l'intégrité des crêtes mitochondriales dans lesquelles se trouvent les protéines de la chaîne respiratoire (Olichon *et al.*, 2003). L'augmentation de l'abondance de la protéine OPA1 pourrait donc être associée à une augmentation et à une amélioration de l'organisation des crêtes mitochondriales aboutissant à une optimisation de l'activité mitochondriale.

3 - Effet d'une exposition au froid prolongée

Après une semaine d'exposition au froid, nous observons une orientation du métabolisme énergétique vers l'utilisation de substrats lipidiques, comme le montre l'augmentation de l'activité respiratoire avec l'utilisation de PCM. Cette réorientation du métabolisme a déjà été décrite chez les oiseaux exposés au froid (Bedu *et al.*, 2002; Bénistant *et al.*, 1998). En effet les lipides ont un contenu énergétique bien supérieur aux glucides, et leur oxydation permet à la cellule d'être plus efficace dans la production d'énergie et de pourvoir aux différents besoins de l'organisme comme par exemple la production de chaleur et la croissance. Cette augmentation d'efficacité résultant de l'activation du métabolisme lipidique s'observe sur la prise de masse des canetons. En effet, au cours des premiers jours de froid la production d'énergie serait majoritairement orientée vers la thermogénèse, au détriment de la croissance (+15 g/j les 4 premiers jours d'exposition au froid). Par contre à partir d'une semaine d'exposition au froid, on observe une reprise de la croissance (+28 g/j la 2^{ème} semaine d'exposition au froid), concomitante avec l'utilisation accrue des lipides. En revanche, à partir d'un mois d'acclimatation au froid il n'y a

plus de différence d'activité mitochondriale entre les canards élevés à TN et acclimatés au froid, cela quel que soit le substrat. Cela pourrait suggérer l'acquisition d'une activité optimale des mitochondries permettant une lutte contre le froid, tout en continuant sa croissance, sans augmentation visible du métabolisme énergétique cellulaire. L'absence de biogenèse mitochondriale, estimée par la mesure de l'activité COX corrobore cette hypothèse. De manière très surprenante, ces résultats ne correspondent pas aux données précédentes obtenues sur le même type d'étude d'acclimatation au froid du canard de Barbarie qui montraient après 3 ou 5 semaines d'exposition à 4°C une importante augmentation de l'activité mitochondriale associée à une nette augmentation de l'activité COX (Barré *et al.*, 1987a; Duchamp and Barré, 1993; Goglia *et al.*, 1993; Roussel *et al.*, 1998). Il apparaît cependant des différences dans l'évolution de la prise de masse des canards entre notre étude et celles de ces auteurs. En effet, après 5 semaines d'exposition au froid, les masses des canards TN et CA étaient sensiblement les mêmes et ne semblaient donc pas être impactées par l'exposition au froid (Duchamp and Barré, 1993; Duchamp *et al.*, 1992), alors que dans notre étude, après 4 semaines d'exposition au froid, la masse des canards CA était 50% inférieure à la masse des TN. Il faut également souligner que les précédentes expériences avaient été réalisées sur mitochondries isolées de pectoral ou de gastrocnémien interne, ce qui pourrait expliquer certaines différences. En effet, ces études faisaient état de modifications intrinsèques de l'activité mitochondriale alors que notre étude qui a été réalisée sur fibres musculaires perméabilisées, permettant de maintenir l'organisation des réseaux mitochondriaux intacte, fait état de modifications de l'activité métabolique générale des réseaux mitochondriaux. Picard *et al.* avaient également décrit des discordances mitochondrie/fibre perméabilisée, démontrant que les différences observées résulteraient plus des techniques d'isolation que de réelles modifications physiologiques (Picard *et al.*, 2011; Picard *et al.*, 2013).

De plus, la différence de masse constatée entre des canards de mêmes âges dans des études espacées de plusieurs années, nous laisse penser qu'il pourrait y avoir une dérive de la souche des canards utilisés au cours du temps. Ils auraient ainsi développé une capacité d'isolement au froid beaucoup plus importante à des âges plus précoces, grâce par exemple à une densité plus importante de duvet ce qui minimiserait l'impact du froid sur nos canards et entrainerait un effet visible du froid uniquement lorsque les capacités d'isolement ne sont pas encore mises en place. Malheureusement nous n'avons pas encore effectué d'expérience complémentaire afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Sur la base des résultats obtenus, on peut donc supposer que pour améliorer l'efficacité mitochondriale afin de produire de la chaleur pour un moindre coût, il y ait une optimisation extrêmement rapide des capacités énergétiques du muscle pectoral. Cette amélioration de la fonction mitochondriale pourrait être médiée par un remodelage des réseaux mitochondriaux comme cela a été suggéré chez le manchot Adélie dans la première partie de cette étude (Fongy *et al.*, 2013). Cette hypothèse est renforcée par l'augmentation de l'abondance des protéines de fusion Mfn2 et OPA1 au cours des premiers jours d'exposition au froid. Cependant, à partir de 15 jours d'exposition au froid il n'y a plus aucune différence d'abondance des protéines de fusion dans nos deux groupes. Ces résultats suggèrent des modifications précoces et rapides des capacités énergétiques mitochondriales en réponse à une augmentation du métabolisme. Ces modifications feraient intervenir une biogenèse et une ramification du réseau mitochondrial des cellules musculaire.

V - Conclusion

- **Cette étude montre pour la première fois l'évolution des capacités énergétiques musculaires au cours de la croissance chez le canard de Barbarie, exposé ou non à une contrainte thermique. Les processus énergétiques mis en jeu au cours de la croissance au froid semblent, dans ce modèle, différents de ceux décrits chez le manchot Adélie.**
- **Tout d'abord, chez le canard de Barbarie, la croissance ne semble pas induire de hausse du métabolisme suffisante pour stimuler les capacités oxydatives mitochondriales. De plus, bien qu'une augmentation rapide des capacités énergétiques du muscle pectoral soit observée lors des premiers jours de froid, cette amélioration du « système » disparaît au-delà de 15 jours de froid. On observe donc une absence de corrélation entre activité respiratoire mitochondriale et abondance relative des protéines de fusion au cours des 4 semaines d'exposition à 4°C.**
- **Le froid semble être une contrainte énergétique suffisante pour engendrer des modifications métaboliques rapides chez l'oiseau. Par contre, le canard de Barbarie, semble développer de manière extrêmement rapide et efficace des processus énergétiques suffisant pour assurer une thermogénèse en parallèle de sa croissance. Il n'y a donc plus de nécessité pour la cellule musculaire de stimuler ses capacités mitochondriales.**

Étude 3

Etude 3

Régulation des protéines de fusion : dépression métabolique / statut endocrine ?

Partie 1 : Effet d'un jeûne alimentaire de 60h sur la bioénergétique mitochondriale et l'expression des protéines de fusion.

I - Introduction

Les résultats obtenus dans les deux premières études laissent à penser que chez l'oiseau, l'organisation mitochondriale musculaire peut être semblable à celle décrite chez les mammifères, mettant en jeu des protéines de fusion similaires aux protéines Mfn2 et OPA1 impliquées dans la formation de réseaux mitochondriaux. Ces réseaux pourraient être dynamiques comme le suggèrent les variations de l'expression de ces protéines dans le muscle squelettique, avec la croissance et l'exposition aiguë au froid. Cette réorganisation potentielle des réseaux mitochondriaux est corrélée à l'activité métabolique des fibres musculaires et pourrait donc jouer un rôle important dans la modulation de l'activité énergétique musculaire lors d'un accroissement de la demande métabolique (Fongy *et al.*, 2013).

Si une augmentation de l'expression de ces protéines est associée à une plus forte activité métabolique, il serait intéressant de vérifier si l'inverse peut également être observé, c'est à dire si une diminution de l'activité métabolique pourrait être associée à une diminution de l'abondance des protéines de fusion reflétant une déstructuration du réseau mitochondrial. L'exemple du jeûne alimentaire semble pertinent pour étudier ce paramètre car dans leur environnement naturel, les oiseaux, et notamment les manchots, sont régulièrement soumis à des phases de restrictions ou de privations totales d'alimentation, associées à de fortes diminutions de leur métabolisme.

Le but de cette première partie est d'étudier l'impact d'un jeûne alimentaire sur l'activité métabolique, appréciée à différents niveaux d'organisation, de l'animal entier jusqu'aux mitochondries, et l'expression des protéines de fusion chez le canard de Barbarie.

II - Matériels et Méthodes

Les canetons de Barbarie (pédigrée R51, INRA) ont été élevés à l'animalerie dès l'âge de 1 jour. La nourriture et la boisson ont été fournies *ad libitum*. A l'âge de 40 jours, 13 canards ont été séparés en deux groupes, et 7 d'entre eux ont été privés de nourriture, seule l'eau de boisson leur était fournie pendant toute la période de jeûne alimentaire. Afin d'établir un suivi de la décroissance pondérale, les canards ont été pesés tous les jours.

La dépense énergétique de repos a été mesurée à 25°C par calorimétrie indirecte pendant 4 à 6 heures sur 4 canards nourris et sur les mêmes oiseaux après 48h de jeûne. Après 60 heures de jeûne, les canetons ont été mis à mort par décapitation, en alternant chaque fois un canard à jeun et un canard Témoin.

Pour chaque canard, le muscle pectoral a été prélevé. Une partie du prélèvement a été immédiatement congelée en azote liquide puis conservée à -80°C pour l'analyse ultérieure de l'expression des protéines de fusion. Le reste du prélèvement a été utilisé immédiatement pour étudier en parallèle l'activité bioénergétique des fibres musculaires perméabilisées et l'activité bioénergétique des mitochondries isolées.

Les résultats présentés correspondent aux moyennes \pm sem et ont été analysés avec le logiciel Statview 5.0 (Abacus Concept, Berkeley). Pour tester les différences entre les groupes, les moyennes ont été comparées en effectuant des ANOVA suivies d'un test de Fisher, sauf pour la dépense énergétique où les canards représentaient leur propre témoin (nourri puis à jeun). Un test t apparié a alors été réalisé avec le même logiciel. Le seuil de significativité a été choisi à $p < 0,05$.

III - Résultats

1 - La masse corporelle

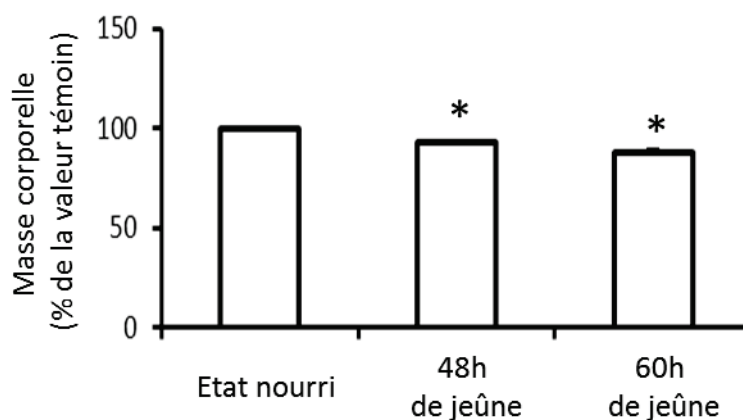


Figure 57 : Diminution de la masse corporelle après 48h et 60h de jeûne par rapport à la valeur témoin ($1,67 \pm 0,14$ kg) correspondant aux mêmes canards à l'état nourri *ad libitum* ($n = 4$). Les valeurs correspondent aux moyennes \pm sem ; * $p < 0,05$.

A partir d'une masse corporelle moyenne de $1,67 \pm 0,14$ kg, les canards à jeun ont perdu du poids. On observait une diminution significative de la masse corporelle, de 8% après 48h de jeûne et de 13% après 60h de jeûne par rapport à leur masse à l'état nourri (Figure 57).

2 - La dépense énergétique de repos



Figure 58 : Comparaison de la dépense énergétique de repos de canards à l'état nourri *ad libitum* (Témoin) puis à jeun depuis 48h ($n=4$). * $p < 0,05$ vs témoin nourri.

Pour s'affranchir de la différence de masse corporelle entre les différents groupes, la dépense énergétique (DE) a été exprimée en $W/kg^{0,67}$. La DE de repos était significativement réduite de 11% après 48h de jeûne. Le quotient respiratoire correspondant au rapport entre la production de CO_2 et la consommation d' O_2 , passait de $0,92 \pm 0,02$ à l'état nourri à $0,76 \pm$

0,01 après un jeûne de 48h ce qui caractérise le passage d'un métabolisme principalement basé sur l'oxydation des glucides à un métabolisme privilégiant l'oxydation des lipides.

3 - Activité bioénergétique des fibres musculaires perméabilisées

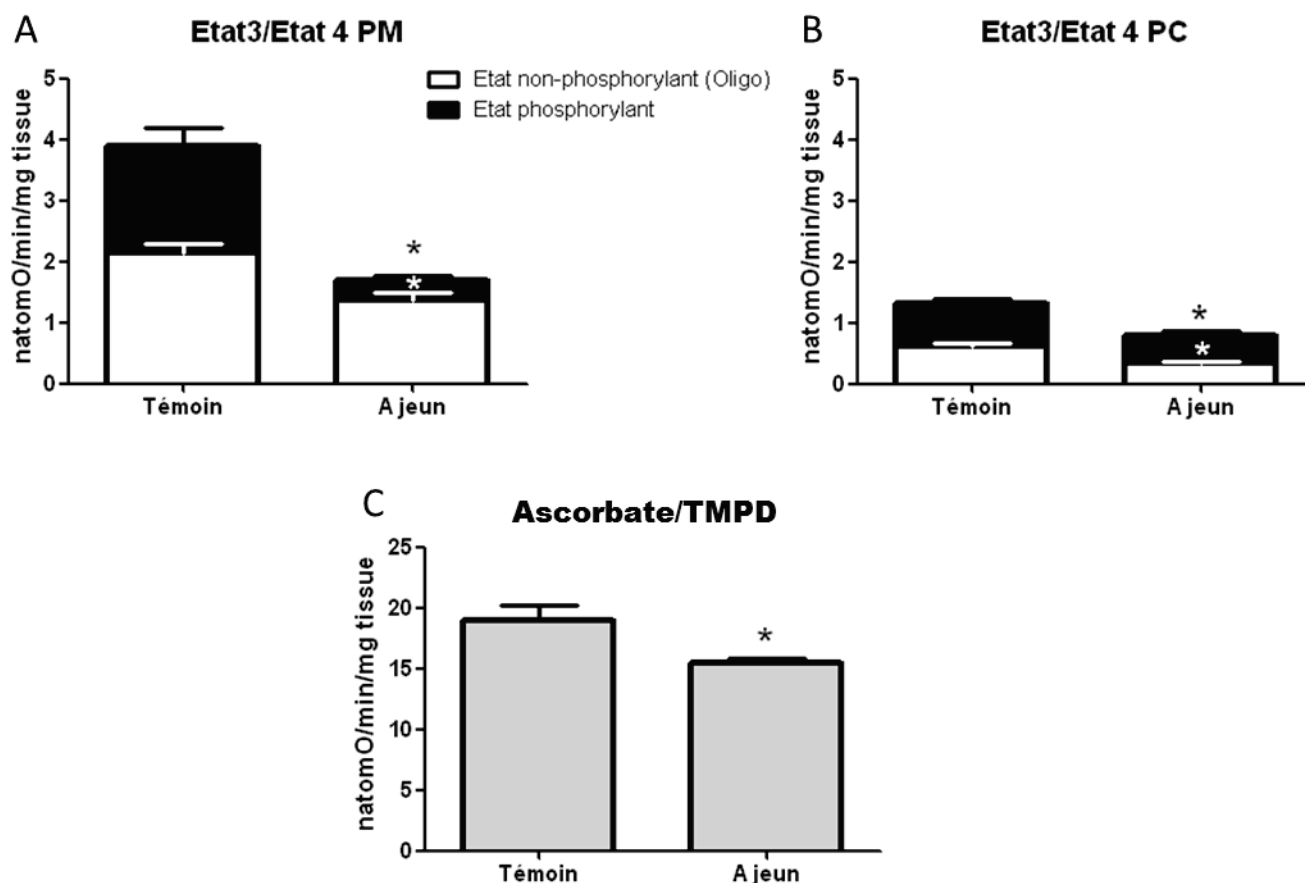


Figure 59 : Consommation d'oxygène (natomO/min/mg de muscle) des fibres perméabilisées du muscle pectoral de canards à jeun depuis 60h par comparaison avec des canetons témoins nourris *ad libitum*. La respiration est initiée soit par (A) 5 mM de pyruvate/2,5 mM de malate + 5 mM de succinate (PMS) soit par (B) 40 μ M de palmitoyl-L-carnitine/2,5 mM de malate (PCM). L'état phosphorylant est obtenu par ajout de 1 mM d'ADP puis l'état non phosphorylant est déterminé par ajout de 1,25 μ g/mL d'oligomycine. (C) L'activité maximale de la Cytochrome-c Oxydase est mesurée après addition de 2 μ M de FCCP, 2,5 μ M d'antimycine A, 2,5 mM d'ascorbate, et 0,25 mM de TMPD. Les résultats représentent les moyennes \pm sem; n=6. Les étoiles (*) correspondent à des différences significatives avec $p < 0,05$. L'état phosphorylant est toujours significativement supérieur à l'état non phosphorylant.

L'effet d'un jeûne alimentaire de 60 heures sur l'énergétique musculaire a été étudié sur des fibres perméabilisées de pectoral. Deux types de substrats énergétiques ont été utilisés, un substrat d'origine glucidique (PMS) et un substrat d'origine lipidique (PCM) (Figure 59A et B). Quel que soit le substrat, l'activité respiratoire des fibres perméabilisées du muscle pectoral était fortement diminuée par le jeune alimentaire (état phosphorylant : -57% et -40% respectivement pour PMS et PCM, et état non phosphorylant : -37% et -47%).

Le rapport de contrôle respiratoire (RCR), correspondant au rapport de l'état phosphorylant sur l'état non phosphorylant et donnant une idée du niveau de couplage des mitochondries, était également affecté de manière importante par le jeûne alimentaire avec l'utilisation des substrats glucidiques. En effet il passait de 1,8 à l'état nourri, ce qui correspond déjà à un niveau de couplage faible des mitochondries, à 1,24 suggérant un découplage important des oxydations phosphorylantes ou une forte diminution de l'efficacité mitochondriale dans la production d'ATP. La respiration en présence d'ascorbate-TMPD et FCCP, traduisant l'activité de la COX mitochondriale, était également diminuée par le jeûne alimentaire bien que dans une moindre mesure (-18% ; Figure 6C).

