



HAL
open science

Relations entre efficacité mitochondriale, balance oxydative et croissance des amphibiens

Karine Salin

► **To cite this version:**

Karine Salin. Relations entre efficacité mitochondriale, balance oxydative et croissance des amphibiens. Ecologie, Environnement. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10219 . tel-02891029

HAL Id: tel-02891029

<https://theses.hal.science/tel-02891029v1>

Submitted on 6 Jul 2020

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.

Année 2011

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ÉCOLE DOCTORALE Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation

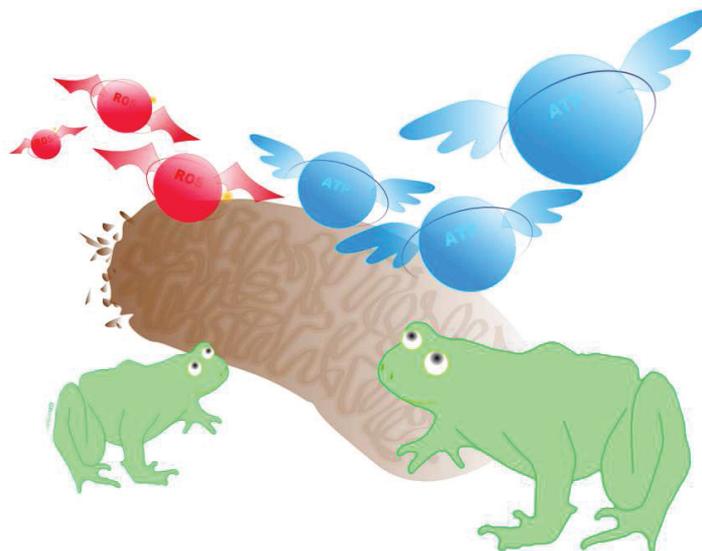
DIPLÔME DE DOCTORAT
(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenance prévue le 04 novembre 2011

par

Karine SALIN

**RELATIONS ENTRE EFFICACITE MITOCHONDRIALE, BALANCE OXYDATIVE
ET CROISSANCE DES AMPHIBIENS**



Directeur de thèse : Pr Yann Voituron ; Co-encadrant : Dr Damien Roussel

JURY : Pr Dominique Allainé
Dr Pierre Bize
Dr François Criscuolo
Pr Thierry Letellier
Pr Claude Miaud
Dr Damien Roussel
Pr Yann Voituron

Articles

ACCEPTÉS :

1. Salin K, Voituron Y, Mourin J, Hervant F. (2010) Cave colonization without fasting capacities: an example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part A, molecular & integrative physiology*, Volume 156, Issue 4, Pages 451-457. (inclu en annexe)
2. Salin K, Teulier L, Rey B, Rouanet JL, Voituron Y, Duchamp C, Roussel D. (2010) Tissue variation of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in cold-acclimated ducklings. *Acta Biochimica Polonica*, Volume 57, Issue 4, Pages 409-412. (inclu en annexe)

SOU MIS :

3. Salin K, Roussel D, Rey B and Voituron Y. David and Goliath: a mitochondrial coupling problem? *Soumis à Journal of Experimental Zoology Part A* (inclu dans le mémoire)
4. Salin K, Luquet E, Rey B Roussel D and Voituron Y. Alteration of mitochondrial functioning affects oxidative balance and growth in tadpole. *Soumis à Journal of Experimental Biology* (inclu dans le mémoire)

EN PRÉPARATION :

5. Salin K, Rey B, Grolet O, Luquet M, Devaux A, Bony S, Hemmer C, Teulier L, Roussel D, and Voituron Y. Mitochondrial plasticity in relation to body size and oxidative stress in frogs. (inclu dans le mémoire)

6. Salin K, Roussel D, Rey B and Voituron Y. Interspecific body-size scaling of mitochondrial functioning: energetic and oxidative stress perspectives. (non-inclu dans le mémoire)

7. Salin K, Rey B, Plénet S, Voituron Y, Roussel D, Luquet E. Predator-induced changes in oxidative balance of *Rana temporaria* tadpoles. (non-inclu dans le mémoire)

Communications

ORALES :

1. **Salin K.** Compromis évolutif et mitochondrie. Mai 2011. *Rencontres doctorales E2M2*, Lyon, France.
2. **Salin K,** Roussel D. Le fonctionnement mitochondrial : un des mécanismes sous-jacents aux compromis évolutifs ? May 2011. *5^{ème} colloque de MeetOchondrie*, La colle-sur-Loup, France.
3. **Salin K,** Voituron Y, Mourin J, Hervant F. (2010) Cave colonization without fasting capacities: an example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. March 2011. *Astyanax International Meeting 2011*, Ciudad Valles, Mexico.
4. **Salin K,** Roussel D, Rey B, Voituron Y. Growing fast and dying young : a mitochondrial problem ? July 2010. *16th European Bioenergetics Conference*, Varsovie, Pologne
5. **Salin K,** Roussel D, Voituron Y. David et Goliath: un problème de couplage mitochondrial? September 2009. *Congrès du Groupe Français de Bioénergétique*, Clermont-ferrand, France.

POSTERS :

1. Salin K, Rey B, Plénet S, Voituron Y, Roussel D, **Luquet E.** Ecophysiological approach of the mechanisms involved in induced defenses in *Rana temporaria* tadpoles. September 2011. *12th European Ecological Federation*, Avila, Spain.
2. **Salin K,** Voituron Y, Mourin J, Hervant F. Ecophysiological responses to starvation and refeeding in the cave fish *Astyanax fasciatus*. July 2011. *4th International Symposium of Environmental Physiology of Ectotherms and Plants*, Rennes, France.

3. Hervant F, Voituron Y et **Salin K**. Vivre en milieu souterrain sans présenter de résistance au jeûne alimentaire : le cas du poisson tropical *Astyanax fasciatus*. January 2011. *InBioProcess 2011*, Lyon, France.
4. **Salin K**, Rey B, Hemmer C, Grolet O, Luquet E, Belouze M, Teulier L, Bony S, Gaillard I, Devaux A, Roussel D and Voituron Y. La plasticité mitochondriale : clé du *trade-off* entre longévité et croissance ? September 2010. *Ecologie 2010*, Montpellier, France.
5. **Salin K**, Rey B, Plénet S, Voituron Y, Roussel D, Luquet E. Approche écophysiological des mécanismes impliqués dans l'expression des défenses induites chez la grenouille rousse (*Rana temporaria*). September 2010. *Ecologie 2010*, Montpellier, France.
6. **Salin K**, Roussel D, Benjamin Rey, Voituron Y. Growing fast and dying young : a mitochondrial problem ? July 2010. *16th European Bioenergetics Conference*, Varsovie, Pologne
7. Salin K, Voituron Y, Mourin J, **Colson C**, Hervant F. Colonizing subterranean environment without starvation capacity : the case of the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. September 2008. *9th International Symposium of Subterranean Biology*, Freemantle, Australia.

Sommaire

<i>Articles</i>	2
<i>Communications</i>	4
<i>Sommaire</i>	6
<i>Abréviations</i>	11
<i>Index des figures</i>	13
<i>Avant - propos</i>	15
<i>Introduction</i>	17
<i>1. Cadre général : approches physiologiques des compromis évolutifs entre les traits d'histoire de vie</i>	17
1.1 Compromis évolutifs entre les traits d'histoire de vie	17
1.2 Théorie du taux de vie	19
1.3 Principe d'allocation des ressources	20
1.3.1 Limitation des ressources	20
1.3.2 Le flux de matière et d'énergie	22
1.4 Écologie du stress oxydatif	23
1.4.1 Essor d'une nouvelle approche	23
1.4.2 Théorie radicalaire du vieillissement	24
1.4.3 Stress oxydatif et traits d'histoire de vie	26
<i>2 Stress oxydatif : contrainte dans les histoires de vie</i>	27
2.1 Notion de balance oxydative	27
2.1.1 Pro-oxydants :	28
2.1.2 Défenses anti-oxydantes :	29
2.1.3 Marqueurs du stress oxydatif :	31
2.1.4 Réparation des dégâts oxydatifs :	32

2.2	Mise en évidence de l'implication du stress oxydatif dans les compromis évolutifs	32
2.2.1	Stress oxydatif, facteur de mortalité intrinsèque en milieu naturel _____	33
2.2.2	Stress oxydatif, coût d'une croissance élevée ? _____	33
2.3	Limites des études sur le stress oxydatif comme contrainte des histoires de vie	35
2.3.1	Biais d'estimation du stress oxydatif _____	35
2.3.2	Besoins énergétiques, le mécanisme implicite _____	37
3	<i>La mitochondrie, centrale énergétique cellulaire & source de stress oxydatif.</i>	39
3.1	Généralités _____	39
3.2	Centrale énergétique cellulaire _____	40
3.2.1	Théorie chimio-osmotique _____	40
3.2.2	Plasticité du rendement énergétique mitochondrial, le ratio P/O _____	42
3.3	Source de radicaux libres _____	44
3.3.1	Mécanisme _____	44
3.3.2	Régulation _____	45
3.4	Relation génération de ROS, synthèse d'ATP _____	46
3.4.1	État basal versus état phosphorylant _____	46
3.4.2	Fuites de protons _____	49
3.4.3	Fonctionnement mitochondrial, le compromis physiologique à la base du compromis évolutif ? _____	50
4	<i>Objectifs de la thèse</i> _____	51
	<i>Matériel et Méthodes</i> _____	54
1	<i>Démarche scientifique générale</i> _____	54
2	<i>Modèle d'étude : les amphibiens anoures</i> _____	55
2.1	Stade adulte _____	56
2.2	Stade larvaire _____	56
3	<i>Paramètre taille et âge des adultes</i> _____	57
4	<i>Croissance et Développement des têtards</i> _____	59
5	<i>Isolement des mitochondries</i> _____	61