4 - L'activité mitochondriale

- Respiration des mitochondries isolées

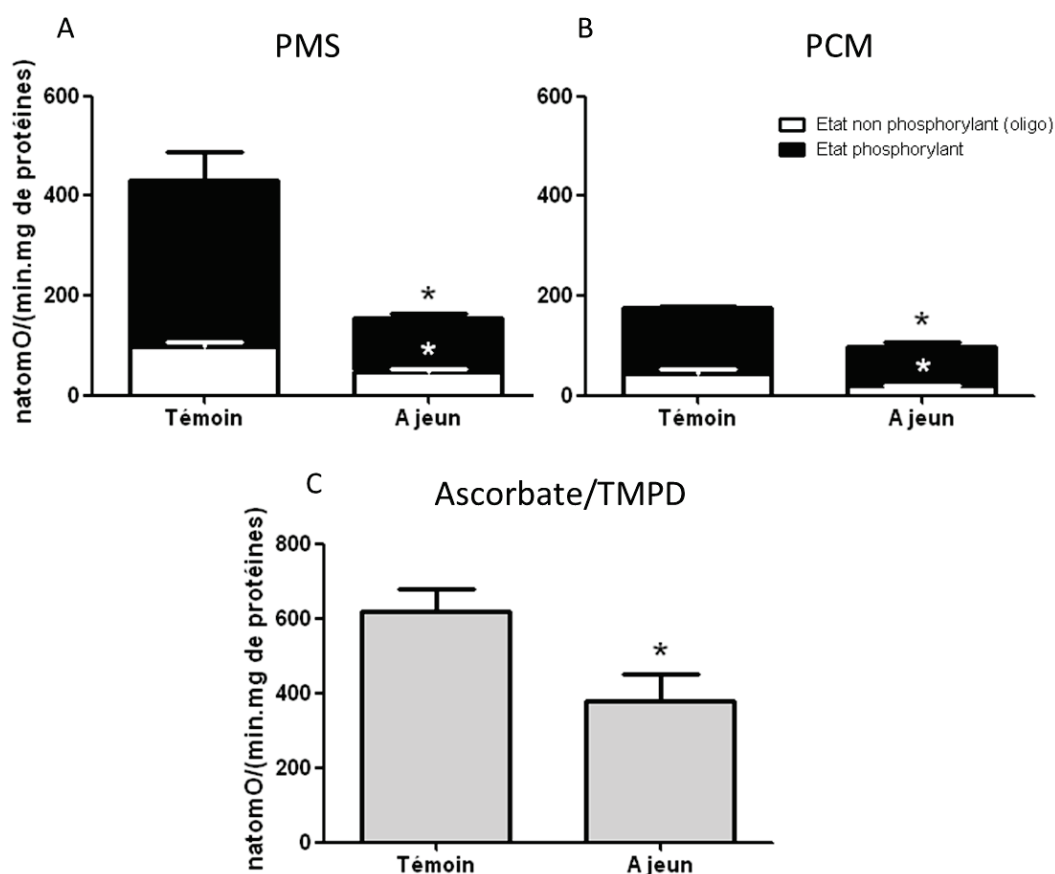


Figure 60 : Consommation d'oxygène (natomO/min/mg de protéines) des mitochondries isolées du muscle pectoral de canards à jeun depuis 60h par comparaison avec des canetons témoins nourris *ad libitum*. La respiration est initiée soit par (A) 5 mM de pyruvate/2,5 mM de malate + 5 mM de succinate (PMS) soit par (B) 40 μM de palmitoyl-L-carnitine/2,5 mM de malate (PCM). L'état phosphorylant est obtenu par ajout de 500 μM d'ADP puis l'état non phosphorylant est déterminé par ajout de 2,5 μg/mL d'oligomycine. (C) L'activité maximale de la Cytochrome-c Oxydase est mesurée après addition de 2 μM de FCCP, 2,5 μM d'antimycine A, 4 mM d'ascorbate et 0,5 mM de TMPD. Les résultats représentent les moyennes ± sem ; n=6. Les étoiles (*) correspondent à des différences significatives avec p<0,05. L'état phosphorylant est toujours significativement supérieur à l'état non phosphorylant.

L'activité mitochondriale mesurée sur les mitochondries isolées (IMF + SS) du muscle pectoral des canards à jeun depuis 60h était fortement diminuée aussi bien avec le substrat glucidique (PMS) (état 3 : -64% ; état 4 : -50%) qu'avec un substrat d'origine lipidique (PCM) (état 3 : -45% ; état 4 : -56%). L'activité COX mitochondriale était également diminuée (-39%). Le jeûne n'était pas associé à de grandes variations du RCR avec les deux substrats utilisés suggérant l'absence d'altération marquée du couplage des oxydations phosphorylantes.

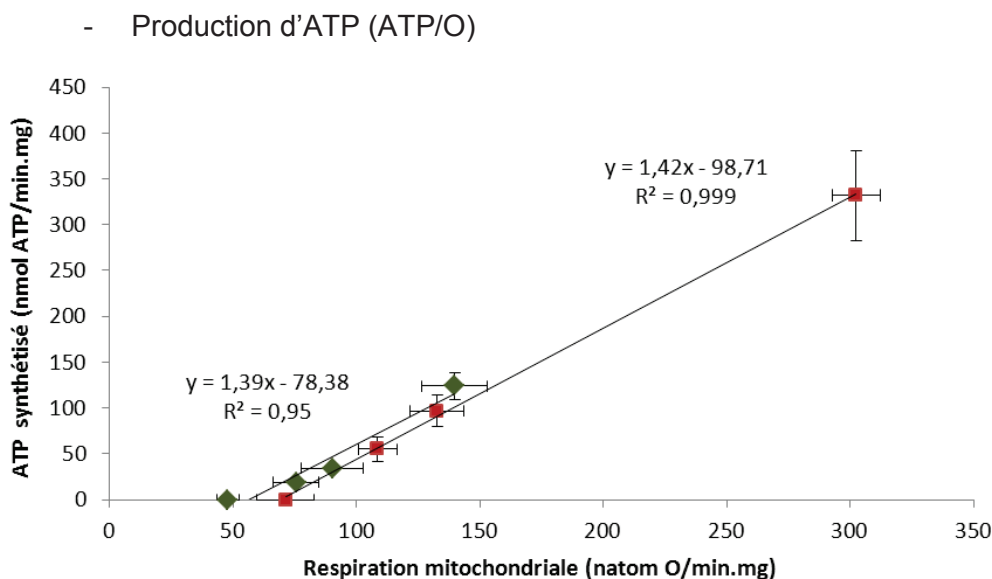


Figure 61 : diminution de la capacité maximale de production d'ATP (rapport ATP/O) après un jeûne de 60h.

Afin d'apprécier l'efficacité fonctionnelle des mitochondries musculaires nous avons mesuré en parallèle la production d'ATP et la consommation d'oxygène. Comme attendu, la production d'ATP était linéairement liée à la consommation d'oxygène mais les niveaux d'activité mitochondriale étaient très diminués par le jeûne alimentaire. La production maximale d'ATP (état phosphorylant) était ainsi fortement diminuée (-63%) de même que la respiration associée. Par contre, que les oiseaux soient nourris ou à jeun, les courbes restaient très parallèles, presque superposées, indiquant une même efficacité mitochondriale. Ces résultats indiquent que le rendement mitochondrial en termes d'ATP synthétisé par oxygène consommé n'était pas affecté par le jeûne alimentaire, mais que la capacité maximale de production d'ATP était diminuée.

5 - Expression des protéines de fusion

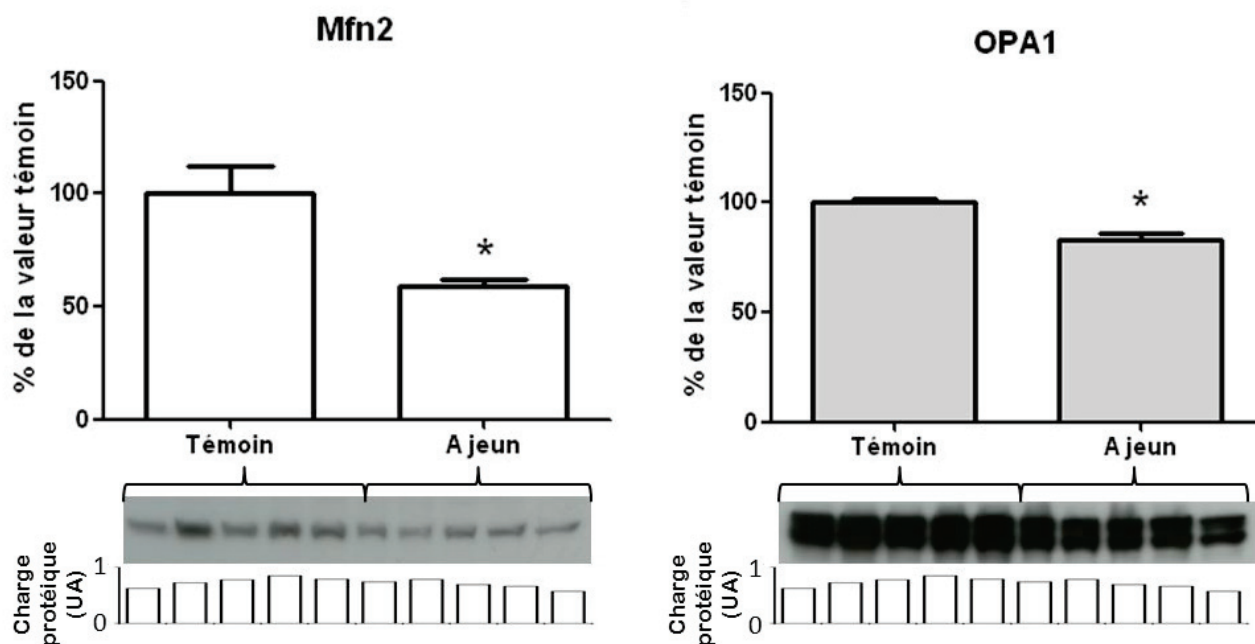


Figure 62 : Abondance relative des protéines de fusion mitofusine 2 (Mfn2 ; 86 kDa) et optic atrophy 1 (OPA1 ; 90-110 kDa) analysée par western blot sur des mitochondries isolées de canetons témoins nourris *ad libitum* ou à jeun. L'homogénéité de quantité de protéines mitochondriales déposée (50 μ g) a été contrôlée par une coloration au rouge ponceau et les intensités relatives ont été représentées sous chaque film de révélation. Les résultats représentent les moyennes \pm sem ; n=5. Les étoiles (*) correspondent à des différences significatives avec $p < 0,05$.

L'abondance des protéines de fusion était fortement affectée par le jeûne alimentaire (Figure 62). En effet, on observait une diminution significative de l'abondance relative des protéines Mfn2 et OPA1 (respectivement -41% et -17%, $p < 0,05$). La quantité de mitochondries extraite par gramme de muscle pectoral n'était quant à elle pas modifiée par le statut nutritionnel ($0,7 \pm 0,1$ mg/g).

7 - Corrélation entre expression des protéines de fusion et activité bioénergétique

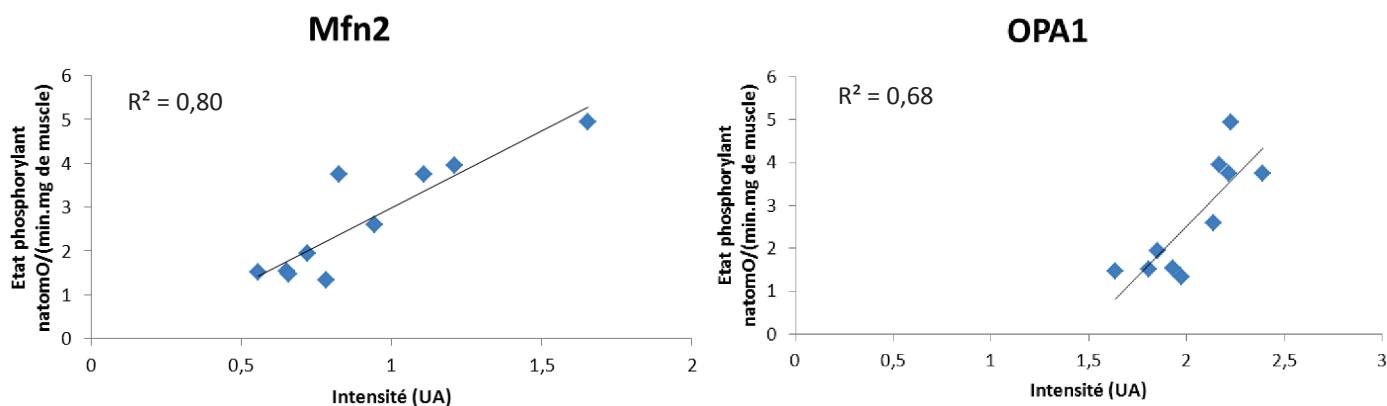


Figure 63 : Corrélation entre l'activité respiratoire des fibres musculaires (état phosphorylant, natomO/min/mg de muscle pectoral) et l'abondance relative des protéines de fusion mitochondriale Mfn2 et OPA1 chez les canetons en fonction de leur statut nutritionnel (nourris ou à jeun depuis 60h). Chaque point correspond à un caneton différent, n=5 témoins et n=5 à jeun. Les corrélations sont significatives pour les deux protéines de fusion ($p < 0,05$)

La diminution de l'activité respiratoire des fibres perméabilisées du muscle pectoral obtenue avec le substrat PMS était corrélée positivement avec la diminution de l'abondance relative des protéines de fusion Mfn2 ($n=10$; $R^2=0,80$; $p < 0,05$) et OPA1 ($n=10$; $R^2=0,68$; $p < 0,05$) observée après un jeûne alimentaire de 60 heures. Ces résultats suggèrent que le jeûne alimentaire réduit l'abondance de ces deux protéines de fusion dans le muscle pectoral ce qui pourrait participer à la diminution de l'activité respiratoire des fibres perméabilisées.

IV - Discussion

Dans leur environnement naturel, les animaux et notamment les oiseaux, sont régulièrement contraints à des phases de restriction alimentaire plus ou moins longues liées à la disponibilité en nourriture, aux températures extrêmes ou aux périodes de reproduction. Ces phases de jeûne sont associées à une dépression marquée du métabolisme énergétique mise en place pour permettre à l'organisme de consommer un minimum de substrat et survivre le plus longtemps possible. Le but de notre étude était de rechercher, si

une diminution du métabolisme énergétique pouvait être associée à des modifications de l'abondance relative des protéines de fusion mitochondriale Mfn2 et OPA1 chez l'oiseau.

1 - Jeûne alimentaire et métabolisme

In vivo, dès 48h de privation de nourriture, une diminution de la masse corporelle et de la dépense énergétique est observée. Ces résultats sont conformes à ce qui était attendu puisqu'une dépression métabolique accompagne classiquement la privation d'alimentation (Duchamp *et al.*, 1989; Groscolas and Robin, 2001; Kleiber, 1961; Le Maho *et al.*, 1976). Au vu de la vitesse de perte de masse similaire après 48 ou 60h de jeûne, on peut supposer que les canards se situaient en phase 2 de jeûne (Groscolas and Robin, 2001; Le Maho *et al.*, 1976), une période caractérisée par une forte utilisation des lipides comme substrats énergétiques pour privilégier l'épargne protéique (Groscolas and Robin, 2001). La diminution du QR chez les canetons à jeun conforte cette interprétation.

Ex vivo cette dépression métabolique se traduisait par une forte diminution de l'activité respiratoire mitochondriale observée sur des fibres perméabilisées et des mitochondries isolées. Une diminution de l'activité respiratoire des mitochondries musculaires a déjà été observée chez des poussins de manchot royal (Duchamp *et al.*, 1991) mais après plusieurs mois de jeûne naturel sur la colonie, un jeûne plus court d'une durée de 3 semaines n'était pas suffisant pour affecter la respiration mitochondriale. Comme le muscle squelettique contribue pour près de 28% à la dépense énergétique de repos chez le caneton (Duchamp and Barré, 1993), la réduction de la respiration mitochondriale de 40 à 60% observée chez les canetons à jeun pourrait contribuer pour une bonne part à la réduction de la dépense énergétique (-11%) de l'oiseau. Ainsi la modulation de l'activité métabolique musculaire pourrait jouer un rôle important dans le passage à un métabolisme d'économie qui caractérise le jeûne alimentaire prolongé. De façon intéressante, nous avons observé que la respiration mitochondriale tendait à être d'avantage diminuée avec les substrats d'origine glucidique (PMS) qu'avec les substrats d'origine lipidique (PCM). Cette réduction différentielle de la respiration, qui a été observée avec les mitochondries et les fibres musculaires perméabilisées, pourrait contribuer à un shift du métabolisme vers l'utilisation préférentielle des substrats lipidiques au cours du jeûne alimentaire (e.g. chez l'homme après 48h de jeûne (Wijngaarden *et al.*, 2013)). Il est probable que la disponibilité des différents substrats doit également jouer un rôle prépondérant. Ainsi, la mobilisation accrue du tissu adipeux au cours du jeûne alimentaire et donc des acides gras alimentant le métabolisme lipidique (Jensen *et al.*, 2001), doit largement intervenir.

Nos résultats montrent pour la première fois que le jeûne alimentaire affecte les capacités fonctionnelles des mitochondries musculaires en termes de production d'ATP. Ce résultat pourrait être relié à une forte diminution de l'abondance de l'ATP synthase dans les mitochondries musculaires après le jeûne en liaison avec une diminution de la sécrétion des hormones contrôlant l'expression de cette enzyme. Les hormones thyroïdiennes, par exemple, dont les concentrations circulantes sont réduites chez l'oiseau qui jeûne (Cherel *et al.*, 1988b) pourraient contribuer à cet effet. Si la capacité maximale de production d'ATP était réduite, le rendement de l'oxydation phosphorylante qui peut être assimilé au rapport entre la quantité d'ATP produite et la quantité d'oxygène consommée (rapport ATP/O) n'était quant à lui, pas affecté par le jeûne alimentaire. Cela pourrait impliquer une inhibition coordonnée des oxydations cellulaires. Aussi bien avec les fibres perméabilisées qu'avec les mitochondries isolées, nous avons effectivement observé une diminution de la respiration en réponse à l'ascorbate-TMPD, le substrat de la cytochrome-c oxydase mitochondriale. Comme la quantité de protéines mitochondriales extraites par unité de masse de muscle pectoral n'était pas modifiée en fonction du statut nutritionnel, cette diminution de la COX suggère une inhibition de l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire par des mécanismes qui restent à préciser. On pourrait imaginer que des dérivés métaboliques des hormones thyroïdiennes obtenus après désiodation, désamination ou décarboxylation, et dont la production est modulée par le statut nutritionnel (Dentice and Salvatore, 2011; Gereben *et al.*, 2008) pourraient contribuer aux effets observés sur les mitochondries en modulant les oxydations et les phosphorylations (Cumero *et al.*, 2012).

2 - Jeûne alimentaire et protéines de fusion

Notre étude chez l'oiseau montre une diminution de l'abondance des protéines de fusion après 60h de jeûne alimentaire. Cette réduction était corrélée à la diminution de la respiration des fibres perméabilisées au cours du jeûne alimentaire ($R^2 = 0,8$; $p < 0,05$ pour Mfn2 et $R^2 = 0,7$; $p < 0,05$ pour OPA1). Ces résultats ne sont pas en accord avec des données chez les mammifères, où il a été montré que dans des situations de fortes demandes énergétiques comme la restriction alimentaire ou l'exposition à différents stress énergétiques (froid, exercice), on observe une forte augmentation du réseau mitochondrial fusionné pour optimiser la fonction mitochondriale (Westermann, 2012). Une étude chez la souris a montré qu'un jeûne alimentaire de 48h entraînait dans le cœur une augmentation des ARNm de la Mfn2 associée à une augmentation des transcrits de PGC1 α (Li *et al.*, 2009). Toutefois aucune étude n'a exploré les variations des protéines de fusion dans le muscle squelettique. Cette divergence apparente entre nos résultats et ceux de la littérature

pourrait être reliée à l'intensité différente et à des durées différentes de la contrainte énergétique imposée au muscle. Dans de nombreuses études le jeûne alimentaire est considéré comme une situation de forte demande énergétique au même titre que l'exposition au froid ou l'exercice physique car il entraîne dans le muscle squelettique une activation de l'AMPK associée à une augmentation du facteur de transcription PGC1 α , un important activateur de la biogenèse et de l'activité mitochondriales (de Lange *et al.*, 2007; Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011). Cependant, cette activation métabolique observée lors d'une restriction alimentaire n'est que transitoire, et après 12h de jeûne chez le rat par exemple, l'expression de ces mêmes transcrits est au contraire diminuée (de Lange *et al.*, 2007). On peut donc penser que selon les organes ou l'espèce, l'impact et la durée du stress imposé par le jeûne alimentaire seraient différents. Notre étude représente un jeûne prolongé qui pourrait être associée à une diminution des transcrits de PGC1 α , comme ce qui est observé chez le manchot royal après plusieurs jours de jeûne (Rey *et al.*, 2010), et ainsi à la diminution des protéines de fusion (Li *et al.*, 2009). Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse en réalisant, chez le canard, une étude sur un jeûne alimentaire de plus courte durée (6 à 12h) et peut être de durée plus longue afin d'étudier les variations de l'abondance des protéines de fusion en fonction de la durée de la privation d'alimentation. On pourrait tout à fait imaginer une première réponse consistant à faire face à la contrainte énergétique imposée en activant les processus de biogenèse et de fusion mitochondriales afin d'optimiser au maximum l'activité respiratoire puis lorsque la contrainte perdure, une réponse opposée consistant à diminuer au maximum le métabolisme énergétique en faisant appel à des processus de fission et de diminution de la quantité de mitochondries. Une fragmentation accrue du réseau mitochondrial, liée à la moindre abondance des protéines de fusion, pourrait peut-être faciliter des processus d'autophagie ou de mitophagie connus pour être stimulés dans des situations de privation d'alimentation (Kim and Lemasters, 2011; Mizushima and Klionsky, 2007; Rambold and Lippincott-Schwartz, 2011) ce qui contribuerait par la suite à réduire l'abondance des mitochondries dans le muscle squelettique et donc à diminuer encore la dépense énergétique si le jeûne se prolonge.