5.1	Mitochondries hépatique de grenouilles _____	61
5.2	Mitochondries de têtards _____	64
6	<i>Respiration mitochondriale</i> _____	66
7	<i>Mesure du rapport ATP/O</i> _____	69
8	<i>Mesure d'activité ATPasique</i> _____	71
9	<i>Pro-oxydant = Production mitochondriale de radicaux libres</i> _____	72
10	<i>Anti-oxydants</i> _____	73
10.1	Enzymes anti-oxydantes _____	73
10.2	Capacités anti-oxydantes _____	73
11	<i>Dégâts oxydatifs</i> _____	74
11.1	Peroxydation lipidique : acide malondialdehyde _____	74
11.2	Génotoxicité _____	75
	 <i>Études expérimentales</i> _____	 77
	 1 Comparaison de populations naturelles de grenouilles présentant des taux de croissance variables - PARTIE DESCRIPTIVE _____	 77
1.1	Relation entre production d'énergie, balance oxydative et taille corporelle – Article 1, en préparation _____	77
1.2	Base mécanistique du système de conversion énergétique mitochondriale : variations du rendement des oxydations phosphorylantes – Article 2, soumis à Journal of Experimental Zoology Part A: _____	103
	 2 Impacts des modifications du fonctionnement mitochondrial sur la croissance et le développement larvaire des têtards de grenouilles rousses. PARTIE EXPÉRIMENTALE _____	 132
2.1	Choix de la molécule _____	132
2.2	Choix du modèle _____	133
2.3	Étude préliminaire I _____	135
2.3.1	Introduction _____	135
2.3.2	Matériel et Méthode _____	135

2.3.3	Résultats	137
2.3.4	Discussion	140
2.4	Étude préliminaire II	142
2.4.1	Introduction	142
2.4.2	Matériel et méthodes :	142
2.4.3	Résultats et discussion	146
2.5	Le changement d'efficacité mitochondriale affecte la balance oxydative, le développement et la croissance des têtards de grenouilles rousses – Article 3, en révision dans Journal of Experimental Biology	151

Discussion et Perspectives _____ **180**

1 Synthèse et discussion des résultats _____ **181**

1.1 Variation dans la croissance _____ **181**

1.2 Balance oxydative et croissance _____ **182**

1.2.1 Production de ROS et croissance _____ 182

1.2.2 Défenses anti-oxydantes et croissance _____ 183

1.2.3 Dégâts oxydatifs et croissance _____ 183

1.2.4 Bilan interaction balance oxydative et croissance _____ 184

1.3 Flux énergétiques et croissance _____ **188**

1.4 Mécanisme(s) sous-jacent au compromis évolutifs : balance oxydative et/ou allocation d'énergie ? _____ **189**

2 Perspectives en continuité avec la thèse _____ **190**

2.1 Dissociation compromis mitochondrial (ATP versus ROS) compromis d'allocation d'énergie (croissance versus défenses anti-oxydantes) _____ **190**

2.2 Performances post-métamorphiques des têtards traités au dNP _____ **193**

2.3 Bases mécanistiques du rendement énergétique mitochondrial des grenouilles rousses. **194**

2.4 Comment la synthèse d'ATP hépatique favorise la croissance ? _____ **195**

2.5 Comparaisons interpopulationnelles : bases génétiques et environnementales **195**

2.6 Comparaison inter-espèces _____ **197**

3	<i>Perspectives en ouverture</i>	197
----------	-----------------------------------------	------------

3.1	Approche écophysiological des mécanismes impliqués dans la réponse à la prédation chez le têtard de <i>Rana temporaria</i>. En collaboration avec Emilien Luquet et Sandrine Plénet.	197
------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

3.2	Stress oxydatif et efficacité mitochondriale comme médiateur des trajectoires d'histoire de vie chez les organismes sociaux – modèle de fourmis <i>Lasius Niger</i>. En collaboration avec Jérôme Gippet et Bernard Kaufmann	199
------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