V - Conclusion

- Grâce à un modèle naturel de forte diminution du métabolisme énergétique, le jeûne alimentaire prolongé (60h) à TN, notre étude met en évidence un lien étroit entre l'intensité de l'activité mitochondriale et l'abondance relative des protéines de fusion, suggérant une optimisation de l'activité mitochondriale lorsque les mitochondries sont fortement fusionnées et forment des réseaux.
- Ce résultat est en accord avec l'hypothèse émise dans l'étude 2, selon laquelle l'intensité de la respiration mitochondriale serait fortement corrélée à l'abondance relative des protéines de fusion.
- Si notre étude suggère qu'un jeûne de 60h pourrait être associé à une désorganisation du réseau mitochondrial musculaire, la validation de cette hypothèse nécessite des études d'imagerie mitochondriale afin de visualiser la dynamique de ces réseaux et vérifier si les modifications observées de l'abondance des protéines de fusion conduisent effectivement à altérer les réseaux cellulaires.

Partie 2 : Effets des hormones thyroïdiennes sur la bioénergétique mitochondriale et l'expression des protéines de fusion.

I - Introduction

La première partie de cette étude a permis de trouver une autre situation physiologique, le jeûne alimentaire, où l'intensité de l'activité métabolique musculaire est positivement liée à l'abondance relative des protéines de fusions. La réduction de l'activité métabolique lors du jeûne alimentaire et son augmentation au froid sont liées pour partie à des variations de la sécrétion des hormones métaboliquement actives. Ainsi, la privation d'alimentation est classiquement associée à une réduction des concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes (3,5,3'-triiodo-L-thyronine, T_3) (Holloway *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 2003). A l'inverse, l'activation du métabolisme énergétique observée au froid est associée à une augmentation des concentrations circulantes de T_3 chez le caneton (Rey *et al.*, 2010). On peut donc se demander si ces hormones jouent un rôle dans les variations d'expression des protéines de fusion observées lors d'une exposition au froid ou lors de la privation d'alimentation.

Les mitochondries sont bien connues pour être des cibles de l'action des hormones thyroïdiennes qui contrôlent l'expression de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales ou qui peuvent agir directement sur ces organites (Tata, 2012; Wrutniak-Cabello *et al.*, 2001). Ainsi, dès 30 minutes de traitement à la T_3 , on peut observer une activation du métabolisme qui serait due à une action directe sur des cibles mitochondriales spécifiques possédant un site de liaison de la T_3 comme l'ANT (Sterling, 1986) ou la protéine p28 située sur la membrane interne mitochondriale et co-localisée avec certaines protéines de la chaîne respiratoire et les UCPs (Sterling *et al.*, 1984). La protéine p43 a également été caractérisée comme un récepteur mitochondrial de la T_3 , dont la surexpression dans le muscle squelettique augmente la transcription mitochondriale, la biogenèse et la respiration et induit un shift métabolique et contractile entraînant une augmentation de la proportion des fibres lentes oxydatives (Casas *et al.*, 2008; Casas *et al.*, 1999). La T_3 a également une influence directe sur les modifications de l'expression du génome mitochondrial. Lors de l'administration de T_3 à des rats hypothyroïdiens, on observe, en effet, une augmentation de la quantité des ARNm mitochondriaux de 2 à 8 fois en fonction des tissus (Mutvei *et al.*, 1989; Wiesner *et al.*, 1992). L'hyperthyroïdie est classiquement associée à une

augmentation de la densité des membranes internes mitochondriales et à des modifications de leur composition phospholipidique et protéique (Bangur *et al.*, 1995; Brand *et al.*, 1992). Ces modifications de composition membranaire entraînent une perméabilité accrue et donc une fuite de protons à travers la membrane interne mitochondriale ce qui contribue à la forte intensité des oxydations mitochondriales qui caractérisent l'hyperthyroïdie (Tata, 2012). Puisque les hormones thyroïdiennes contrôlent à la fois le nombre et l'activité métabolique des mitochondries, elles pourraient être impliquées dans l'organisation de leurs réseaux en modulant l'expression des protéines de fusion.

Le but de cette partie est d'étudier l'influence de modifications pharmacologiques du statut thyroïdien sur le métabolisme énergétique musculaire et l'expression des protéines de fusion chez le canard de Barbarie.

II - Matériels et méthodes

1 - Animaux

Des canetons de Barbarie ont été utilisés après avoir modifié pharmacologiquement leur statut thyroïdien au cours de la croissance à 25°C.

Nous avons ainsi séparé 21 canetons en 3 groupes de masses homogènes à l'âge de 7 jours et les avons traités pendant 4 semaines comme suit :

Groupe Témoin euthyroïdien : ces canetons ont reçu des injections sous cutanées (SC) quotidiennes de sérum physiologique alcalin (NaCl 0,9%, NaOH 0,1 M) et des injections intrapéritonéales (IP) de sérum physiologique (0,05 M) tous les 2 jours pour s'affranchir des effets du stress liés à la capture et aux injections des substances pharmacologiques reçus par les autres oiseaux.

Groupe IOP + PTU : ces canetons ont reçu du 6n-propyl-2-thiouracile (PTU) (1g/L) dans l'eau de boisson afin d'inhiber la synthèse des hormones thyroïdiennes et une injection IP tous les 2 jours d'acide iopanoïque (IOP) (2 mg/kg) dans le but d'inhiber la conversion, catalysée par les 5'-désiodases tissulaires, de la 3,5,3',5'-tétraiodo-L-thyronine (T_4) en T_3 , la forme active de l'hormone. Par cette double action pharmacologique, les canetons développent une carence progressive en T_3 caractéristique d'un statut hypothyroïdien (Rey *et al.*, 2010). Ces canards ont également reçu une injection SC tous les 2 jours de sérum physiologique (NaCl 0,9%, NaOH 0,1 M).

Groupe IOP + PTU + T₃ : ces canetons ont reçu le même traitement que le groupe IOP + PTU avec en plus une injection SC de T₃ (10 µg/100 g dans NaCl 0,9%, NaOH 0,1 M) par jour. Ce traitement permet d'obtenir des canards hypothyroïdiens compensés en T₃, c'est-à-dire avec un taux de T₃ circulante au moins égal au groupe Témoin. Les différences observées entre ce groupe et le groupe IOP + PTU sont donc dues uniquement à l'effet de la T₃.

2 - Protocole expérimental

Contrairement à la partie sur l'effet du jeûne alimentaire qui a été réalisée sur le muscle pectoral, cette partie a été réalisée sur le quadriceps. En effet, la petite taille des canards du groupe IOP + PTU, a imposé l'utilisation d'un muscle de masse plus importante, présentant des caractéristiques plus oxydatives, afin d'avoir une quantité de tissu suffisante pour toutes les expérimentations.

Pour chaque canard, une partie du prélèvement a été immédiatement congelée en azote liquide puis conservée à - 80°C, pour l'analyse biochimique de l'expression des protéines de fusion, et la seconde partie du prélèvement a été utilisée immédiatement pour étudier en parallèle l'activité bioénergétique des mitochondries isolées et l'activité bioénergétique des fibres musculaires perméabilisées.

3 - Analyses statistiques

Tous les résultats présentés correspondent aux moyennes ± sem et ont été analysés avec le logiciel Statview 5.0 (Abacus Concept, Berkeley). Pour tester les différences entre les groupes, les moyennes ont été comparées en effectuant des ANOVA suivies d'un test de Fisher. Le seuil de discrimination a été choisi à $p < 0,05$.

III - Résultats

1 - Modifications physiologiques

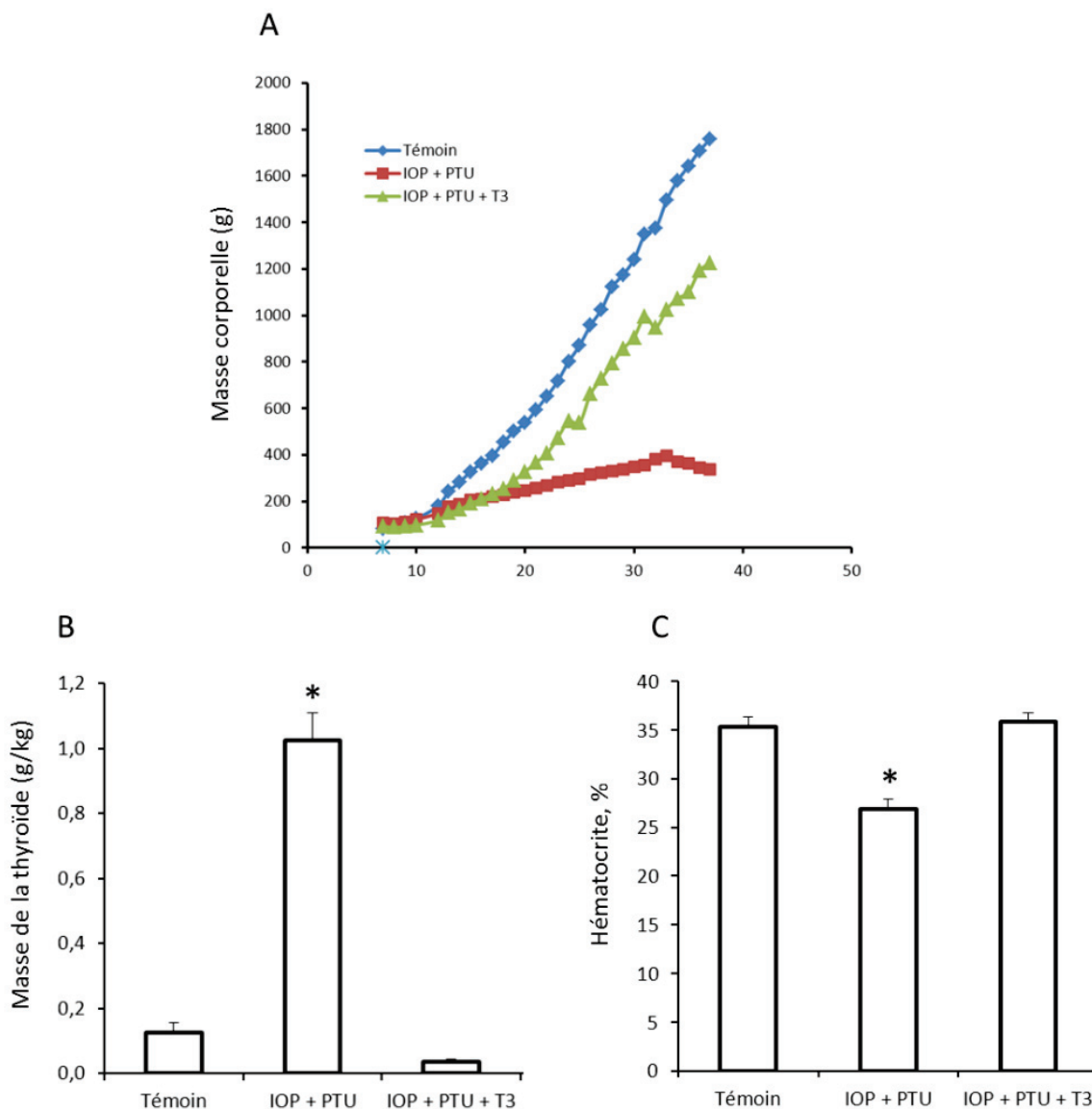


Figure 64 : Paramètres physiologiques mesurés pour vérifier l'effet des traitements. (A) Courbe de croissance pondérale des canetons en fonction de leur statut endocrine (Témoin ; IOP + PTU (n=7) ; IOP + PTU + T₃ (n=5)). (B) Masse relative des thyroïdes. (C) Hématocrite. Les valeurs correspondent aux moyennes ± sem ; *p<0.05 vs témoin.

En absence de dosage des concentrations circulantes de T₃, nous avons utilisé différents paramètres physiologiques afin d'estimer indirectement les effets des traitements pharmacologiques. Dans un premier temps, nous avons mesuré quotidiennement la masse

pondérale des canards, qui était fortement affectée par les traitements (Figure 64A). Le traitement PTU + IOP, utilisé pour bloquer la production endogène de T_3 et induire une hypothyroïdie, entraînait un ralentissement marqué et rapide de la croissance. La compensation des effets PTU + IOP par l'injection de T_3 exogène corrigeait en grande partie mais pas totalement le retard de croissance. Après 1 mois de traitement, les canards IOP + PTU et IOP + PTU + T_3 avaient une masse inférieure aux Témoins (respectivement -77% et -32%). Le deuxième paramètre que nous avons examiné est la masse des thyroïdes (Figure 64B). La thyroïde est composée chez l'oiseau de deux lobes qui ont été prélevés et pesés. Les résultats exprimés en masse relative de thyroïde (g/kg de masse corporelle) montraient une très large hypertrophie de la thyroïde, qui était 8 fois plus grosse ($p < 0,05$) chez les canards traitées au IOP + PTU que chez les témoins. La compensation du traitement IOP + PTU par la T_3 corrigeait cette hypertrophie avec même une tendance à une légère atrophie laissant penser que l'hypothyroïdie engendrée par le traitement IOP + PTU était au moins corrigée par l'apport exogène de T_3 . Le dernier paramètre indirect qui a été observé est l'hématocrite puisque l'hématopoïèse est notamment contrôlée par la T_3 . Comme le montre la figure 64C, le traitement IOP + PTU réduisait significativement l'hématocrite (-24% ; $p < 0,05$) par comparaison avec les témoins. La T_3 corrigeait totalement les effets du IOP associé au PTU.

2 - La dépense énergétique de repos

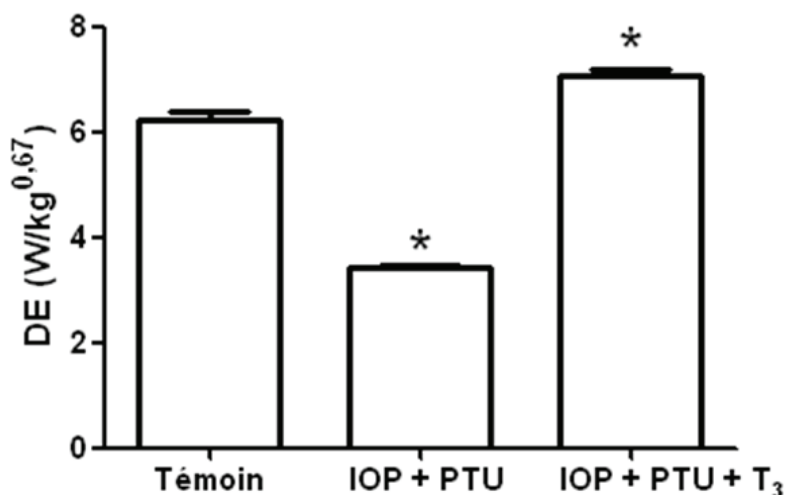


Figure 65 : Dépense énergétique de repos des canards en fonction du statut thyroïdien (Témoin et IOP + PTU (n=7) ; IOP + PTU + T_3 (n=5)).

Pour s'affranchir de la grande différence de masse corporelle entre les différents groupes, la dépense énergétique (DE) a été exprimée en $W/kg^{0,67}$, unité classiquement utilisée pour comparer la dépense énergétique par unité de masse lorsqu'il y a une grande disparité de masses au sein d'une même espèce. Les résultats montraient des différences de DE de repos en fonction du statut thyroïdien. En effet, les canards traités au IOP + PTU avaient une DE diminuée par rapport aux témoins (-45% ; $p < 0,05$) et IOP + PTU + T_3 avaient une DE supérieure à celle des Témoins (+13% ; $p < 0,05$).

3 - L'activité mitochondriale

- **Quantité de mitochondries**

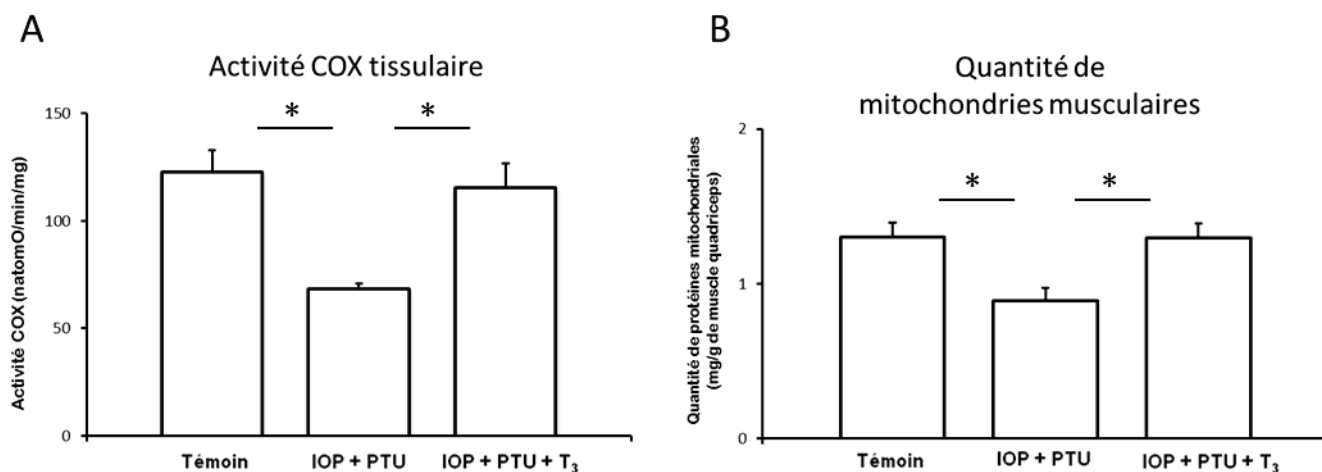


Figure 66 : Modifications de la quantité de mitochondries en fonction du statut thyroïdien. (A) L'activité maximale de la Cytochrome-c Oxydase est mesurée sur homogénat tissulaire (Quad) après addition de 2 μM de FCCP, 2,5 μM d'antimycine A, 4 mM d'ascorbate et 0,5 mM de TMPD. (B) Quantité de protéines mitochondriale extraites par unité de muscle quadriceps (mg/g) en fonction du statut thyroïdien. Les étoiles (*) correspondent à des différences significatives avec $p < 0,05$; $n=5$ pour chaque groupe.

La quantité de protéines mitochondriales en fonction du statut thyroïdien a été mesurée indirectement *via* l'activité maximale de la COX (Figure 66A) et de façon directe *via* le dosage des produits d'isolement des mitochondries du muscle pectoral (Figure 66B). Les deux techniques montraient une diminution significative de la quantité de mitochondries chez les canards traités au IOP + PTU (respectivement -44% et -32% vs Témoin), et un retour à la quantité de mitochondries des témoins chez les canards hypothyroïdiens supplémentés T_3 .

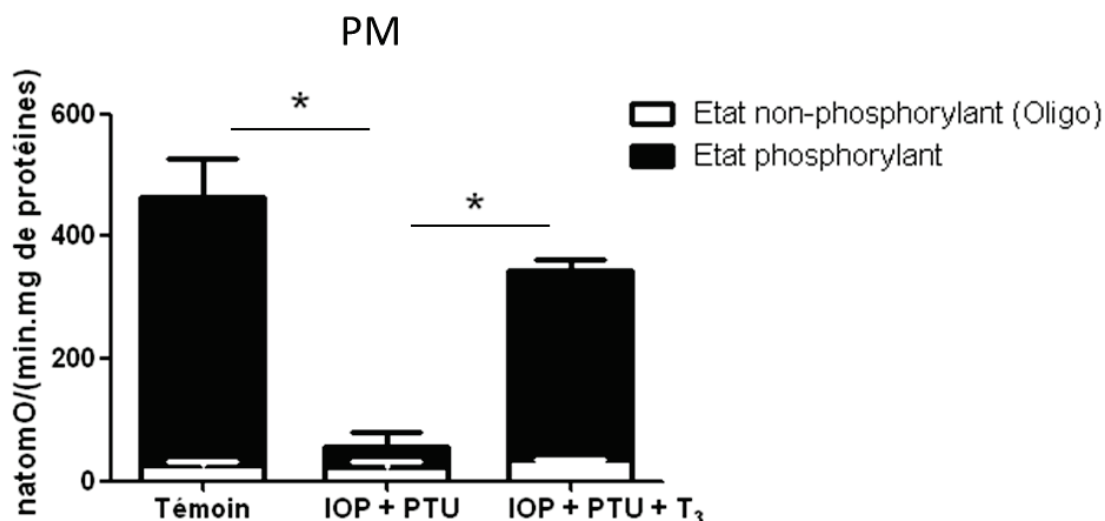
- *Respiration des mitochondries isolées*

Figure 67 : Consommation d'oxygène (natomO/min/mg de protéines) des mitochondries isolées du muscle quadriceps de canards en fonction du statut thyroïdien (Témoin (n=4) ; IOP + PTU et IOP + PTU + T₃ (n=3)). La respiration est initiée par 5 mM de pyruvate/2,5 mM de malate (PM). L'état phosphorylant est obtenu par ajout de 500 μ M d'ADP puis l'état non phosphorylant est déterminé par ajout de 2,5 μ g/mL d'oligomycine. Les résultats représentent les moyennes \pm sem ; n=6. Les étoiles (*) correspondent à des différences significatives avec $p < 0,05$. L'état phosphorylant est toujours significativement supérieur à l'état non phosphorylant.

L'activité respiratoire enregistrée sur les mitochondries isolées du muscle quadriceps des canards montrait une très forte diminution de l'état phosphorylant chez les traités au IOP + PTU par comparaison aux Témoins (-88%). Chez les hypothyroïdiens compensés par des injections quotidiennes de T₃ (IOP + PTU + T₃) la respiration mitochondriale revenait à l'état basal observé chez les Témoins. En revanche, on n'observait aucune modification significative de l'état non phosphorylant en fonction du statut thyroïdien (Figure 67).

- Production d'ATP (ATP/O)

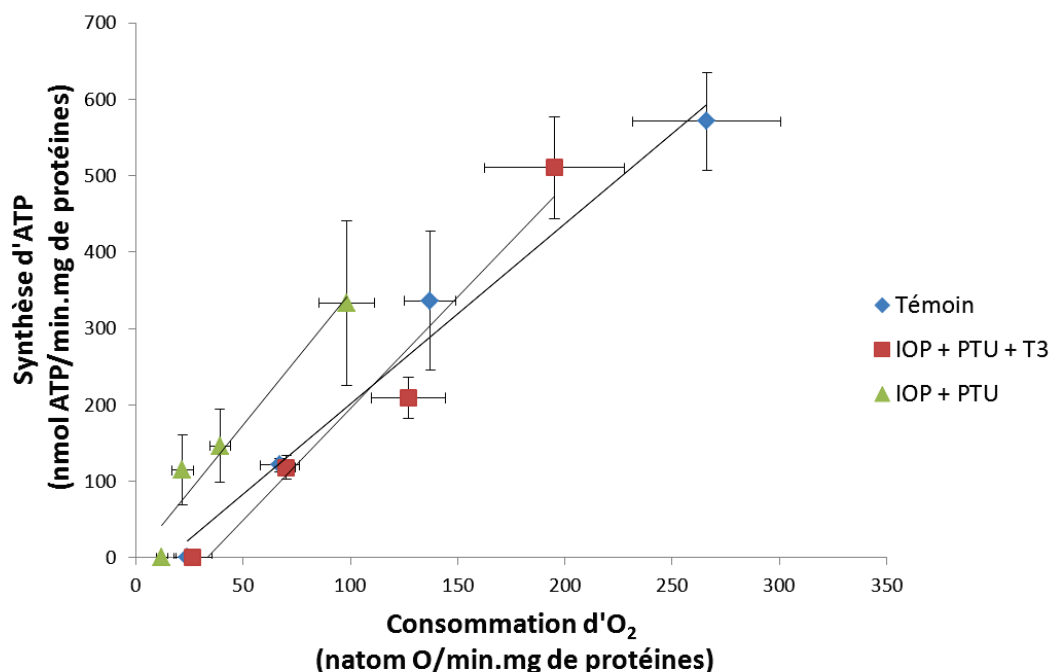


Figure 68 : Modifications du rendement mitochondrial (ATP/O) en fonction du statut thyroïdien (Témoin et IOP + PTU (n=5) ; IOP + PTU + T₃ (n=3)).

Comme dans l'étude précédente, l'efficacité mitochondriale a été déterminée en mesurant la synthèse d'ATP associée à la respiration. Cette efficacité tendait à diminuer chez les canards traités au IOP + PTU par comparaison avec les Témoin au vu du décalage vers la gauche de la courbe reliant la synthèse d'ATP à la consommation d'oxygène. La complémentation en T₃ rétablissait l'efficacité mitochondriale au niveau de celle des Témoin euthyroïdiens. L'intensité de l'activité mitochondriale, reflétée par la production maximale d'ATP, était également très diminuée chez les hypothyroïdiens par rapport aux Témoin (-42%). L'efficacité mitochondriale des canards traités aux IOP + PTU + T₃ n'était pas différente de celle des témoins.

4 - Activité bioénergétique des fibres musculaires perméabilisées

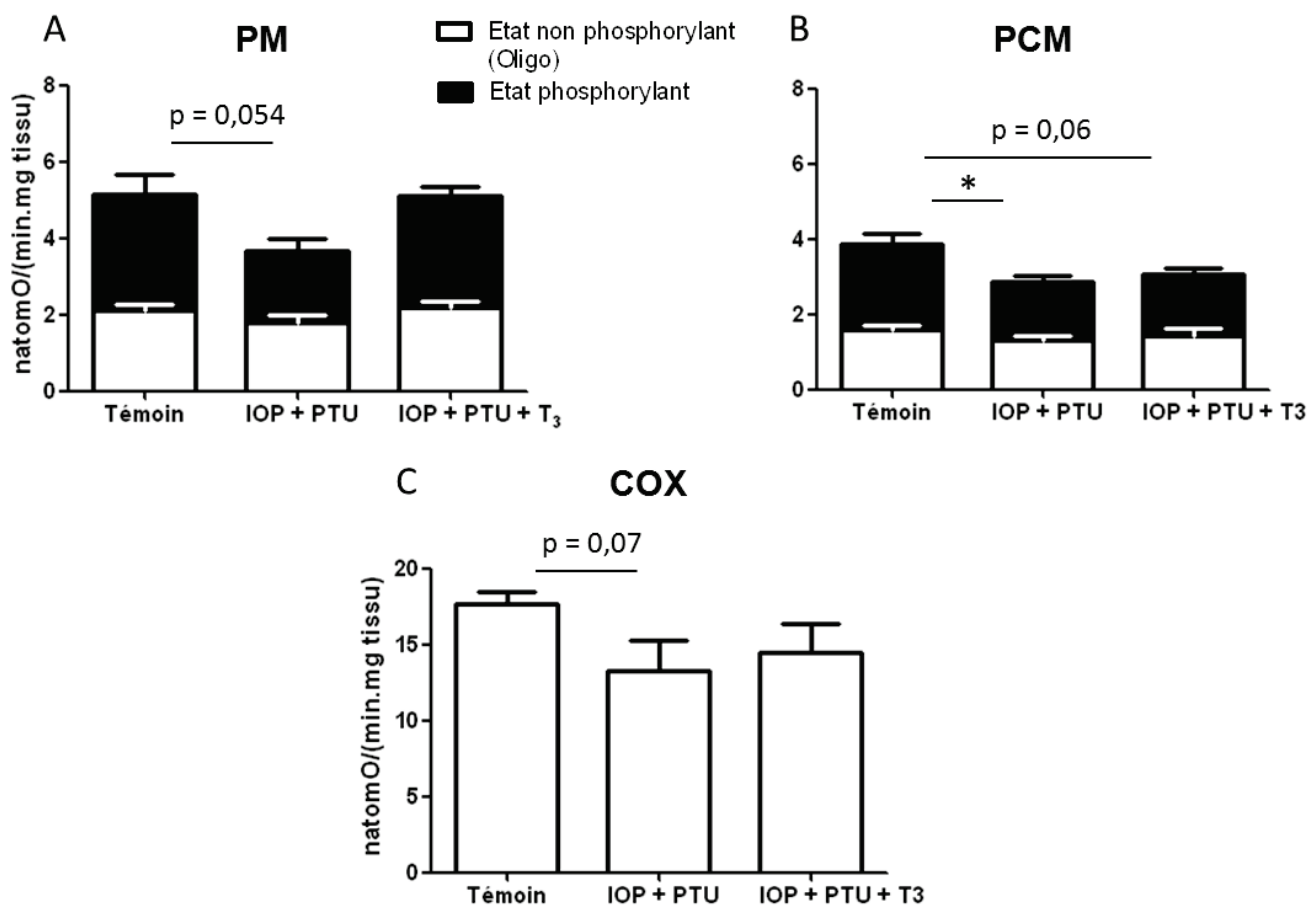


Figure 69 : Comparaison de la consommation d'oxygène (natomO/min/mg de muscle) des fibres perméabilisées du muscle quadriceps de canards en fonction du statut thyroïdien (Témoin et IOP + PTU (n=6) ; IOP + PTU + T₃ (n=5)). La respiration est initiée soit par (A) 5 mM de pyruvate/2,5 mM de malate (PM) soit par (B) 40 μM de palmitoyl-L-carnitine/2,5 mM de malate (PCM). L'état phosphorylant est obtenu par ajout de 1 mM d'ADP puis l'état non phosphorylant est déterminé par ajout de 1,25 μg/mL d'oligomycine. (C) L'activité maximale de la COX est mesurée après addition de 2 μM de FCCP, 2,5 μM d'antimycine A, 4 mM d'ascorbate et 0,5 mM de TMPD. Les résultats représentent les moyennes ± sem ; n=5. Les étoiles (*) correspondent à des différences significatives avec p<0,05. L'état phosphorylant est toujours significativement supérieur à l'état non phosphorylant.

Comme pour les mitochondries isolées, le statut thyroïdien modifiait l'activité respiratoire des fibres musculaires perméabilisées. Les canetons PTU+IOP présentaient une réduction de la respiration musculaire en présence d'un substrat glucidique (PM, -29% ; p = 0,054) ou d'un substrat lipidique (PCM ; -26%, p < 0,05) à l'état phosphorylant mais aucune différence significative n'était observée à l'état non phosphorylant. De même la respiration en présence d'Ascorbate/TMPD le substrat de la COX tendait à être plus faible chez les canetons PTU + IOP (-25% ; p = 0,07) que chez les témoins traduisant une diminution de

l'activité de la chaîne respiratoire par mg de muscle quadriceps chez les canards traités. Le traitement par la T_3 en plus du IOP + PTU entraînait un retour de la consommation d'oxygène musculaire au niveau de celle des Témoins. En revanche, avec un substrat d'origine lipidique (PCM) la correction par la T_3 de la réduction de la respiration induite par le IOP + PTU était moins marquée, la respiration des fibres des canetons IOP + PTU + T_3 tendant à rester plus faible (-20% ; $p=0,06$) que celle des témoins. De même, la réduction de la respiration musculaire avec Ascorbate/TMPD n'était que très peu corrigée par l'ajout de T_3 .

5 - Expression des protéines de fusion

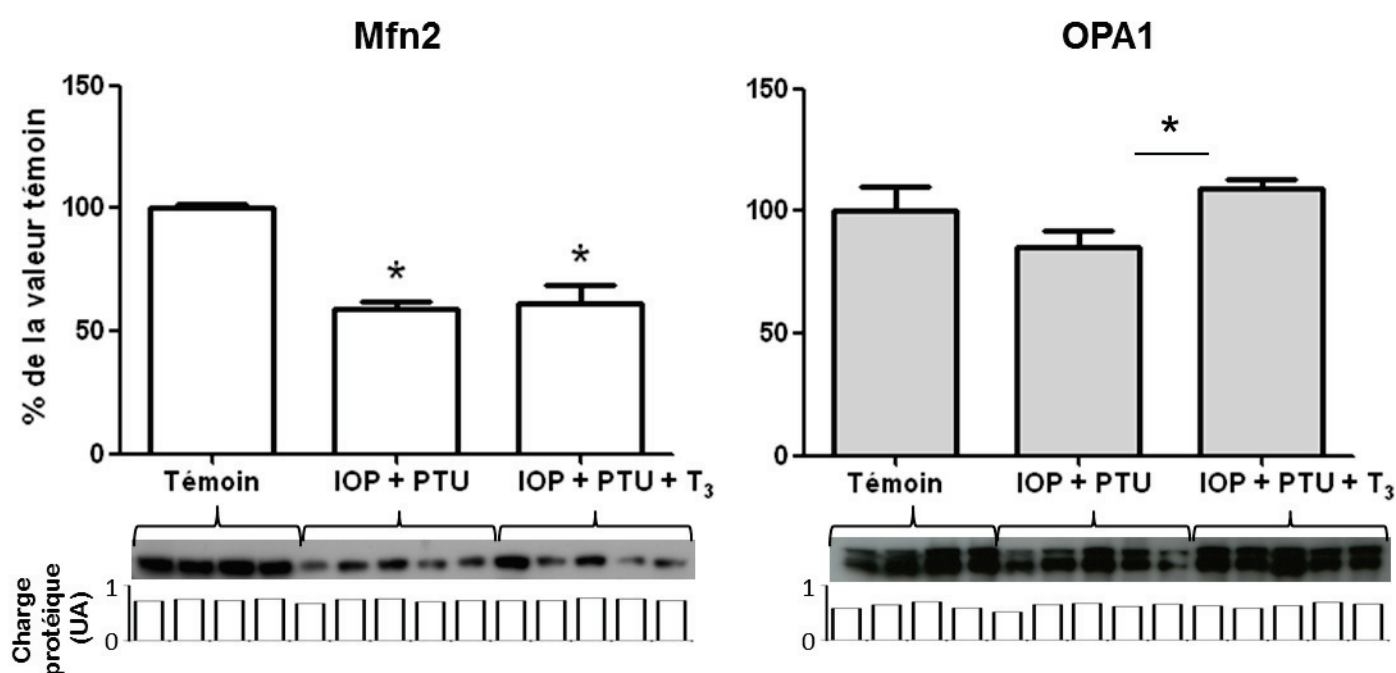


Figure 70 : Abondance relative des protéines de fusion mitofusine 2 (Mfn2 ; 86 kDa) et optic atrophy 1 (OPA1 ; 90-110 kDa) analysée par western blot sur des mitochondries isolées du muscle quadriceps de canards (50µg) de statuts thyroïdiens différents (Témoin (n=4) ; IOP + PTU et IOP + PTU + T_3 (n=5)). L'homogénéité de quantité de protéines mitochondriales déposée a été contrôlée par une coloration au rouge ponceau et les intensités relatives ont été représentées sous chaque film de révélation. Les résultats représentent les moyennes \pm sem ; n=5. Les étoiles (*) correspondent à des différences significatives avec $p<0,05$.

Dans le muscle quadriceps, on observait une importante diminution de l'abondance relative de la protéine de fusion Mfn2 chez les canards traités au IOP + PTU par rapport aux Témoins (respectivement -41% et -39% ; Figure 70). Le traitement au IOP + PTU + T_3 ne corrigeait pas la réduction induite par le IOP + PTU. L'abondance relative de la protéine OPA1 tendait à être réduite par le traitement IOP + PTU sans atteindre le seuil de

significativité. Par contre, le groupe IOP + PTU+T₃ montrait une abondance relative de OPA1 significativement plus élevée (+28%, p<0,05) que le groupe IOP + PTU suggérant un rôle direct de la T₃ dans l'expression de la protéine de fusion OPA1. Si les abondances relatives des protéines de fusion étaient modérément variables du fait d'une variabilité parfois importante, il faut noter que la quantité de mitochondries extraites par gramme de muscle quadriceps pour effectuer les western blot était fortement diminuée pour les canards traités au IOP + PTU (Figure 66B ; -32% vs témoins) alors qu'elle était identique aux témoins chez les canards traités au IOP + PTU + T₃.

6 - Corrélation expression des protéines de fusion vs activité bioénergétique

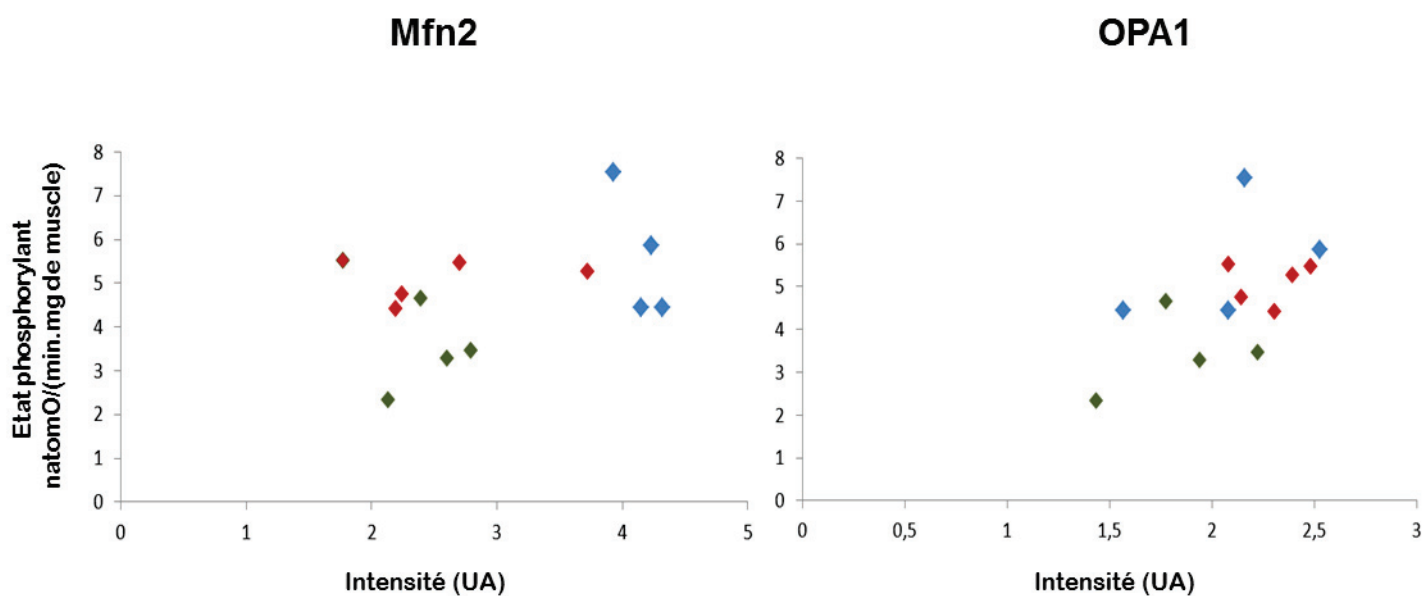


Figure 71 : Absence de corrélation entre l'activité respiratoire des fibres musculaires (état phosphorylant, natomO/min/mg de muscle quadriceps) et l'abondance relative des protéines de fusion mitochondriale Mfn2 et OPA1 chez les canards de statuts thyroïdiens différents. Chaque point correspond à un canard différent, en bleu Témoin (n=4), en vert IOP + PTU (n=4) et en rouge IOP + PTU + T₃ (n=5).

La diminution de l'activité mitochondriale observée lors d'une diminution des concentrations circulantes de T₃, était associée à une réduction de l'abondance des protéines de fusion par comparaison avec les canards euthyroïdiens (Figure 71). Toutefois, en tenant compte des canards IOP + PTU + T₃, l'activité respiratoire des fibres musculaires n'était pas significativement corrélée à l'abondance relative de la Mfn2 ($R^2 = 0,15$) ni aux modifications de l'abondance d'OPA1 ($R^2 = 0,31$) (Figure 71) en liaison notamment avec une forte variabilité dans chaque groupe.