	<i>Bibliographie</i>	203
--	-----------------------------	------------

	<i>Annexes</i>	224
--	-----------------------	------------

1	<i>Article A</i>	224
----------	-------------------------	------------

2	<i>Article B</i>	229
----------	-------------------------	------------

	<i>Résumé</i>	237
--	----------------------	------------

	<i>Abstract</i>	238
--	------------------------	------------

Abréviations

ABTS	2,2'azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulphonate)
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine-5'-diphosphate
AMP	adénosine-5'-monophosphate
ANT	transporteur des nucléotides adényliques
ATP	adénosine-5'-triphosphate
ATP/O	molécules d'ATP synthétisées par atome d'oxygène consommé
BSA	albumine bovine sérique
BSA FFA	albumine sérique de bœuf délipidée
Cat	catalase
COX	cytochrome c oxydase
Δp	force proton-motrice
DMSO	sulfoxyde diméthyl
dNP	dinitrophenol
e^-	électron
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EGTA	acide éthylène glycol-bis (2-amino-éthyl éther) N,N, N',N'-tétraacétique
FADH ₂ /FAD	flavine adénine dinucléotide réduit / oxydé
FCCP	carbonyl cyanide-p- trifluorométhoxyphenyl-hydrazone
FCCP	carbonyl cyanide m-trifluorométhoxyphenyl-hydrazone
G6P	glucose-6-phosphate
G6PDh	glucose-6-phosphate déshydrogénase
GPx	glutathion peroxydase
H ⁺	proton

H ₂ O ₂	péroxyde d'hydrogène
4-HNE	4-hydroxynonanal
HRP	horseradish peroxidase
IF1	facteur inhibiteur 1
LAC	lignes d'arrêt de croissance
MDA	malondialdehyde
Na ₂ HPO ₄	disulfite de sodium
NADH / NAD ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide réduit / oxydé
O	atome d'oxygène
·O ₂ ⁻	anion superoxyde
·OH	radical hydroxyle
P/O	phosphorylation oxydative
RCR	rapport contrôle respiratoire
ROS	dérivés réactifs de l'oxygène
SOD	superoxide dismutase
TBARs	thiobarbituric active reactive substance
TEP	1,1,3,3 tétraethoxypropane
TMPD	N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylenediamine
UCP	protéine découplante
•	
VO ₂	débit d'oxygène consommé

Index des figures

- Figure 1 : Représentation schématique de deux stratégies d'histoire de vie.* PAGE 18
- Figure 2 : Représentation graphique des compromis d'allocation d'énergie selon le modèle d'allocation de ressources. D'après van Noordwijk et de Jong, (1986).* PAGE 21
- Figure 3 : Le devenir de l'énergie et de la matière issues de la nourriture ingérée. D'après Barbault, 1981 ; Stearns, 1992* PAGE 22
- Figure 4 : La balance oxydative* PAGE 27
- Figure 5 : Illustration d'une espèce radicalaire* PAGE 28
- Figure 6 : Réactions de production et détoxification des espèces réactives de l'oxygène.* PAGE 30
- Figure 7 : Illustration d'une mitochondrie.* PAGE 39
- Figure 8 : La molécule d'ATP et ses dérivés, l'ADP et l'AMP* PAGE 40
- Figure 9 : Schéma des complexes de la chaîne respiratoire, de l'ATP synthétase et de la protéine découplante, UCP. D'après Balaban et al., 2005* PAGE 41
- Figure 10 : Relation entre potentiel de membrane (mV), le taux respiratoire, la production de ROS et la synthèse d'ATP mitochondriale. D'après Kadenbach, 2003* PAGE 47
- Figure 11 : Intégration de la mitochondrie dans les flux énergétiques et la balance oxydative.* PAGE 54
- Figure 12 : Photographies de coupes d'os obtenues par la méthode de squelettochronologie.* PAGE 59
- Figure 13 : Table de Gosner (1960) permettant la détermination les différents stades de développement des têtards.* PAGE 60
- Figure 14 : Protocole d'isolement de mitochondrie de foie de grenouille (a) et de têtards (b).* PAGE 63

Figure 15 : Illustration de la cellule de mesure de respiration mitochondriale. PAGE 65

Figure 16 : Illustration de la courbe obtenue pour tester les capacités oxydatives des mitochondries sous différentes conditions. PAGE 68

Figure 17 : Principe de la mesure du rapport ATP/O. PAGE 70

Figure 18 : Réaction enzymatique permettant le dosage du peroxyde d'hydrogène. PAGE 72

Figure 19 : Image de comet assay. PAGE 76

Figure 20 : Pourcentage de survie des têtards au cours de l'exposition au dinitrophenol. PAGE 138

Figure 21 : Suivi du développement et de la croissance des têtards en fonction du nombre de jours d'exposition au dinitrophenol. PAGE 139

Figure 22 : Métamorphose des têtards en fonction de traitement. PAGE 141

Figure 23 : Consommation d'oxygène mitochondriale sous différentes conditions respiratoires et en fonction du type d'isolement. PAGE 147