IV - Discussion

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que le statut thyroïdien affecte profondément le métabolisme énergétique des canetons et le métabolisme musculaire. L'expression des protéines de fusion apparaît également modulée par le statut thyroïdien.

1 - Validation des traitements

L'utilisation combinée de IOP et de PTU nous a permis d'obtenir des canetons présentant un très fort retard de croissance par rapport aux canetons non traités. Ce retard de croissance a déjà été observé avec un protocole similaire d'obtention d'une hypothyroïdie chez le caneton (Rey *et al.*, 2010). Dans cette étude, le traitement au IOP + PTU avait réduit de 10 fois les concentrations circulantes de T_3 traduisant l'installation d'une forte hypothyroïdie (Rey *et al.*, 2010). Dans notre série de canards, la réduction des hématocrites est cohérente avec une hypothyroïdie installée puisque la T_3 a un rôle stimulateur sur l'érythropoïèse (Dainiak *et al.*, 1986). L'hypertrophie massive des thyroïdes est également cohérente avec l'hypothyroïdie puisqu'elle témoigne d'une forte sécrétion de thyrostimuline hypophysaire suite à la suppression du rétrocontrôle négatif exercé par la T_3 sur l'hypothalamus et l'hypophyse. L'hypertrophie des thyroïdes serait ainsi similaire à la formation d'un goitre hypothyroïdien. L'observation de ces paramètres indirects suggère fortement que les canetons traités au PTU + IOP de notre série expérimentale étaient bien hypothyroïdiens comme dans l'étude de Rey *et al.* (Rey *et al.*, 2010). L'apport chronique de T_3 en plus du traitement IOP + PTU a permis de partiellement corriger le retard de croissance et entièrement l'hématocrite et l'hypertrophie thyroïdienne démontrant que ces effets étaient bien liés à la réduction de T_3 . La mesure de la dépense énergétique de repos, très diminuée chez les canetons traités au IOP + PTU et augmentée chez les IOP + PTU + T_3 par rapport aux témoins, nous a également permis de valider l'efficacité du traitement IOP + PTU et de suggérer une augmentation des concentrations circulantes de T_3 chez les canetons supplémentés en T_3 par comparaison avec les hypothyroïdiens. Par contre comme la plupart des paramètres mesurés étaient similaires entre les témoins et les canetons recevant du IOP + PTU + T_3 , on peut se demander si la dose utilisée de T_3 n'a pas seulement permis de compenser les effets de l'hypothyroïdie sans entraîner d'hyperthyroïdie. Un traitement similaire avait pourtant induit une très forte hyperthyroïdie chez les canetons (Rey *et al.*, 2010). En l'absence de dosages plasmatiques de T_3 sur notre série expérimentale, il est difficile de statuer sur le statut thyroïdien exact des canetons PTU + IOP + T_3 .

2 - Statut thyroïdien et bioénergétique mitochondriale

L'étude de la respiration de mitochondries isolées et de fibres perméabilisées du muscle quadriceps nous a permis de montrer l'effet drastique d'une hypothyroïdie sur la bioénergétique mitochondriale. En effet, consommation d'O₂, activités COX mesurées sur fibres isolées et sur homogénats de tissus étaient toutes trois fortement diminuées suggérant une diminution de la quantité de mitochondries, diminution confirmée par la suite par les faibles quantités de protéines mitochondriales extraites par g de muscle quadriceps (-32% vs Témoin ; p<0,05). Ces effets du traitement sont totalement compensés par l'addition de T₃ exogène. Ces données sont en accord avec les études précédentes montrant un rôle direct des hormones thyroïdiennes dans la régulation de la biogenèse mitochondriale, de la synthèse protéique mitochondriale, de la consommation d'O₂ et dans l'activation du génome mitochondrial (Casas *et al.*, 1999; Grandemange *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2010; Wrutniak *et al.*, 1995). La T₃ pourrait agir en se fixant sur ses récepteurs nucléaires qui contrôlent l'expression de multiples gènes dont ceux codant pour de multiples protéines mitochondriales (Tata, 2012). La T₃ pourrait également agir *via* sa fixation sur son récepteur mitochondrial, la protéine p43, et stimuler la transcription des gènes codant pour des protéines mitochondriales (Casas *et al.*, 1999; Wrutniak *et al.*, 1995), et serait notamment impliquée dans la stimulation de l'activité des complexes I et IV (COX) (Blanchet *et al.*, 2012).

La mesure du rapport ATP/O montre une diminution de la capacité maximale de production d'ATP des mitochondries chez les canards traités au IOP + PTU mais une augmentation de l'efficacité mitochondriale (plus d'ATP synthétisé par O₂ consommé). Ce résultat suggère une diminution de la perméabilité membranaire qui pourrait être associée pour partie à une diminution de l'expression de la protéine découplante UCP aviaire. L'hypothyroïdie a en effet été associée à une forte réduction de l'abondance des transcrits codant l'UCP aviaire (Rey *et al.*, 2010) alors que l'hyperthyroïdie augmente cette expression (Collin *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 2010). La réduction de la perméabilité membranaire des canetons hypothyroïdiens pourrait également être liée à une modification de la composition phospholipidique des membranes. En effet, chez les mammifères, la composition des phospholipides membranaires et le degré d'insaturation des acides gras portés par ces phospholipides sont contrôlés par la T₃ (Bangur *et al.*, 1995; Brand *et al.*, 1992) ce qui affecte directement la perméabilité membranaire aux protons (Horrum *et al.*, 1992). La correction des capacités maximales de production d'ATP et de l'efficacité mitochondriale chez les canetons IOP + PTU + T₃ confirme l'implication de la T₃ dans le contrôle de ces

mécanismes. Toutefois, le fait que ces paramètres soient similaires entre canetons euthyroïdiens et IOP + PTU + T₃ suggère de nouveau une similitude de statut thyroïdien.

3 - Statut thyroïdien et protéines de fusion mitochondriale

Notre étude montre une importante diminution de l'abondance relative de la Mfn2 chez les canards traités au IOP + PTU par comparaison avec les témoins (-41%) ce qui suggère un contrôle de l'expression de ce gène par les hormones thyroïdiennes. Cette régulation de la Mfn2 par les hormones thyroïdiennes, très impliquées dans le contrôle du métabolisme énergétique chez les oiseaux comme chez les mammifères, n'est pas inattendu mais aucune étude n'avait encore montré cet effet. Les hormones thyroïdiennes sont également bien connues pour contrôler l'expression de multiples protéines mitochondriales (Duchamp *et al.*, 1999; Tata, 2012). Cependant la réduction de l'abondance relative de la Mfn2 par l'hypothyroïdie dans les mitochondries musculaires n'a pas été corrigée par la supplémentation en T₃ (-39% vs témoin). Pour interpréter l'influence de la T₃ sur l'expression musculaire de la Mfn2 il faut probablement tenir compte de la quantité de mitochondries musculaire en plus de l'abondance relative de la Mfn2 dans les mitochondries. Comme le contenu musculaire en mitochondries était très diminué dans le groupe IOP + PTU par comparaison avec les témoins et qu'il était rétabli au niveau des témoins dans le groupe IOP + PTU + T₃, le contenu musculaire en Mfn2 (par gramme de tissu) devait être plus important chez les canetons IOP + PTU + T₃ que chez les hypothyroïdiens, indiquant une forte augmentation de l'expression de la Mfn2 en réponse à la T₃. La T₃ pourrait activer l'expression de la Mfn2 *via* une stimulation de l'AMPK (Collin *et al.*, 2005) et une augmentation de PGC1 α (de Lange *et al.*, 2007; Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011), qui est connu pour augmenter l'expression de la Mfn2 (Li *et al.*, 2009). Un contrôle par la T₃ de la transcription du gène codant la Mfn2 *via* la stimulation de récepteurs nucléaires mérite d'être exploré dans de futures expérimentations.

L'abondance relative de la protéine OPA1 tendait également à être réduite par l'hypothyroïdie et était clairement augmentée par la supplémentation en T₃ (groupe IOP + PTU + T₃) par comparaison avec le groupe IOP + PTU. Ces résultats suggèrent un contrôle par la T₃ du gène codant la protéine OPA1. Là encore, ce résultat est novateur puisqu'aucune étude n'a étudié l'influence des hormones thyroïdiennes sur l'expression d'OPA1. Cette augmentation de l'expression d'OPA1 en réponse à la T₃ serait cohérente avec l'augmentation de l'abondance des membranes internes mitochondriales observée lors d'une augmentation des concentrations des hormones thyroïdiennes (Wrutniak-Cabello *et al.*, 2001). En effet, cette protéine de fusion, OPA1, est située chez les mammifères sur la

membrane interne mitochondriale principalement au niveau des crêtes et serait impliquée dans le maintien de leur organisation indépendamment de son rôle dans la fusion mitochondriale (Gottlieb, 2006). Il ne serait donc pas étonnant qu'une augmentation de la densité des membranes internes mitochondriales soit associée à une augmentation de l'abondance de la protéine OPA1 permettant une organisation structurale et fonctionnelle de cette membrane en augmentant la densité de crêtes mitochondriales.

4 - Faible corrélation entre l'expression des protéines de fusion et l'énergétique musculaire

Même si la respiration des fibres perméabilisées et l'abondance relative des mitofusines étaient conjointement réduites chez les canetons hypothyroïdiens, la complémentation en T_3 ne permettait pas d'augmenter ces deux paramètres au niveau des euthyroïdiens. Le statut thyroïdien peu clair des canetons IOP + PTU + T_3 de notre série expérimentale et la forte variabilité individuelle en réponse aux traitements pharmacologiques ne nous a pas permis de clairement démontrer le rôle positif potentiel de la T_3 sur l'expression de la Mfn2. Ce rôle apparaît plus clair pour OPA1 dont l'abondance relative est accrue par la supplémentation en T_3 . Il conviendrait de reproduire cette expérience afin d'augmenter les effectifs et peut-être tester différentes doses de T_3 pour obtenir une gradation plus étendue des statuts thyroïdiens.

Si la réduction de l'abondance des mitofusines chez les hypothyroïdiens est suffisante pour impacter l'organisation des réseaux mitochondriaux, cette étude suggère de nouveau chez les oiseaux qu'une moindre fusion est associée à une plus faible activité énergétique. Il est difficile d'étayer des variations potentielles des réseaux mitochondriaux au vu des variations de l'expression des protéines de fusion en réponse à la T_3 . L'effet plus clair de la T_3 sur OPA1 nous permettrait cependant de suggérer un potentiel effet de cette protéine sur la réorganisation des membranes internes mitochondriales comme chez les mammifères où cette protéine module l'organisation de crêtes mitochondriales contenant les protéines de la chaîne respiratoire (Olichon *et al.*, 2002). Alternativement les protéines de fusion pourraient également intervenir par leurs rôles dans l'activation du métabolisme par la stimulation de l'expression des complexes de la chaîne respiratoire (Pich *et al.*, 2005) même si les mécanismes d'action de ces protéines par ces processus ne sont pas connus.

V - Conclusion

- Cette étude suggère, un rôle de la T₃ dans le contrôle de l'expression des protéines Mfn2 et OPA1, contribuant ainsi aux modifications du compartiment mitochondrial.
- Le contrôle de l'expression de la Mfn2 pourrait être associé à la biogenèse mitochondriale.
- Le contrôle de l'expression d'OPA1 pourrait potentiellement participer à l'organisation des crêtes mitochondriales.
- L'abondance des protéines de fusion n'était pas significativement corrélée aux modifications de l'activité mitochondriale observées en fonction du statut thyroïdien.

*Discussion, Conclusion &
perspectives*

Discussion générale, Perspectives & Conclusion

Au cours de ce travail de thèse, nous avons initié l'exploration de mécanismes pouvant contribuer à la plasticité bioénergétique musculaire qui se met en place au cours de la croissance des oiseaux au froid (Barré *et al.*, 1987a; Duchamp *et al.*, 1991; Roussel *et al.*, 1998). En se basant sur les données connues chez d'autres espèces, nous avons essayé de caractériser pour la première fois chez l'oiseau, des protéines de fusion mitochondriale pouvant permettre la dynamique des réseaux mitochondriaux décrite chez de nombreuses espèces et types cellulaires (Benard *et al.*, 2007; Benard and Karbowski, 2009; Benard and Rossignol, 2008; Zorzano *et al.*, 2010). Ce travail a permis des avancées en termes de i) méthodologies et ii) résultats scientifiques sur ces homologues aviaires des protéines de fusion.

I - Mises au point méthodologiques : caractérisation de protéines de fusion aviaires

Ce travail a nécessité la mise au point de différentes méthodes qui ne tournaient pas en routine au laboratoire comme la caractérisation des protéines de fusion par western blot ou RT-PCR. En effet, au début de cette thèse aucune étude chez l'oiseau n'avait décrit l'organisation des mitochondries en réseaux *via* des mécanismes de fusion/fission, ni abordé la caractérisation des protéines de fusion/fission. Cependant, de nombreux points communs au niveau de l'organisation structurale et fonctionnelle des muscles squelettiques ainsi que dans l'activité mitochondriale des mammifères et des oiseaux laissent supposer qu'il puisse y avoir des phénomènes semblables permettant la modulation du métabolisme énergétique *via* des mécanismes de fusion/fission.

La stratégie de recherche utilisée a privilégié dans un premier temps, une approche moléculaire tout d'abord *in silico* puis par RT-PCR avant de privilégier les approches par western blot. A partir du génome séquencé du poulet (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004), nous avons retrouvé des séquences possédant de fortes similitudes avec les séquences des protéines de fusion et de fission caractérisées chez les mammifères (respectivement 70 et 80% de similitude). Pour cette thèse, nous avons concentré nos recherches sur les protéines de fusion Mfn2 (Mitofusine 2) et OPA1 (OPTic Atrophy 1) mais il est bien évident qu'un travail analogue devrait caractériser les protéines de fission aviaires.

Par RT-PCR, nous avons amplifié un homologue de Mfn2 chez le canard et le séquençage de l'ADNc obtenu a montré une similarité de 93% avec la séquence correspondante du poulet. La grande variabilité des résultats obtenus par RT-PCR classique ou par qPCR (résultats non présentés) nous a conduits à privilégier la détection et la quantification de l'abondance relative de la protéine par western-blot, plus représentative également de l'expression de la protéine. En effet, à partir d'anticorps (Ac) détectant les protéines Mfn2 et OPA1 de mammifères, nous avons réussi à détecter des protéines immunoréactives de tailles similaires à celles des mammifères, dont le signal ne sortait que sur des préparations enrichies en protéines mitochondriales sans utilisation de protéase, suggérant fortement la présence, dans les mitochondries d'oiseaux, d'homologues des protéines de fusion mitochondriale de mammifères. Les nombreux essais réalisés avec ces approches par western blot nous ont convaincus de la grande délicatesse de la technique qui nécessite de multiples précautions et vérifications avant d'obtenir des résultats reproductibles. L'utilisation d'Ac hétérologues dirigés contre des protéines de mammifères a probablement compliqué les mises au point de cette technique sur nos préparations d'oiseaux et ce travail a permis d'optimiser ces conditions expérimentales pour obtenir des résultats robustes. Malgré de nombreux essais nous n'avons pas réussi à visualiser ces protéines par immuno-histologie (données non présentées) probablement en raison de la spécificité insuffisante des Ac utilisés. Ces approches devront néanmoins être reprises pour localiser ces protéines dans les myocytes et préciser notamment si elles sont uniquement mitochondriales ou si elles peuvent permettre des jonctions étroites avec le réticulum sarcoplasmique (Dorn and Maack, 2013).

Nous avons caractérisé ces homologues aviaires des protéines de fusion chez deux espèces d'oiseaux : une espèce nidifuge, le canard de Barbarie et une espèce nidicole, le manchot Adélie, ce qui accroît la généralité de nos résultats. Nous avons également montré que l'abondance de la protéine Mfn2 est similaire entre les populations de mitochondries musculaires (intermyofibrillaires ou subsarcolemmales) et qu'elle dépend largement du muscle étudié comme ce qui a été observé chez les mammifères (Bach *et al.*, 2003). La Mfn2 apparaît en effet très abondante dans le muscle quadriceps et le cœur qui ont un métabolisme très oxydatif, et beaucoup moins abondante dans le muscle pectoral. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir une gradation de l'expression de la Mfn2 en fonction de l'activité oxydative du muscle squelettique, ce qui est cohérent avec une plus grande richesse en mitochondries. Lorsque la composition en fibres oxydatives, riches en mitochondries, augmente, l'expression de la Mfn2 est plus importante, ce qui irait dans le

sens des différences d'organisation des réseaux mitochondriaux observées en fonction du type de fibres musculaires (Ogata and Yamasaki, 1997).

Il conviendrait cependant de démontrer effectivement que ce sont bien des protéines qui catalysent la fusion des membranes mitochondriales. Aucune étude de visualisation de phénomènes de fusion/fission chez l'oiseau n'ayant été réalisée, nous ne pouvons affirmer que, comme chez les mammifères, ces protéines participent bien à la formation d'un réseau mitochondrial organisé et dynamique (Figure 72) (Benard and Karbowski, 2009; Benard and Rossignol, 2008; Zorzano *et al.*, 2009b). Il est probable que cette démonstration devra utiliser i) des approches cellulaires *in vitro* soit sur des myoblastes en culture ou d'autres types cellulaires plus simples que les myocytes différenciés et ii) des technologies d'inactivation de l'expression des gènes codant ces protéines (RNAi par exemple) qui vont nécessiter des mises au point importantes.

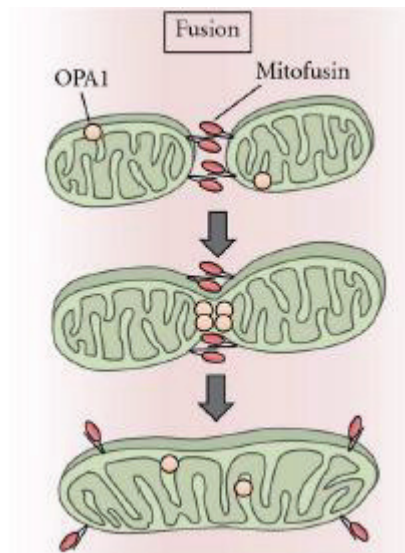


Figure 72 : Des réseaux mitochondriaux dynamiques grâce à des mécanismes de fusion. Les protéines Mitofusines 1 et 2 et OPA1 permettent respectivement la fusion des membranes externes et internes (D'après Kanamaru *et al.*, 2012).

II - Mises au point méthodologiques : les fibres perméabilisées

La mise au point de cette approche méthodologique chez l'oiseau représente un point important de notre travail de thèse. En effet grâce à cette technique, adaptée des mammifères (Kuznetsov *et al.*, 2008; Picard *et al.*, 2008), il a été possible d'aborder la bioénergétique musculaire sur une préparation préservant l'intégrité des réseaux mitochondriaux musculaires et donc potentiellement de corrélérer l'activité bioénergétique aux

modifications d'expression des mitofusines et donc potentiellement à l'organisation des réseaux. La technique des fibres musculaires perméabilisées présente l'énorme avantage sur la technique des mitochondries isolées utilisée jusque-là au laboratoire de nécessiter peu de matériel biologique. A partir d'un prélèvement de quelques dizaines de mg (contre plus d'1 g pour les mitochondries), il est possible de faire plusieurs mesures, chacune nécessitant seulement quelques mg de muscle. Cette approche a été rendue possible par l'acquisition d'oxygraphes de haute résolution (Oroboros®) seuls capables de nous donner la résolution suffisante. Cette technique des fibres perméabilisées n'est cependant pas sans défaut puisque nous avons observé des limitations potentielles à l'utilisation de certains substrats comme les substrats lipidiques, un substrat de la COX, l'ascorbate-TMPD, ou avec l'action limitée de certains agents pharmacologiques comme le FCCP, un découplant des oxydations-phosphorylantes. Des observations similaires avaient également été faites avec des fibres perméabilisées de mammifères (Picard *et al.*, 2011). Il est possible que des problèmes de diffusion ou de solubilisation dans certains compartiments musculaires de ces molécules, limitent l'accès aux mitochondries notamment aux mitochondries IMF plus profondes et entourées de myofibrilles. L'importance de la taille des fibres associée à une limitation accrue a ainsi pu être mise en évidence dans l'étude sur les manchots (Fongy *et al.*, 2013). La comparaison des résultats des fibres avec ceux des mitochondries isolées reste nécessaire et les deux approches apparaissent complémentaires.

III - Contraintes énergétiques et plasticité mitochondriale

Nos différentes études nous ont permis, dans un premier temps, de confirmer dans une certaine mesure une plasticité mitochondriale fonctionnelle chez l'oiseau exposé à différentes contraintes énergétiques. En effet, chez le manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*) comme chez le canard de Barbarie (*Cairina moschata*), l'activité intrinsèque des mitochondries isolées du muscle pectoral, reflétée par la respiration, était augmentée au cours de la croissance notamment au froid. Ces résultats ont été retrouvés avec les fibres musculaires perméabilisées, conservant une organisation des différents compartiments cellulaires intacte, dont l'activité respiratoire était augmentée après 15 jours de développement. Toutefois, les modifications fonctionnelles observées au froid prolongé sont apparues décevantes au vu des résultats antérieurs du laboratoire sur le modèle canard, notamment en ce qui concerne l'activité COX musculaire classiquement accrue chez l'oiseau après plusieurs semaines d'exposition au froid (Aulie and Grav, 1979; Goglia *et al.*, 1993) et dont les variations étaient bien moins marquées dans notre étude. Les raisons de la résistance de nos séries de canards au développement d'une plasticité métabolique et

thermogène plus marquée ne sont pas claires à ce stade. S'agit-il d'une divergence progressive de la souche qui présente maintenant des caractéristiques phénotypiques différentes ? Ou bien de l'utilisation d'un pédigrée un peu différent, R51 au lieu du R31 utilisé initialement mais plus disponible ? Il conviendra de clarifier ce point afin d'identifier les facteurs en jeu et d'identifier éventuellement des mécanismes originaux de résistance au froid.

Notre étude a néanmoins montré, pour la première fois, la grande dynamique de la bioénergétique mitochondriale musculaire dans les premiers jours de l'exposition au froid. En effet, l'accroissement des capacités respiratoires musculaires dès les premières 48h d'exposition au froid, témoigne d'une grande plasticité mitochondriale se mettant en place très rapidement pour faire face à la contrainte. On peut penser que le frisson thermique qui est stimulé rapidement au froid pour produire de la chaleur (Barré *et al.*, 1985; Barré *et al.*, 1986b; Duchamp and Barre, 1993) peut être l'un des mécanismes à l'origine des modifications bioénergétiques observées, comme peut l'être l'exercice physique chez les mammifères (Fluck, 2006). L'implication potentielle de facteurs régulateurs comme PGC1 α connu pour contrôler l'énergétique musculaire et la biogenèse mitochondriale chez les mammifères (Lin *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2002; Puigserver and Spiegelman, 2003; Wu *et al.*, 1999) ou les oiseaux (Ueda *et al.*, 2005) peut également être suggérée et devra faire l'objet d'études sur le modèle canard.

A l'inverse du froid, nos résultats ont montré pour la première fois chez le canard que la privation d'alimentation affecte profondément l'énergétique musculaire en réduisant l'activité métabolique. Nos résultats ont en effet permis de montrer que l'activité mitochondriale basale était très diminuée lors d'un jeûne alimentaire de 60h chez le canard de Barbarie. Si la réduction de la dépense énergétique des organismes lors d'un jeûne est bien connue chez les mammifères et les oiseaux (Duchamp and Barre, 1993; Groscolas and Robin, 2001; Le Maho and Despin, 1976), nos résultats montrent de façon originale que la réduction métabolique musculaire est rapide et particulièrement marquée. Cette diminution observée à la fois sur l'activité intrinsèque des mitochondries et sur l'activité générale des fibres musculaires, n'était pas associée à une diminution de la quantité de protéines mitochondriales, ce qui suggère une inhibition de l'activité mitochondriale afin d'assurer uniquement la production d'énergie nécessaire à la survie de l'animal avec une efficacité maximale pour qu'il y ait le moins de pertes d'énergie possible.

L'ensemble de ces résultats indique que le muscle squelettique des oiseaux est doté d'une remarquable plasticité métabolique en réponse aux contraintes environnementales

avec des modifications qui se mettent en place progressivement en réponse à un programme de croissance et de différenciation progressive avec l'âge. Ce programme apparaît différent selon que l'espèce est plus nidicole ou nidifuge. De plus, le muscle squelettique est capable de répondre rapidement à des contraintes accrues pour augmenter ou réduire son activité métabolique. Cette plasticité remarquable déjà mise en évidence en réponse à l'exercice chez les mammifères (Fluck, 2006; Hood *et al.*, 2006; Hoppeler and Fluck, 2002) peut être étendue aux oiseaux aussi bien en réponse au froid prolongé (Duchamp *et al.*, 1992; Toyomizu *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 2005) qu'au froid court ou au jeûne alimentaire (notre étude). La compréhension des mécanismes qui participent à cette plasticité musculaire chez l'oiseau revêt une importance considérable.

IV - Activité métabolique et abondance relative des protéines de fusion

En fonction des besoins énergétiques des cellules, nous avons identifié, chez l'oiseau, des variations de l'abondance relative des homologues des protéines Mfn2 et OPA1 dans les muscles squelettiques. Ces observations sont en accord avec les variations observées chez les mammifères dans des situations d'activation du métabolisme comme l'exposition au froid ou l'exercice physique (Cartoni *et al.*, 2005; Soriano *et al.*, 2006), ou dans des situations pathologiques de diminution de l'activité métabolique telles que l'obésité (Bach *et al.*, 2005; Bach *et al.*, 2003). Nos résultats sont très originaux puisqu'aucune étude n'avait abordé ces aspects chez l'oiseau.

Nous avons montré que l'abondance relative des protéines de fusion augmentait chez nos deux espèces d'oiseaux étudiées au cours de la croissance au froid. Cependant, des disparités apparaissent quant à l'intensité de ces variations. En effet, chez le manchot, espèce pseudo-nidicole, affrontant les températures antarctiques, l'augmentation était marquée à partir de 15 jours après l'éclosion, âge correspondant à l'émancipation thermique du poussin. Une très forte augmentation de l'abondance de ces protéines était également observée à l'âge adulte, période durant laquelle les manchots Adélie passent la majeure partie de leur temps dans les eaux antarctiques dont la température ne dépasse jamais 0°C. Si ces variations dans l'abondance des protéines de fusion sont associées à une modification du degré de fusion des réseaux mitochondriaux musculaires, ces données suggèrent un remodelage des réseaux mitochondriaux pour une production de chaleur optimale en accord avec l'hypothèse de Skulachev proposant que la fusion des membranes mitochondriales pourrait permettre de créer des « filaments » mitochondriaux plus efficaces (Skulachev, 2001). En revanche, chez les canetons de Barbarie élevés à 4°C, l'augmentation de l'expression des protéines de fusion était observée uniquement dans la

première semaine d'exposition au froid, suggérant un remodelage précoce des réseaux mitochondriaux afin de faire face à la contrainte énergétique « froid » qui, contrairement au manchot Adélie, ne s'intensifiera plus au cours de la croissance. Ces données suggèrent que l'abondance relative des protéines de fusion peut varier en fonction de l'intensité du stress énergétique auquel sont confrontés les oiseaux, en particulier le froid aigu, et peut constituer une réponse particulière dynamique et rapide. De même, une exposition aiguë au froid (48h) chez les rongeurs augmente l'expression de la Mfn2 dans le tissu adipeux brun, tissu thermogène des mammifères, et dans le muscle squelettique (Soriano *et al.*, 2006).

Nos résultats ont montré que la diminution de l'activité métabolique induite par un jeûne alimentaire, est quant à elle associée à une diminution de l'abondance relative des protéines de fusion. Ainsi, dans des situations de stress énergétiques intenses comme l'exposition à des froids intenses ou un jeûne alimentaire de 60h, l'abondance relative des protéines de fusion est positivement corrélée à l'intensité de l'activité métabolique mitochondriale. La réduction, suite au jeûne, de l'abondance des protéines de fusion observée chez le caneton s'oppose à ce qui est proposé chez les mammifères, où une tendance à l'hyperfusion du réseau mitochondrial suite au jeûne est proposée sur la base notamment de résultats sur le cœur de souris à jeun (Li *et al.*, 2009 ; Westermann 2012 ; cf page 60). Des différences dans la réponse des tissus étudiés pourraient être proposées pour interpréter les différences entre notre étude et la littérature. Il est possible également que la durée du jeûne puisse être un facteur important pour interpréter ces différences. Si lors du jeûne prolongé, la réduction de l'abondance des protéines de fusion est associée à une fragmentation accrue du réseau mitochondrial, les processus d'autophagie ou de mitophagie, connus pour être stimulés dans des situations de privation d'alimentation (Kim and Lemasters, 2011; Mizushima and Klionsky, 2007; Rambold and Lippincott-Schwartz, 2011) (Figure 73), pourraient être facilités. Cela contribuerait par la suite à réduire l'abondance des mitochondries dans le muscle squelettique et donc à diminuer encore la dépense énergétique si le jeûne se prolonge. Il serait intéressant d'étudier les variations d'expression des protéines de fusion au cours du jeûne alimentaire afin de confirmer cette hypothèse. De plus, nous n'avons étudié que les effets d'un jeûne de 60h, nous pouvons donc nous demander si un jeûne plus court ou plus long aurait les mêmes conséquences sur l'expression des protéines de fusion. En effet, le jeûne alimentaire est classiquement représenté par 3 phases successives distinctes, avec une première caractérisée par une diminution rapide de l'activité métabolique pour atteindre un régime d'économie se continuant dans la phase 2 caractérisée par l'utilisation privilégiée des lipides et l'épargne protéique, avant d'atteindre la phase 3 caractérisée par une reprise de la dégradation

protéique (Groscolas and Robin, 2001). Comme le montrent nos résultats après un jeûne de 60h chez le canard ou d'autres résultats après des jeûnes prolongés de plusieurs semaines chez le manchot royal (Duchamp and Barre, 1993; Rey *et al.*, 2010), ces phases de jeûne pourraient être associées à des réponses mitochondriales différentes en fonction de la durée et donc de l'intensité du stress énergétique engendré. Il serait important de vérifier si, au cours du jeûne alimentaire, des phénomènes d'abord d'hyperfusion puis de fragmentation du réseau mitochondrial peuvent se produire ou si ces phénomènes peuvent être tissu-spécifiques. Il pourrait être intéressant d'associer des contraintes énergétiques opposées, par exemple froid et privation d'alimentation ou alimentation restreinte qui peuvent se retrouver dans les conditions naturelles, pour identifier si des priorités peuvent se mettre en place.

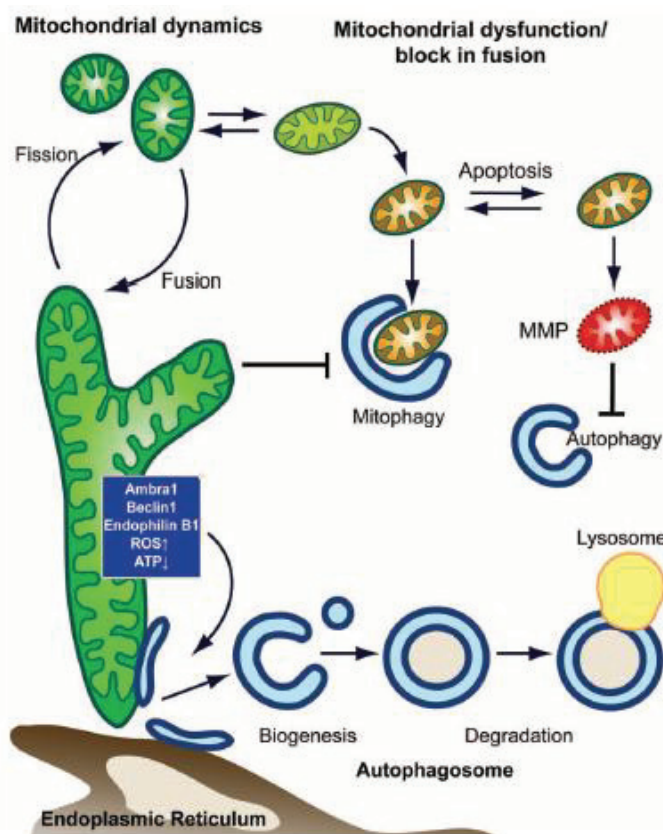


Figure 73 : Modèle des processus de mitophagie. La stimulation de la fission mitochondriale facilite les mécanismes de mitophagie afin d'éliminer les mitochondries endommagées ou de diminuer l'abondance des mitochondries dans des situations de restriction alimentaire. (D'après Rambold and Lippincott-Schwartz, 2011).

L'ensemble de nos résultats suggère un rôle des homologues aviaires des protéines Mfn2 et OPA1 dans la modulation de l'activité bioénergétique des cellules musculaires. Cette

observation pourrait aller dans le sens d'un rôle fonctionnel dans l'organisation dynamique des réseaux mitochondriaux *via* des mécanismes de fusion afin d'obtenir une activité mitochondriale optimale en fonction des besoins énergétiques des cellules. Cependant, en l'absence d'étude fonctionnelle de ces protéines chez l'oiseau, nous ne pouvons affirmer leur implication dans des processus de fusion. Il serait intéressant d'étudier l'expression des protéines de fusion chez le manchot au cours du jeûne puisque cette espèce est naturellement confrontée aux deux stress au cours de la période de reproduction. On peut imaginer que les besoins énergétiques très augmentés par l'exposition au froid seraient associés à une organisation mitochondriale optimale pour permettre une importante production de chaleur tout en consommant un minimum de substrats. De façon intéressante, une corrélation étroite entre l'abondance des protéines de fusion déterminée par western blot et l'activité bioénergétique mitochondriale déterminée sur les fibres perméabilisées n'était pas toujours observée dans les différentes situations expérimentales utilisées. Il est vraisemblable que la présence de ces protéines et la modification potentielle de l'organisation des réseaux mitochondriaux ne soient pas les seuls déterminants de l'activité bioénergétique mitochondriale qui dépend également de l'équipement enzymatique et de la composition phospholipidique des membranes de ces organites. Il ressort cependant de nos études que les protéines de fusion aviaires peuvent jouer un rôle dans ces processus bioénergétiques.

Chez les mammifères, au-delà de leur rôle dans la fusion, ces protéines ont un rôle direct dans le métabolisme énergétique *via* par exemple, l'activation de l'expression des gènes de certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire pour la Mfn2 (Pich *et al.*, 2005) ou l'organisation structurelle des crêtes mitochondriales pour OPA1 (Cipolat *et al.*, 2006). De plus, la Mfn2 est également présente sur le réticulum sarcoplasmique et permettrait des rapprochements entre mitochondries et réticulum favorisant les échanges calciques (de Brito and Scorrano, 2008; de Brito and Scorrano, 2009). Ce rôle particulier des protéines de fusion pour permettre des ponts entre mitochondries et réticulum sarcoplasmique pourrait être particulièrement important chez les canetons acclimatés au froid, où le muscle squelettique présente des capacités accrues de recyclage du Ca^{2+} *via* les récepteurs de la ryanodine et les SERCA (Dumonteil *et al.*, 1995; Dumonteil *et al.*, 1993). Un efflux calcique accru des mitochondries musculaires avait également été observé après acclimatation au froid des canetons (Barré and Nedergaard, 1987). Une activation du recyclage ATP-dépendant du Ca^{2+} dans les muscles squelettiques pourrait constituer un mécanisme thermogène impliqué dans la thermogenèse de régulation des oiseaux (Duchamp *et al.*, 1999; Dumonteil *et al.*, 1995; Dumonteil *et al.*, 1993). Il serait donc

intéressant d'approfondir les recherches sur ce point afin de localiser les protéines de fusion et notamment en association avec les contacts entre mitochondries et réticulum. Il serait également intéressant d'identifier le(s) rôle(s) des homologues aviaires de ces protéines sur les mouvements intramyocytaires de Ca^{2+} par des études *in vitro* permettant d'activer ou d'inhiber l'expression de ces protéines.

V - Contrôle endocrine de l'expression des protéines de fusion

Parmi les hormones potentiellement impliquées dans le contrôle de l'expression des homologues aviaires des protéines de fusion, nos résultats mettent en évidence un rôle potentiel des hormones thyroïdiennes et notamment la T_3 même si les effets du statut thyroïdien restent à confirmer sur un plus grand nombre d'oiseaux et en utilisant différentes concentrations de T_3 (voir étude 3). Les hormones thyroïdiennes sont bien connues pour activer la plupart des processus biologiques parmi lesquels la bioénergétique mitochondriale chez l'oiseau en accord avec de précédentes études chez les mammifères (Tata, 2012). Ces effets pourraient passer par des interactions de la T_3 avec ses récepteurs nucléaires (Tata, 2012) ou mitochondriaux (Casas *et al.*, 1999; Grandemange *et al.*, 2005; Wrutniak *et al.*, 1995). Nos résultats suggèrent que les hormones thyroïdiennes pourraient contrôler l'expression des protéines de fusion et contribuer aux modifications du compartiment mitochondrial. Ainsi l'induction de l'expression de la protéine OPA1 par la T_3 pourrait être liée à l'augmentation de la densité de membrane interne induite par la T_3 (Wrutniak-Cabello *et al.*, 2001), OPA1 étant étroitement liée à l'organisation et au maintien des crêtes mitochondriales chez les mammifères (Cipolat *et al.*, 2006). Un contrôle par la T_3 de l'expression des protéines de fusion pourrait contribuer aux variations de ces protéines observées lors de la croissance, de l'exposition au froid ou du jeûne, situations où les concentrations circulantes des hormones thyroïdiennes varient (Cherel *et al.*, 1988a; Le Ninan *et al.*, 1988; Olson *et al.*, 1999; Rey *et al.*, 2010). Ces hormones pourraient également contribuer aux différences observées dans l'expression des protéines de fusion entre espèces plutôt nidicoles ou nidifuges puisque les concentrations de T_3 augmentent plutôt dans les jours et semaines qui suivent l'éclosion pour les premières alors qu'elles varient plutôt dans la période péri-éclosion pour les secondes (De Groef *et al.*, 2013; Olson *et al.*, 1999). Si nos résultats sont généralisables aux mammifères, un contrôle par la T_3 des protéines de fusion pourrait contribuer à l'altération de la morphologie des mitochondries associée à une diminution de l'expression de la Mfn2 dans le muscle squelettique de rats obèses (Bach *et al.*, 2003) ou à la diminution de l'expression de Mfn2 chez des sujets obèses (Bach *et al.*, 2005; Bach *et al.*, 2003).

Il est possible que d'autres hormones contribuent également au contrôle de l'expression des protéines de fusion aviaires notamment le glucagon dont les concentrations circulantes augmentent au froid et qui stimule des processus thermogènes puissants chez les oiseaux (Barré *et al.*, 1989; Duchamp *et al.*, 1999). Le jeûne est également une situation où les concentrations circulantes de glucagon augmentent (Cherel *et al.*, 1988a; Le Ninan *et al.*, 1988). Des résultats préliminaires (non présentés) suggèrent qu'un traitement au glucagon de canetons maintenus à thermoneutralité pourrait avoir un effet négatif sur l'expression des protéines de fusion. Ces résultats qui doivent être confirmés seraient cohérents avec les variations observées lors du jeûne de 60h. Au froid, l'influence du frisson et des hormones thyroïdiennes pourrait être prépondérante lors de l'exposition aiguë. A plus long terme, si le frisson disparaît les influences des hormones thyroïdiennes et du glucagon tendraient à s'annuler. Ces aspects sont clairement à approfondir dans de futures expérimentations.