Figure 24 : Mesure des consommations d'oxygène des mitochondries de têtards. PAGE 149

Figure 25 : Graphique du rapport entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP des mitochondries de têtards. PAGE 150

Figure 26 : Protocole d'élevage des têtards et de leur exposition au traitement. PAGE 152

Figure 27 : Voies de détoxification des ROS, pouvant aboutir à des dégâts oxydatifs via la réaction de Fenton. PAGE 187

Avant - propos

L'histoire de vie décrit l'ensemble des étapes majeures du cycle de vie d'un individu, de la fécondation à la mort, incluant le développement, la croissance, la reproduction et la sénescence (Stearns, 1992). Comprendre les variations d'histoire de vie entre les individus, les populations et les espèces est un objectif majeur de la biologie évolutive et constitue une thématique pluridisciplinaire à l'interface entre la génétique, l'écologie, la physiologie et l'évolution (Stearns, 1992 ; Conover et Schultz, 1995 ; Zera et Harshman, 2001 ; Dowling et Simmons, 2009 ; Monaghan et al., 2009 ; Buttermer et al., 2010 ; Metcalfe et Alonso-Alvarez, 2010 ; Isaksson et al., 2011). Cependant, l'intégration des causes proximales et ultimes¹ dans la compréhension des histoires de vie reste encore lacunaire du fait de la complexité des mécanismes sous-jacents. Puisque les processus physiologiques pouvant intervenir dans les histoires de vie sont tellement nombreux et avec de multiples interactions possibles, il apparaît alors judicieux dans un premier temps de comprendre les bases mécanistiques au cœur des processus physiologiques à l'origine des compromis (Zera et Harshman, 2001).

Jusqu'à présent, l'approche physiologique « traditionnelle » a été de considérer les variations d'histoire de vie comme le résultat d'un compromis entre les différentes fonctions de l'organisme pour une ressource limitée (Calow, 1979 ; Stearns, 1992). Ces dernières années ont vu émerger de nombreuses études mettant en avant le rôle de la fonction immunitaire (Martin et al., 2011) et l'implication du stress oxydatif (voir l'issue spéciale n°5 dans *Functional Ecology* en 2010) comme des mécanismes impliqués dans la physiologie des histoires de vie. Bien que la question reste complexe à résoudre, l'avancement des recherches interdisciplinaires suggère très clairement qu'il est primordial de développer une approche intégrative dans laquelle la physiologie appliquée à un questionnement d'écologie fondamentale peut permettre la compréhension des processus évolutifs. Cette thèse s'inscrit dans la volonté de développer une approche mécanistique pour répondre à des problématiques fondamentales en écologie, en intégrant des outils et des concepts nouveaux de la physiologie énergétique et du stress oxydatif dans la compréhension des trajectoires de vie. Plus spécifiquement, je me suis intéressée au rôle de l'énergétique mitochondriale dans la

¹ **Causes proximales et ultimes** : les causes proximales s'intéressent aux mécanismes physiologiques à la base d'un caractère, alors que les causes ultimes expliquent l'intérêt évolutif de ce caractère.

disponibilité en ressources énergétiques, ainsi que la contrainte oxydative due au fonctionnement de la mitochondrie.

Aussi, la première partie de cette thèse, sous forme d'« Introduction », permettra de replacer mes études expérimentales dans le contexte scientifique. Dans la première partie de l'introduction, je présenterai l'évolution des approches intégratives dans les recherches sur les bases mécanistiques des variations d'histoire de vie, qui ont amené à considérer les ressources énergétiques, mais aussi le stress oxydatif comme éléments clés. La seconde partie de l'introduction sera consacrée à définir et illustrer le rôle du stress oxydatif dans les histoires de vie afin d'en faire ressortir le potentiel d'applications mais aussi les limites et les difficultés de cette approche. Cet état de l'art conduit à considérer le stress oxydatif dans son ensemble, mais aussi à inclure la cause même de la génération du stress inhérent à l'activité métabolique des mitochondries, dont la fonction est de produire la principale forme d'énergie utilisable par la cellule, la molécule d'ATP. Ainsi, la notion d'allocation de ressources sera revisitée à un niveau subcellulaire, en tenant compte d'un paramètre important du fonctionnement mitochondrial : de l'efficacité de la mitochondrie à produire de l'énergie utile sous forme d'ATP. Enfin, la dernière partie présentera les mitochondries, *centrales énergétiques* de la cellule et sources de radicaux libres de l'oxygène, comme la clé de voûte possible dans le contrôle des histoires de vie. La deuxième partie de la thèse, le « Matériel et Méthodes » reprendra les principales méthodes utilisées au cours de ma thèse dans les différentes études expérimentales. La troisième partie sera consacrée à la présentation des trois « Études expérimentales » effectuées au cours de ma thèse, sous forme d'articles en révision, soumis ou en corrections. Enfin, la quatrième et dernière partie intitulée « Discussion et Perspectives » représente une large discussion des résultats, ce qui amène à de nouveaux questionnements et à de nouvelles pistes d'investigations pour approfondir ce travail.

Introduction

1. Cadre général : approches physiologiques des compromis évolutifs entre les traits d'histoire de vie

1.1 Compromis évolutifs entre les traits d'histoire de vie

L'ensemble des caractères impliqués dans l'histoire de vie d'un organisme sont plus précisément nommés traits d'histoire de vie. Les principaux traits d'histoire de vie sont la taille à la naissance, la vitesse et la durée de croissance, l'âge et la taille à maturité sexuelle, le nombre d'épisodes de reproduction, le nombre et taille des descendants, la durée de la vie (Stearns, 1992). La valeur des traits (grandir plus ou moins vite, se reproduire plus ou moins tôt, ...) est soumise au processus de sélection naturelle, ce qui maximise la valeur sélective² de l'organisme (ou *fitness*), *i.e.* la production de descendants viables et capables de se reproduire (Williams, 1966 ; Stearns, 1992). Théoriquement, un organisme avec une croissance rapide, une reproduction précoce, immortel, donnant une production continue de descendants de bonne qualité en grand nombre, devrait être avantage par la sélection naturelle (Law, 1979). Pourtant, cet organisme à la stratégie d'histoire de vie « idéale », qualifié de démon de Darwin, n'est jamais rencontré ; au contraire, dans la nature, une très grande diversité de combinaisons de traits d'histoire de vie se retrouve, constituant une infinité de stratégies d'histoire de vie.

Le concept de compromis évolutif entre les traits d'histoire de vie est central pour comprendre l'évolution des stratégies (Fisher, 1930, Cody, 1966 ; Stearns, 1992, Zera et Harshman, 2001). En effet, les compromis sont des relations (négatives) par lesquelles le changement d'un trait A entraîne une modification du trait B. L'augmentation de la valeur sélective acquise par l'évolution du trait A est contrebalancée par les effets « néfastes » de

² La notion de **valeur sélective** comprend deux niveaux d'approches : une approche génotypique et une approche phénotypique. Au niveau des gènes, la valeur est estimée par la fréquence allélique, alors qu'au niveau de l'organisme, la valeur est estimée en termes de descendance (Stearns, 1992). Dans le cadre de mes travaux de thèse, la notion de valeur sélective sera abordée uniquement au niveau de l'organisme.

l'évolution du trait B. Par exemple, un compromis peut être réalisé entre le nombre et la taille des descendants produits par évènement de reproduction, comme schématisé sur la figure 1.

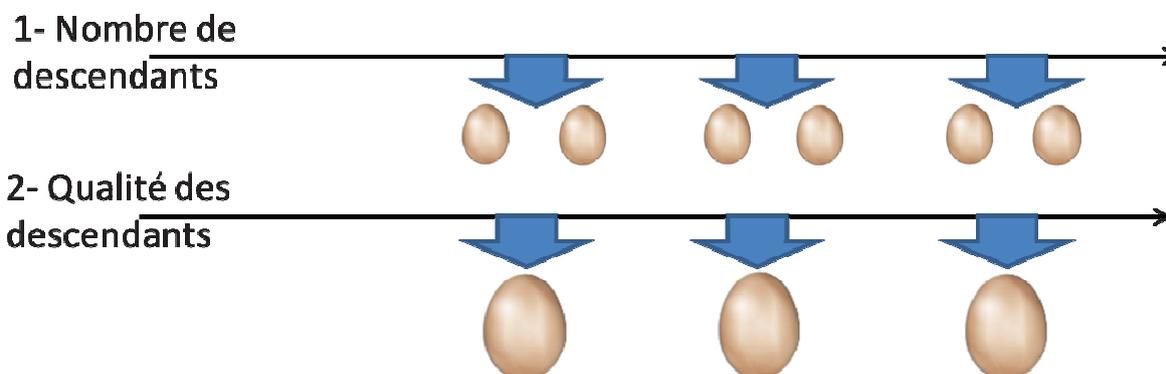


Figure 1 : Deux stratégies d'histoire de vie sont représentées : en 1- un organisme avec un nombre de descendants élevé (œufs) de petite taille (représentée par la dimension de l'œuf) par évènement de reproduction (flèches bleues) au cours de sa vie (flèche noire horizontale). La stratégie 2 représente une stratégie avec un nombre de progéniture inférieur pour une taille supérieure.

Le nombre de descendants produits est différent entre les deux stratégies, mais en fonction des conditions environnementales, le nombre de descendants qui survivra et qui parviendra à reproduction, maximisera la valeur sélective des parents (Stearns, 1992). Les compromis les plus fréquemment étudiés sont ceux entre la reproduction et la survie, la reproduction immédiate et la reproduction future, la reproduction et la croissance, et le nombre et la qualité des descendants (Stearns, 1992).