VI - Conclusion

- **Cette étude a permis de caractériser chez l'oiseau la présence de protéines homologues aux protéines de fusion Mfn2 et OPA1 connues chez les mammifères et chez les insectes.**
- **Les variations de l'abondance relative de ces protéines observées dans les muscles squelettiques en fonction des besoins énergétiques des cellules, le froid aigu ou prolongé et le jeûne alimentaire, suggèrent un rôle adaptatif dans la réponse aux contraintes énergétiques, afin d'optimiser l'activité bioénergétique des cellules et ainsi augmenter les chances de survie de l'organisme.**
- **L'expression de ces protéines de fusion pourrait être contrôlée par l'activité contractile de frisson et par des hormones comme les hormones thyroïdiennes.**
- **Même si leurs mécanismes d'action restent à élucider, ces protéines de fusion pourraient être un élément de la plasticité bioénergétique du muscle squelettique face à des contraintes énergétiques.**
- **Les variations d'expression des protéines de fusion dans le muscle squelettique des oiseaux pourraient jouer un rôle clé dans la survie des oiseaux capables de résister à des conditions extrêmes tels que les manchots.**

Références bibliographiques

A-

- Alavi, M. V., Bette, S., Schimpf, S., Schuettauf, F., Schraermeyer, U., Wehrl, H. F., Ruttiger, L., Beck, S. C., Tonagel, F. and Pichler, B. J.** (2007). A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* **130**, 1029-1042.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U. E., Thiselton, D. L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B. and Auburger, G.** (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature genetics* **26**, 211-215.
- Altmann, R.** (1894). Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen: Veit.
- Andreyev, A. Y., 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**, 585-592.
- Aulie, A. and Grav, H. J.** (1979). Effect of cold acclimation on the oxidative capacity of skeletal muscles and liver in young bantam chicks. *Comp Biochem Physiol* **62**, 335-338.
- 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**, 431-435.

B-

- Bach, D., Naon, D., Pich, S., Soriano, F. X., Vega, N., Rieusset, J., Laville, M., Guillet, C., Boirie, Y., Wallberg-Henriksson, H. et al.** (2005). Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* **54**, 2685-93.
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F. X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Dugaard, J. R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J. R. et al.** (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* **278**, 17190-7.
- Balaban, R. S.** (2009). The role of Ca²⁺ signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 1334-1341.
- Bandman, E.** (1999). Functional properties of myosin isoforms in avian muscle. *Poult Sci* **78**, 729-34.
- Bandman, E. and Rosser, B. W.** (2000). Evolutionary significance of myosin heavy chain heterogeneity in birds. *Microsc Res Tech* **50**, 473-91.
- Bangur, C., Howland, J. and Katyare, S.** (1995). Thyroid hormone treatment alters phospholipid composition and membrane fluidity of rat brain mitochondria. *Biochem. J* **305**, 29-32.
- Barré, H., Bailly, L. and Rouanet, J. L.** (1987). Increased oxidative capacity in skeletal muscles from cold-acclimated ducklings: a comparison with rats. *Comp Biochem Physiol B* **88**, 519-22.
- 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* **256**, R1192-9.
- Barré, H., Chatonnet, J., Le Maho, Y. and Valatx, J.-L.** (2001). Physiologie énergétique: 1er, 2e et 3e cycles universitaires (biologie, médecine, pharmacie, écoles vétérinaires et agronomiques): préparation au capes et à l'agrégation de SVT: Belin.
- 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**, E616-20.
- 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**, R533-8.
- Barré, H. and Nedergaard, J.** (1987). Cold-induced changes in Ca²⁺ transport in duckling skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol* **252**, R1046-54.
- 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.
- Baxter, R. V., Othmane, K. B., Rochelle, J. M., Stajich, J. E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Hamida, M. B., Bel, S. and Stenger, J. E.** (2002). The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nature genetics* **30**, 22-5.
- 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 Regul Integr and Comp Physiol* **283**, R1245-1253.

- Belichenko, V. M., Korostishevskaya, I. M., Maximov, V. F. and Shoshenko, C. A.** (2004). Mitochondria and blood supply of chicken skeletal muscle fibers in ontogenesis. *Microvasc Res* **68**, 265-72.
- Benard, G., Bellance, N., Jose, C., Melser, S., Nouette-Gaulain, K. and Rossignol, R.** (2010). Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production. *Biochim Biophys Acta* **1797**, 698-709.
- Benard, G., Bellance, N. g., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T. and Rossignol, R.** (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Cell Sci* **120**, 838-848.
- Benard, G. and Karbowski, M.** (2009). Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. *Semin Cell Dev Biol*, vol. 20, pp. 365-374.
- Benard, G. and Rossignol, R.** (2008). Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Sign* **10**, 1313-1342.
- Bénistant, 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.
- Benton, C. R., Wright, D. C. and Bonen, A.** (2008). PGC-1alpha-mediated regulation of gene expression and metabolism: implications for nutrition and exercise prescriptions. *Appl Physiol Nutr Metab* **33**, 843-62.
- Bishop, C. M., Butler, P. J., Egginton, S., el Haj, A. J. and Gabrielsen, G. W.** (1995). Development of metabolic enzyme activity in locomotor and cardiac muscles of the migratory barnacle goose. *Am J Physiol* **269**, R64-72.
- Blanchet, E., Bertrand, C., Annicotte, J. S. b., Schlernitzauer, A., Pessemeesse, L., Levin, J., Fouret, G., Feillet-Coudray, C., Bonafos, B. a. and Fajas, L.** (2012). Mitochondrial T3 receptor p43 regulates insulin secretion and glucose homeostasis. *The FASEB Journal* **26**, 40-50.
- Block, B. A.** (1994). Thermogenesis in Muscle. *Annu Rev Physiol* **56**, 535-577.
- Boncompagni, S., Rossi, A. E., Micaroni, M., Beznoussenko, G. V., Polishchuk, R. S., Dirksen, R. T. and Protasi, F.** (2009). Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle by developmentally regulated tethering structures. *Mol Biol Cell* **20**, 1058-67.
- Brand, M., Turner, N., Ocloo, A., Else, P. and Hulbert, A.** (2003). Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem. J* **376**, 741-748.
- 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**, 353-362.
- Brand, M. D., Steverding, D., Kadenbach, B., Stevenson, P. M. and Hafner, R. P.** (1992). The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones. *Eur J Biochem* **206**, 775-781.
- Breckenridge, D. G., Stojanovic, M., Marcellus, R. C. and Shore, G. C.** (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* **160**, 1115-1127.
- Bucher, T. L., Chappell, M. A. and Morgan, K. R.** (1990). The ontogeny of oxygen consumption and ventilation in the Adelie penguin, *Pygoscelis adeliae*. *Respir Physiol* **82**, 369-88.

C-

- Cannon, B. and Nedergaard, J.** (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**, 277-359.
- Cartoni, R., Leger, B., Hock, M. B., Praz, M., Crettenand, A., Pich, S., Ziltener, J. L., Luthi, F., Deriaz, O., Zorzano, A. et al.** (2005). Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol* **567**, 349-58.
- Casas, F., Pessemeesse, L., Grandemange, S., Seyer, P., Gueguen, N. G., Baris, O., Lepourry, L., Cabello, G. and Wrutniak-Cabello, C.** (2008). Overexpression of the mitochondrial T3 receptor p43 induces a shift in skeletal muscle fiber types. *PLoS One* **3**, e2501.
- Casas, F. O., Rochard, P., Rodier, A., Cassar-Malek, I., Marchal-Victorion, S., Wiesner, R. J., Cabello, G. R. and Wrutniak, C.** (1999). A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbAalpha plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis. *Mol Cell Biol* **19**, 7913-7924.
- Châinier, F., Roussel, D., Georges, B., Meister, R., Rouanet, J.-L., Duchamp, C. and Barré, H.** (2000). Cold acclimation or grapeseed oil feeding affects phospholipid composition and mitochondrial function in duckling skeletal muscle. *Lipids* **35**, 1099-1106.
- Chen, H. and Chan, D. C.** (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**, R283-9.

- Chen, H. and Chan, D. C.** (2010). Physiological functions of mitochondrial fusion. *Ann N Y Acad Sci* **1201**, 21-5.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E. and Chan, D. C.** (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* **160**, 189-200.
- Cherel, Y., Leloup, J. and Le Maho, Y.** (1988a). Fasting in king penguin. II. Hormonal and metabolic changes during molt. *Am J Physiol* **254**, R178-84.
- Cherel, Y., Robin, J. P., Walch, O., Karmann, H., Netchitailo, P. and Le Maho, Y.** (1988b). Fasting in king penguin. I. Hormonal and metabolic changes during breeding. *Am J Physiol* **254**, R170-7.
- Choi, I.-H., 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 Zoo*, 455-473.
- Cipolat, S., de Brito, O. M., Dal Zilio, B. and Scorrano, L.** (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15927-15932.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W. and D'Adamio, L.** (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* **126**, 163-175.
- Cogswell, A. M., Stevens, R. J. and Hood, D. A.** (1993). Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *Am J Physiol* **264**, C383-9.
- 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.** (2003). Cold-induced enhancement of avian uncoupling protein expression, heat production, and triiodothyronine concentrations in broiler chicks. *Gen Comp Endocrinol* **130**, 70-77.
- 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.
- Commission, I. T.** (2001). Glossary of terms for thermal physiology. *Jpn J Physiol* **51**, 245-280.
- Costanzo, J. P., Lee, R. E. and Lortz, P. H.** (1993). Physiological responses of freeze-tolerant and freeze-intolerant frogs - Clues to evolution of anuran freeze tolerance. *Am J Physiol* **265**, R721-R725.
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., García-Planells, J., Chumillas, M. J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marín, I., Vílchez, J. J. and Palau, F.** (2002). The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* **30**, 22-25.
- Cumero, S., Fogolari, F., Domenis, R., Zucchi, R., Mavelli, I. and Contessi, S.** (2012). Mitochondrial F0F1-ATP synthase is a molecular target of 3-iodothyronamine, an endogenous metabolite of thyroid hormone. *Br J Pharmacol* **166**, 2331-2347.

D-

- Dainiak, N., Sutter, D. and Kreczko, S.** (1986). L-triiodothyronine augments erythropoietic growth factor release from peripheral blood and bone marrow leukocytes. *Blood* **68**, 1289-1297.
- Darmangeat, P.** (2005). Les manchots: Editions Artemis.
- Dauncey, M. and Ingram, D.** (1988). Influence of environmental temperature and energy intake on skeletal muscle respiratory enzymes and morphology. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **58**, 239-244.
- Davies, V. J., Hollins, A. J., Piechota, M. J., Yip, W., Davies, J. R., White, K. E., Nicols, P. P., Boulton, M. E. and Votruba, M.** (2007). Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum Mol Genet* **16**, 1307-1318.
- Dawson, W. R. and Evans, F. C.** (1960). Relation of growth and development to temperature regulation in nestling Vesper Sparrows. *The Condor* **62**, 329-340.
- de Brito, O. M. and Scorrano, L.** (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605-610.
- de Brito, O. M. and Scorrano, L.** (2009). Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: the role of Ras. *Mitochondrion* **9**, 222-226.
- De Groef, B., Grommen, S. V. and Darras, V. M.** (2013). Hatching the cleidoic egg: the role of thyroid hormones. *Front Endocrinol* **4**.
- de Lange, P., Moreno, M., Silvestri, E., Lombardi, A., Goglia, F. and Lanni, A.** (2007). Fuel economy in food-deprived skeletal muscle: signaling pathways and regulatory mechanisms. *The FASEB Journal* **21**, 3431-3441.

- De Vos, K. J., Allan, V. J., Grierson, A. J. and Sheetz, M. P.** (2005). Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Cur Biol* **15**, 678-683.
- Deaton, K., Bishop, C. and Butler, P.** (1997). The effect of thyroid hormones on the aerobic development of locomotor and cardiac muscles in the barnacle goose. *J Comp Physiol B* **167**, 319-327.
- Deaton, K. E., Bishop, C. M. and Butler, P. J.** (1998). Tissue-specific effects of hypothyroidism on postnatal muscle development in the barnacle goose. *J Exp Biol* **201**, 827-836.
- Dégletagne, C., Roussel, D., Rouanet, J. L., Baudimont, F., Moureaux, E.-M., Harvey, S., Duchamp, C., Le Maho, Y. and Raccurt, M.** (2013). Growth prior to thermogenesis for a quick fledging of Adélie Penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*). *PLoS One* **8**, e74154.
- Delettre, C., Griffoin, J.-M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguier, P. and Hamel, C. P.** (2001). Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* **109**, 584-591.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.-M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguier, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C. and Perret, E.** (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* **26**, 207-210.
- Deng, H., Dodson, M. W., Huang, H. and Guo, M.** (2008). The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* **105**, 14503-14508.
- Dentice, M. and Salvatore, D.** (2011). Local impact of thyroid hormone inactivation. *J Endocrinol.* **209(3)**, 273-82.
- Dickerson, J.** (1960). The effect of growth on the composition of avian muscle. *Biochem J* **75**, 33.
- Dorn, G. W. and Maack, C.** (2013). SR and mitochondria: calcium cross-talk between kissing cousins. *J Mol Cell Cardiol.* **55**, 42-9.
- Duchamp, C.** (1990). Démonstration d'une thermogénèse sans frisson d'origine musculaire chez l'oiseau: étude chez le caneton de barbarie et le poussin de manchot royal, vol. 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., 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.
- 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., 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. D., 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 Barré, H.** (2002). Ontogeny of thermoregulatory mechanisms in king penguin chicks (*Aptenodytes patagonicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **131**, 765-73.
- Duchen, M. R.** (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* **529**, 57-68.
- Dumonteil, E., Barre, H. and Meissner, G.** (1995). Expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport proteins in cold-acclimating ducklings. *Am J Physiol* **269**, C955-60.
- Dumonteil, E., Barré, H. and Meissner, G.** (1993). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor in cold-acclimated ducklings and thermogenesis. *Am J Physiol* **265**, C507-13.
- Dunn, E. H.** (1980). Variability in energy allocation of nestling birds. *Auk* **97**, 19-27.

E-

- Echtay, K. S.** (2007). Mitochondrial uncoupling proteins - "what is their physiological role? *Free Radic Biol Med* **43**, 1351-1371.
- Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A. and Pickering, S.** (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**, 96-99.
- 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.
- Erbrecht, A., Robin, J. P., Guerin, N., Groscolas, R., Gilbert, C. and Martrette, J. M.** (2011). Differential muscular myosin heavy chain expression of the pectoral and pelvic girdles during early growth in the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) chick. *J Exp Biol* **214**, 1829-35.

F-

- Fauconneau, B.** (1996). Le déterminisme génétique du développement. *INRA Productions Animales* **9**, 211-231.
- Fernandez-Marcos, P. J. and Auwerx, J.** (2011). Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr* **93**, 884S-890S.
- Fluck, M.** (2006). Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *J Exp Biol* **209**, 2239-48.
- Fongy, A., Romestaing, C., Blanc, C., Lacoste-Garanger, N., Rouanet, J. L., Raccurt, M. and Duchamp, C. H.** (2013). Ontogeny of muscle bioenergetics in Adélie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W. and Westermann, B.** (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol* **152**, 683-692.

G-

- Gereben, B., Zavacki, A. M., Ribich, S., Kim, B. W., Huang, S. A., Simonides, W. S., Zeöld, A. and Bianco, A. C.** (2008). Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* **29**, 898-938.
- Goglia, F., Lanni, A., Duchamp, C., Rouanet, J. L. and Barré, H.** (1993). Effect of cold acclimation on oxidative capacity and respiratory properties of liver and muscle mitochondria in ducklings, *Cairina moschata*. *Comp Biochem Physiol B* **106**, 95-101.
- Gottlieb, E.** (2006). OPA1 and PARL keep a lid on apoptosis. *Cell* **126**, 27-29.
- Grandemange, S., Seyer, P., Carazo, A., Bécuwe, P., Pessemesse, L., Busson, M., Marsac, C., Roger, P., Casas, F. and Cabello, G.** (2005). Stimulation of mitochondrial activity by p43 overexpression induces human dermal fibroblast transformation. *Cancer Res* **65**, 4282-4291.
- Grav, H. J., Borch-Johnsen, B., Dahl, H. A., Gabrielsen, G. W. and Steen, J. B.** (1988). Oxidative capacity of tissues contributing to thermogenesis in eider (*Somateria mollissima*) ducklings: changes associated with hatching. *J Comp Physiol B* **158**, 513-8.
- Griffin, E. E., Detmer, S. A. and Chan, D. C.** (2006). Molecular mechanism of mitochondrial membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 482-9.
- Griparic, L., van der Wel, N. N., Orozco, I. J., Peters, P. J. and van der Bliek, A. M.** (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 18792-18798.
- Groscolas, R. and Robin, J.-P.** (2001). Long-term fasting and re-feeding in penguins. *Comp Biochem Physiol A Mol & Integr Physiol* **128**, 643-653.
- Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombes, A., Belenguer, P., Arnoult, D. and Rojo, M.** (2008). Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* **100**, 315-325.
- Guillet, V.** (2009). Métabolisme énergétique mitochondrial dans les neuropathies héréditaires associées aux mutations des gènes OPA1 et MFN2, vol. PhD: Université d'Angers.

H-

- Hackenbrock, C.** (1981). Energy-linked condensed-orthodox ultrastructural transformations in mitochondria. *Chemotherapy* **27**, 21-26.
- Handrich, Y., Bevan, R. M., Charrassin, J. B., Butler, P. J., Ptz, K., Woakes, A. J., Lage, J. and Maho, Y. L.** (1997). Hypothermia in foraging king penguins. *Nature* **388**, 64-67.
- Hill, R. W., Wyse, G. A. and Anderson, M.** (1989). *Animal physiology*: Harper & Row New York.
- Hocquette, J., Ortigues-Marty, I., Damon, M., Herpin, P. and Geay, Y.** (2000). Métabolisme énergétique des muscles squelettiques chez les animaux producteurs de viande. *Productions animales Paris Institut National de la Recherche Agronomique* **13**, 185-200.
- Hohtola, E.** (2004). Shivering thermogenesis in birds and mammals. In *Life in the Cold: Evolution, Mechanisms, Adaptation, and Application. 12th International Hibernation Symposium*, pp. 241-252.
- Hohtola, E. and Visser, H.** (1998). Development of locomotion and endothermy in altricial and precocial birds. *Oxford Ornithology Series* **8**, 157-173.

- Holloway, A., Reddy, P., Sheridan, M. and Leatherland, J.** (1994). Diurnal rhythms of plasma growth hormone, somatostatin, thyroid hormones, cortisol and glucose concentrations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during progressive food deprivation. *Biol Rhythm Res* **25**, 415-432.
- Hood, D. A., Irrcher, I., Ljubcic, V. and Joseph, A. M.** (2006). Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol* **209**, 2265-75.
- Hoppeler, H.** (1986). Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med* **7**, 187-204.
- Hoppeler, H. and Fluck, M.** (2002). Normal mammalian skeletal muscle and its phenotypic plasticity. *J Exp Biol* **205**, 2143-52.
- Hopper, R. K., Carroll, S., Aponte, A. M., Johnson, D. T., French, S., Shen, R.-F., Witzmann, F. A., Harris, R. A. and Balaban, R. S.** (2006). Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry* **45**, 2524-2536.
- Horrum, M., Tobin, R. and Ecklund, R.** (1992). The early triiodothyronine-induced changes in state IV respiration is not regulated by the proton permeability of the mitochondrial inner membrane. *Biochem Int* **28**, 813.
- Hua, S., Zhang, H., Song, Y., Li, R., Liu, J., Wang, Y., Quan, F. and Zhang, Y.** (2012). High expression of Mfn1 promotes early development of bovine SCNT embryos: improvement of mitochondrial membrane potential and oxidative metabolism. *Mitochondrion* **12**, 320-7.

I-

- Ishihara, N., Eura, Y. and Mihara, K.** (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* **117**, 6535-6546.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. and Mihara, K.** (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* **25**, 2966-77.
- Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y. and Mihara, K.** (2003). Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 891-898.

J-

- Jackson, C. G. R., Sillau, A. and Banchemo, N.** (1987). Fiber composition and capillarity in growing guinea pigs acclimated to cold and cold plus hypoxia. *Proc Soc Exp Biol Med* **185**, 101-106.
- James, D. I., Parone, P. A., Mattenberger, Y. and Martinou, J.-C.** (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* **278**, 36373-36379.
- Jansky, L.** (1973). Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. *Biol Rev* **48**, 85-132.
- Jenouvrier, S., Barbraud, C. and Weimerskirch, H.** (2006). Sea ice affects the population dynamics of Adélie penguins in Terre Adélie. *Polar Biol* **29**, 413-423.
- Jensen, M. D., Ekberg, K. and Landau, B. R.** (2001). Lipid metabolism during fasting. *Am J Physiol* **281**, E789-E793.
- Johnston, D. W.** (1971). The absence of brown adipose tissue in birds. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* **40**, 1107-8.