De tels compromis ont nécessairement une base physiologique, avec des mécanismes qui contraignent l'évolution des stratégies d'histoire de vie. Au cours du XX^{ème} siècle, les études portant sur la physiologie des compromis évolutifs ont permis de mettre en évidence trois composantes majeures dans la régulation de ces compromis : les bases génétiques, la régulation hormonale et la gestion des ressources énergétiques (synthèse dans Zera et Harshman, 2001). Par ailleurs, au cours de ces dernières années, le champ de l'écologie a vu l'émergence d'un nouveau domaine appelé « *oxidative-stress ecology* » ou encore « *antioxidant ecology* » (Von Schantz et al., 1999 ; Moller et al., 2000 ; Salmon et al., 2001 ; Wang et al., 2001 ; Zera et Harshman, 2001 ; Alonzo-Alvarez et al., 2004 ; 2006, 2007 ; Wiersma et al., 2004 ; Costantini et al., 2008, 2010 ; De Block et Stoks, 2008 ; Selman et al.,

2008; Dowling et Simmons, 2009 ; Monaghan et al., 2009; Nussey et al., 2009 ; McGraw et al., 2010 ; Metcalfe et Alonso-Alvarez, 2010, Isaksson et al., 2011). Pendant mes travaux de thèse, je me suis focalisée sur les aspects énergétiques et les contraintes oxydatives impliqués dans les compromis. Plusieurs hypothèses convergent vers le fait que tous les organismes ont besoin de fournir de l'énergie aux processus biologiques dont ils dépendent. Ainsi, différents concepts, non exclusifs, mettent en avant les mécanismes du métabolisme comme médiateurs des compromis entre les traits d'histoire de vie. Je développerai donc ces parties dans la suite du manuscrit. Historiquement, la théorie du taux de vie (Rubner, 1908) a été la première à intégrer le métabolisme dans les mécanismes de régulation des caractéristiques de vie des organismes. Puis le principe d'allocation des ressources (Stearns, 1992) a été intégré comme paramètre explicatif de la mise en place des stratégies de vie. Enfin, depuis quelques années, le rôle du stress oxydatif, reconnu depuis longtemps en physiopathologie, a été progressivement pris en compte comme une contrainte à l'évolution des histoires de vie (McGraw et al., 2010).

1.2 Théorie du taux de vie

La première approche physiologique des stratégies de vie a été réalisée il y a plus d'un siècle par Rubner, en 1908, dans l'optique de comprendre « Pourquoi meurt-on ? ». Les liens entre la durée de vie, le taux métabolique et la masse corporelle d'un organisme ont été appréhendés par le calcul du «*pool* total d'énergie sur la durée de vie » de différentes espèces de mammifères (cochons d'inde, chats, chiens, vaches et chevaux). Ce *pool* représente l'énergie dépensée par unité de masse au cours de la vie de l'animal. Rubner a déterminé que sur la durée d'une vie, cette la quantité d'énergie rapportée à la masse corporelle, serait une valeur relativement constante entre les cinq espèces de mammifères, ce qui se traduit par l'équation (1).

$$(1) \quad \text{Pool d'énergie sur la vie} = \text{Constante} = \frac{\text{métabolisme (kcal)}}{\text{masse corporelle (g)}} * \text{durée de vie (an)}$$

En effet, le *pool* d'énergie sur la vie varie de 141 000 kcal.g⁻¹ à 265 500 kcal.g⁻¹ entre les 5 espèces (facteur d'environ 1,8), ce qui représente une différence négligeable en comparaison de la différence de masse des animaux concernés (variable d'un facteur 50 000). Deux

décennies plus tard, la notion de *pool* d'énergie a été reprise par Raymond Pearl (1928) et nommée la théorie du taux de vie (*Rate of living theory* ou *ROL theory*). Selon cette théorie, un gramme de tissu dépense la même quantité d'énergie sur la vie de l'animal, quelque soit l'espèce. La quantité d'énergie à dépenser sur une vie serait donc fixe. De fait, l'animal qui consommerait rapidement son *pool* d'énergie accélérerait sa mort (Pearl, 1928).