K-

- Kanamaru, Y., Sekine, S., Ichijo, H. and Takeda, K.** (2012). The phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial proteins in stress responses. *J Signal Transduc* **2012**.
- Karbowski, M., Jeong, S.-Y. and Youle, R. J.** (2004). Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J Cell Biol* **166**, 1027-1039.
- Karbowski, M. and Youle, R.** (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* **10**, 870-880.
- Kayar, S. R., Hoppeler, H., Howald, H., Claassen, H. and Oberholzer, F.** (1986). Acute effects of endurance exercise on mitochondrial distribution and skeletal muscle morphology. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **54**, 578-84.
- Kennedy, E. P. and Lehninger, A. L.** (1948). Intracellular structures and the fatty acid oxidase system of rat liver. *J Biol Chem* **172**, 847-848.
- Kim, I. and Lemasters, J. J.** (2011). Mitochondrial degradation by autophagy (mitophagy) in GFP-LC3 transgenic hepatocytes during nutrient deprivation. *Am J Physiol* **300**, C308-C317.

- Kleiber, M.** (1961). The fire of life. An introduction to animal energetics. *The fire of life. An introduction to animal energetics*.
- Knutti, D. and Kralli, A.** (2001). PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrino Metabo* **12**, 360-365.
- Kölliker, A.** (1857). Einige Bemerkungen über die Endigungen der Hautnerven und den Bau der Muskeln. *Zeitschr f wissensch Zool* **8**, 311-325.
- Koopman, W. J., Visch, H. J., Verkaart, S., van den Heuvel, L. W., Smeitink, J. A. and Willems, P. H.** (2005). Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency. *Am J Physiol* **289**, C881-C890.
- Kovacs, C. E. and Meyers, R. A.** (2000). Anatomy and histochemistry of flight muscles in a wing-propelled diving bird, the Atlantic puffin, *Fratercula arctica*. *J Morphol* **244**, 109-25.
- Kuznetsov, A. V. and Margreiter, R.** (2009). Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *International journal of molecular sciences* **10**, 1911-1929.
- Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R. and Kunz, W. S.** (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* **3**, 965-76.

L-

- Le Maho, Y., Delclitte, P. and Chatonnet, J.** (1976). Thermoregulation in fasting emperor penguins under natural conditions. *Am J Physiol* **231**, 913-922.
- Le Maho, Y. and Despin, B.** (1976). Reduction de la depense energetique au cours du jeune chez le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*).
- Le Ninan, F., Cherel, Y., Robin, J. P., Leloup, J. and Le Maho, Y.** (1988). Early changes in plasma hormones and metabolites during fasting in king penguin chicks. *J Comp Physiol B* **158**, 395-401.
- Lee, Y., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Smith, C. L. and Youle, R. J.** (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* **15**, 5001-5011.
- Legros, F., Lombès, A., Frachon, P. and Rojo, M.** (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* **13**, 4343-4354.
- Li, Y., Yin, R., Liu, J., Wang, P., Wu, S., Luo, J., Zhelyabovska, O. and Yang, Q.** (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitofusin 2 expression in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 876-882.
- Liesa, M., Palacin, M. and Zorzano, A.** (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* **89**, 799-845.
- Lin, J., Handschin, C. and Spiegelman, B. M.** (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* **1**, 361-70.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L. F., Puigserver, P., Isotani, E. and Olson, E. N.** (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797-801.

M-

- Margulis, L.** (1981). Symbiosis in cell evolution: Life and its environment on the early earth.
- Marjoniemi, K.** (2001). Thermogenic mechanisms during the development of endothermy in juvenile birds: University of Oulu.
- McCormack, J. and Denton, R.** (1980). Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Properties of the Ca²⁺-sensitive dehydrogenases within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of the rat. *Biochem. J* **190**, 95-105.
- McFarland, J. C. and Meyers, R. A.** (2008). Anatomy and histochemistry of hindlimb flight posture in birds. I. The extended hindlimb posture of shorebirds. *J Morphol* **269**, 967-79.
- Meeusen, S., McCaffery, J. M. and Nunnari, J.** (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* **305**, 1747-1752.
- Merkwirth, C. and Langer, T.** (2008). Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria. *Cell* **135**, 1165-1167.
- Mitchell, P.** (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148.

- Mizushima, N. and Klionsky, D. J.** (2007). Protein Turnover *Via* Autophagy: Implications for Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **27**, 19-40.
- Moreno, M., Lombardi, A., De Lange, P., Silvestri, E., Ragni, M., Lanni, A. and Goglia, F.** (2003). Fasting, lipid metabolism, and triiodothyronine in rat gastrocnemius muscle: interrelated roles of uncoupling protein 3, mitochondrial thioesterase, and coenzyme Q. *The FASEB Journal* **17**, 1112-1114.
- Morenosanchez, R., Rodriguezenriquez, S., Cuellar, A. and Corona, N.** (1995). Modulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase and oxidative phosphorylation by Ca^{2+} in pancreas and adrenal cortex mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **319**, 432-444.
- Müller, W.** (1976). Subsarcolemmal mitochondria and capillarization of soleus muscle fibers in young rats subjected to an endurance training. *Cell Tissue Res* **174**, 367-389.
- Murphy, A. N., Kelleher, J. and Fiskum, G.** (1990). Submicromolar Ca^{2+} regulates phosphorylating respiration by normal rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria by different mechanisms. *J Biol Chem* **265**, 10527-10534.
- Mutvei, A., Kuzela, S. and Nelson, B. D.** (1989). Control of mitochondrial transcription by thyroid hormone. *Eur J Biochem* **180**, 235-240.

N-

- Neuspiel, M., Zunino, R., Gangaraju, S., Rippstein, P. and McBride, H.** (2005). Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem* **280**, 25060-25070.
- Nichelmann, M. and Tzschentke, B.** (2002). Ontogeny of thermoregulation in precocial birds. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **131**, 751-763.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A. and Suter, U.** (2005). Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* **170**, 1067-1078.

O-

- Ogata, T. and Yamasaki, Y.** (1997). Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers. *Anat Rec* **248**, 214-23.
- Olichon, A., Emorine, L. J., Descoins, E., Pelloquin, L., Brichese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A. and Hamel, C. P.** (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS letters* **523**, 171-176.
- Olichon, A. I., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P. and Lenaers, G.** (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 7743-7746.
- Olson, J.** (1994). The Ontogeny of Shivering Thermogenesis in the Red-Winged Blackbird (*Agelaius phoeniceus*). *J Exp Biol* **191**, 59-88.
- Olson, J. M.** (2001). Ontogeny of catabolic and morphological properties of skeletal muscle of the red-winged blackbird (*Agelaius phoeniceus*). *J Comp Physiol B* **171**, 527-42.
- Olson, J. M., McNabb, F. M., Jablonski, M. S. and Ferris, D. V.** (1999). Thyroid development in relation to the development of endothermy in the red-winged blackbird (*Agelaius phoeniceus*). *Gen Comp Endocrinol* **116**, 204-12.
- Otera, H. and Mihara, K.** (2011). Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J Biochem* **149**, 241-51.

P-

- Palmer, J. W., Tandler, B. and Hoppel, C. L.** (1977). Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem* **252**, 8731-9.
- Papanicolaou, K. N., Kikuchi, R., Ngoh, G. A., Coughlan, K. A., Dominguez, I., Stanley, W. C. and Walsh, K.** (2012). Mitofusins 1 and 2 are essential for postnatal metabolic remodeling in heart. *Circ Res* **111**, 1012-26.
- Pearson, J. T.** (1998). Development of thermoregulation and posthatching growth in the altricial cockatiel *Nymphicus hollandicus*. *Physiol Zool* **71**, 237-44.

- Pette, D. and Staron, R. S.** (1990). Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **116**, 1-76.
- Picard, M., Csukly, K., Robillard, M. E., Godin, R., Ascah, A., Bourcier-Lucas, C. and Burelle, Y.** (2008). Resistance to Ca^{2+} -induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R659-68.
- Picard, M., Hepple, R. T. and Burelle, Y.** (2012a). Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *Am J Physiol* **302**, C629-C641.
- Picard, M., Taivassalo, T., Ritchie, D., Wright, K. J., Thomas, M. M., Romestaing, C. and Hepple, R. T.** (2011). Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PLoS One* **6**, e18317.
- Picard, M., White, K. and Turnbull, D. M.** (2013). Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. *J Appl Physiol* **114**, 161-71.
- Picard, M., Wright, K. J., Ritchie, D., Thomas, M. M. and Hepple, R. T.** (2012b). Mitochondrial function in permeabilized cardiomyocytes is largely preserved in the senescent rat myocardium. *PLoS One* **7**, e43003.
- Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A.** (2005). The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* **14**, 1405-15.
- Ponganis, P. J., Costello, M. L., Starke, L. N., Mathieu-Costello, O. and Kooyman, G. L.** (1997). Structural and biochemical characteristics of locomotory muscles of emperor penguins, *Aptenodytes forsteri*. *Respir Physiol* **109**, 73-80.
- Poole, A. C., Thomas, R. E., Andrews, L. A., McBride, H. M., Whitworth, A. J. and Pallanck, L. J.** (2008). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci* **105**, 1638-1643.
- Porter, R. K., Hulbert, A. and Brand, M. D.** (1996). Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *Am J Physiol* **271**, R1550-R1560.
- Puigserver, P. and Spiegelman, B. M.** (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor- β coactivator 1 α (PGC- α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endo Rev* **24**, 78-90.

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 Adelie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*). *Am J 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**, 441-444.
- Rambold, A. S. and Lippincott-Schwartz, J.** (2011). Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. *Cell Cycle* **10**, 4032-4038.
- Reiser, P. J., Greaser, M. L. and Moss, R. L.** (1996). Contractile properties and protein isoforms of single fibres from the chicken pectoralis red strip muscle. *J Physiol* **493** (Pt 2), 553-62.
- Rey, B.** (2008). Implication de la protéine découplante aviaire dans l'ontogenèse des mécanismes thermogènes et/ou anti-radicalaires - Etude expérimentale sur le manchot Royal et le caneton de Barbarie, vol. PhD: Université Claude Bernard Lyon 1.
- 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.
- Ricklefs, R. E.** (1979). Adaptation, constraint, and compromise in avian postnatal development. *Biol Rev Camb Philos Soc* **54**, 269-90.
- Riva, A., Tandler, B., Lesnfsky, E. J., Conti, G., Loffredo, F., Vazquez, E. and Hoppel, C. L.** (2006). Structure of cristae in cardiac mitochondria of aged rat. *Mech Ageing Dev* **127**, 917-21.
- Robelin, J.** (1990). Différenciation, croissance et développement cellulaire du tissu musculaire. *INRA Prod. Anim* **3**, 253-263.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D. and Lombès, A.** (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* **115**, 1663-1674.

- Rolfe, D. F. and Brand, M. D.** (1996). Proton leak and control of oxidative phosphorylation in perfused, resting rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **1276**, 45-50.
- Romanello, V. and Sandri, M.** (2012). Mitochondrial biogenesis and fragmentation as regulators of protein degradation in striated muscles. *J Mol Cell Cardiol* **55**, 64-72.
- Rosser, B. W. and George, J. C.** (1986). The avian pectoralis: histochemical characterization and distribution of muscle fiber types. *Canadian journal of zoology* **64**, 1174-1185.
- Rosser, B. W., Wick, M., Waldbillig, D. M. and Bandman, E.** (1996). Heterogeneity of myosin heavy-chain expression in fast-twitch fiber types of mature avian pectoralis muscle. *Biochem Cell Biol* **74**, 715-28.
- Rosser, B. W., Wick, M., Waldbillig, D. M., Wright, D. J., Farrar, C. M. and Bandman, E.** (1998). Expression of myosin heavy chain isoforms during development of domestic pigeon pectoralis muscle. *Int J Dev Biol* **42**, 653-61.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S. J. and Capaldi, R. A.** (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* **64**, 985-993.
- Roussel, D., Chainier, F., Rouanet, J. and Barré, H.** (2000). Increase in the adenine nucleotide translocase content of duckling subsarcolemmal mitochondria during cold acclimation. *FEBS Lett* **477**, 141-4.
- 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**, 258-62.
- Rowland, A. A. and Voeltz, G. K.** (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 607-25.

S-

- Saks, V. A., Belikova, Y. O. and Kuznetsov, A. V.** (1991). In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *Biochim Biophys Acta* **1074**, 302-11.
- Santel, A. and Fuller, M. T.** (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* **114**, 867-874.
- Schew, W. A., McNabb, F. M. and Scanes, C. G.** (1996). Comparison of the ontogenesis of thyroid hormones, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in ad libitum and food-restricted (altricial) European starlings and (precocial) Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol* **101**, 304-16.
- Schmidt-Nielsen, K.** (1997). Animal physiology: adaptation and environment: Cambridge University Press.
- Scholander, P. F., Hock, R., Walters, V., Johnson, F. and Irving, L.** (1950). Heat regulation in some arctic and tropical mammals and birds. *Biol Bull* **99**, 237-258.
- Seguchi, H., Ritter, M., Shizukuishi, M., Ishida, H., Chokoh, G., Nakazawa, H., Spitzer, K. W. and Barry, W. H.** (2005). Propagation of Ca²⁺ release in cardiac myocytes: Role of mitochondria. *Cell Calcium* **38**, 1-9.
- Shirihai, H., Jarrett, B., Cox, J. and Kirwan, G. M.** (2009). A complete guide to Antarctic wildlife: The birds and marine mammals of the Antarctic continent and the southern ocean (Second Edition). London: A & C Black.
- 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**, 181-195.
- Skulachev, V. P.** (1991). Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* **294**, 158-62.
- Skulachev, V. P.** (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci* **26**, 23-29.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.-L. and van der Bliek, A. M.** (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**, 2245-2256.
- Smirnova, E., Shurland, D.-L., Newman-Smith, E. D., Pishvae, B. and van der Bliek, A. M.** (1999). A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. *J Biol Chem* **274**, 14942-14947.
- Smith, D., Fletcher, D., Buhr, R. and Beyer, R.** (1993). Pekin duckling and broiler chicken pectoralis muscle structure and composition. *Poult Sci* **72**, 202-208.
- Smith, J. H.** (1963). Relation of body size to muscle cell size and number in the chicken. *Poult Sci* **42**, 283-290.
- Soriano, F. X., Liesa, M., Bach, D., Chan, D. C., Palacin, M. and Zorzano, A.** (2006). Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes* **55**, 1783-91.

- Sterling, K.** (1986). Direct thyroid hormone activation of mitochondria: the role of adenine nucleotide translocase. *Endocrinol* **119**, 292-295.
- Sterling, K., Campbell, G. A. and Brenner, M. A.** (1984). Purification of the mitochondrial triiodothyronine (T₃) receptor from rat liver. *Acta endocrinologica* **105**, 391-397.

T-

- 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.
- Talesara, G. L. and Goldspink, G.** (1978). A combined histochemical and biochemical study of myofibrillar ATPase in pectoral, leg and cardiac muscle of several species of bird. *Histochem J* **10**, 695-709.
- Tata, J. R.** (2012). The road to nuclear receptors of thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta* **1830**(7) 3860-6.
- Territo, P. R., Mootha, V. K., French, S. A. and Balaban, R. S.** (2000). Ca²⁺ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F₀/F₁-ATPase. *Am J Physiol* **278**, C423-C435.
- Teulier, L.** (2010). Adaptations métaboliques du caneton de Barbarie (*Cairina moschata*) et du Manchot Royal (*Aptenodytes patagonicus*) en réponse à un stress chronique froid, vol. PhD: Université Claude Bernard-Lyon I.
- Teulier, L., Dégletagne, C., Rey, B., Tornos, J., Keime, C., de Dinechin, M., Raccurt, M., Rouanet, J. L., Roussel, D. and Duchamp, C.** (2012). Selective upregulation of lipid metabolism in skeletal muscle of foraging juvenile king penguins: an integrative study. *Proc Biol Sci* **279**, 2464-72.
- Tondera, D., Czauderna, F., Paulick, K., Schwarzer, R., Kaufmann, J. r. and Santel, A.** (2005). The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Sci* **118**, 3049-3059.
- Torrella, J. R., Fouces, V., Palomeque, J. and Viscor, G.** (1998). Comparative skeletal muscle fibre morphometry among wild birds with different locomotor behaviour. *J Anat* **192 (Pt 2)**, 211-22.
- 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 letters* **529**, 313-318.
- Trawa, G.** (1970). Note préliminaire sur la vascularisation des membres des Spheniscides de terre Adélie.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S. and Las, G.** (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* **27**, 433-446.

U- V-

- Ueda, M., Watanabe, K., Sato, K., Akiba, Y. and Toyomizu, M.** (2005). Possible role for avPGC-1alpha 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.
- Vander, A. J., Sherman, J. H., Luciano, D. S., Raff, H., Pradel, J.-L. and Pradel, M.** (2004). Physiologie humaine: les mécanismes du fonctionnement de l'organisme: Maloine.
- Voituron, Y., Mouquet, N., de Mazancourt, C. and Clobert, J.** (2002). To freeze or not to freeze? An evolutionary perspective on the cold-hardiness strategies of overwintering ectotherms. *Am Nat* **160**, 255-270.
- von Lengerken, G., Maak, S. and Wicke, M.** (2002). Muscle metabolism and meat quality of pigs and poultry. *Veterinaria ir Zootechnika* **20**, 82-86.

W-

- Waterham, H. R., Koster, J., van Roermund, C. W., Mooyer, P. A., Wanders, R. J. and Leonard, J. V.** (2007). A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med* **356**, 1736-1741.
- Weitzel, J. M., Iwen, K. A. and Seitz, H. J.** (2003). Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp Physiol* **88**, 121-8.
- Westermann, B.** (2012). Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta* **1817**, 1833-8.
- Wiesner, R., Kurowski, T. T. and Zak, R.** (1992). Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol Endocrinol* **6**, 1458-1467.
- Wijngaarden, M. A., van der Zon, G. C., van Dijk, K. W., Pijl, H. and Guigas, B.** (2013). Effects of prolonged fasting on AMPK signaling, gene expression, and mitochondrial respiratory chain content in skeletal muscle from lean and obese individuals. *Am J Physiol* **304**, E1012-E1021.
- Williams, J. B. and Tieleman, B. I.** (2001). Physiological ecology and behavior of desert birds. *Current Ornithol.* 299-353.
- Williams, P. E. and Goldspink, G.** (1978). Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. *J Anat* **127**, 459-68.
- Willmer, P., Stone, G. and Johnston, I. A.** (2000). Environmental physiology of animals: Blackwell Science Oxford.
- Wrutniak-Cabello, C., Casas, F. and Cabello, G.** (2001). Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol* **26**, 67-77.
- Wrutniak, C., Cassar-Malek, I., Marchal, S., Rasclé, A., Heusser, S., Keller, J.-M., Fléchon, J., Daua, M., Samarut, J. and Ghysdael, J.** (1995). A 43-kDa protein related to c-Erb A 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J Biol Chem* **270**, 16347-16354.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B. and Scarpulla, R. C.** (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-124.

Y-

- Yoon, Y., Krueger, E. W., Oswald, B. J. and McNiven, M. A.** (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* **23**, 5409-5420.

Z-

- Zhang, W., Chen, Y., Yang, Q., Che, H., Chen, X., Yao, T., Zhao, F., Liu, M., Ke, T., Chen, J. et al.** (2010). Mitofusin-2 protects against cold stress-induced cell injury in HEK293 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **397**, 270-6.
- Zorzano, A., Liesa, M. and Palacin, M.** (2009a). Mitochondrial dynamics as a bridge between mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *Arch Physiol Biochem* **115**, 1-12.
- Zorzano, A., Liesa, M. and Palacin, M.** (2009b). Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1846-54.
- Zorzano, A., Liesa, M., Sebastian, D., Segales, J. and Palacin, M.** (2010). Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 566-74.
- Züchner, S., Mersyanova, I. V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E. L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A. and Senderek, J.** (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* **36**, 449-451.