Rubner a été le premier à suggérer que l'énergie pourrait être le médiateur entre les traits des organismes, mais sans aborder les notions de compromis évolutifs ou de stratégies de vie. La principale contradiction de la théorie du taux de vie est venue de la comparaison interclasse entre les oiseaux et les mammifères, indiquant que pour une masse donnée, les oiseaux combinent à la fois une durée de vie importante et un métabolisme élevé en comparaison aux mammifères. Ainsi, des études se sont articulées autour du calcul du *pool* d'énergie et ont partiellement réfuté la constance de ce trait. Cette théorie a alors été peu à peu abandonnée au regard de la littérature, et d'autres idées ont émergé avec une approche plus écophysiologique. D'une part, le principe d'allocation des ressources a placé le métabolisme énergétique au centre de la compréhension des histoires de vie (Stearns, 1992). D'autre part, la théorie radicalaire du vieillissement a récemment été intégrée dans les compromis d'histoire de vie (McGraw et al., 2010) apportant ainsi une base mécanistique à la relation entre métabolisme et longévité décrite dans la théorie du taux de vie (Speakman, 2005).

1.3 Principe d'allocation des ressources

1.3.1 Limitation des ressources

Progressivement, au cours du XX^{ème} siècle, la notion de compromis évolutif a été appréhendée en termes d'allocation des ressources énergétiques (Fisher, 1930 ; Cole, 1954 ; Townsend et Calow, 1981 ; Cody, 1966 ; Stearns, 1992). Contrairement à la théorie du taux de vie, celle-ci repose sur une contrainte majeure que subissent les animaux en milieu naturel : l'accès à la nourriture, paramètre limitant le flux d'énergie qui traverse l'organisme. La prise en compte de ce paramètre est donc fondamentale pour l'étude des stratégies, lesquelles sont façonnées par la sélection naturelle. Si un organisme ne peut accéder qu'à une quantité limitée de ressources nutritives, l'énergie allouée à un trait donné n'est plus disponible pour d'autres

traits. Ainsi, un individu disposant d'un apport d'énergie insuffisant pour maximiser chaque trait, présentera une interaction négative entre les traits partageant cet apport d'énergie (van Noordwijk et de Jong, 1986, Figure 2).

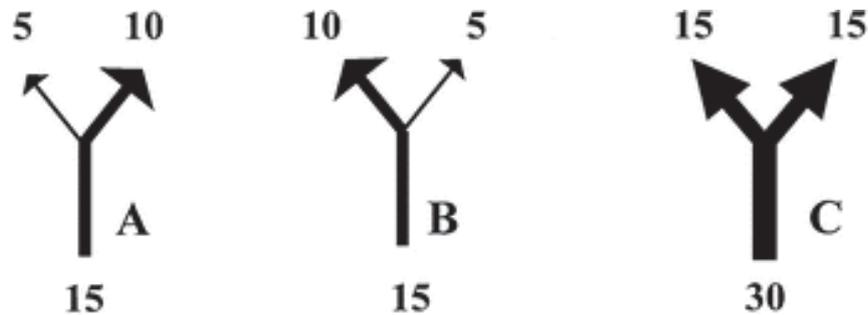


Figure 2 : Représentation graphique des compromis d'allocation d'énergie selon le modèle d'allocation de ressources de van Noordwijk et de Jong, (1986). La valeur à la base du Y représente la quantité d'apport alimentaire, soit les « entrées » à l'origine du flux énergétique. La quantité relative d'énergie allouée entre les deux traits est représentée par la valeur à l'extrémité de chaque branche, soit les « sorties » du flux énergétique. Les schémas A et B représentent des compromis qui se réalisent entre deux traits lorsque la quantité de nourriture est limitante pour couvrir simultanément l'ensemble des besoins énergétiques de deux traits ; les options A ou B peuvent dépendre de l'environnement. Le schéma C représente le cas de figure où l'organisme possède des apports alimentaires suffisants pour couvrir l'ensemble des besoins énergétiques des deux traits. D'après Zera et Harshman, 2001.

Le principe d'allocation de l'énergie présuppose donc que tout organisme dispose d'un budget d'énergie limité par le flux d'énergie entrant (l'alimentation) pouvant être limitant pour les flux énergétiques sortant (les dépenses énergétiques). La limitation des ressources contraint l'organisme à mettre en place un compromis qui débouche sur une stratégie d'histoire de vie. Les stratégies d'histoire de vie peuvent alors être considérées comme la résultante d'un partage optimal des ressources entre les différents traits de l'organisme, que l'on regroupe classiquement en trois catégories, ou performances : la maintenance, la croissance et la reproduction (Stearns, 1992). Ainsi, selon le principe d'allocation des ressources, quand un organisme ne dispose que d'une quantité d'énergie limitée pour survivre, grandir et se reproduire, la pression de la sélection naturelle optimise l'allocation des ressources entre ces trois processus biologiques fondamentaux.

1.3.2 Le flux de matière et d'énergie

Comme il est montré sur la figure 3 une partie des ressources alimentaires ingérées est perdue dans les coûts (fèces, excréments et chaleur). Parmi la production nette d'énergie, une certaine quantité est allouée à la maintenance de l'animal, assurant ainsi sa survie.

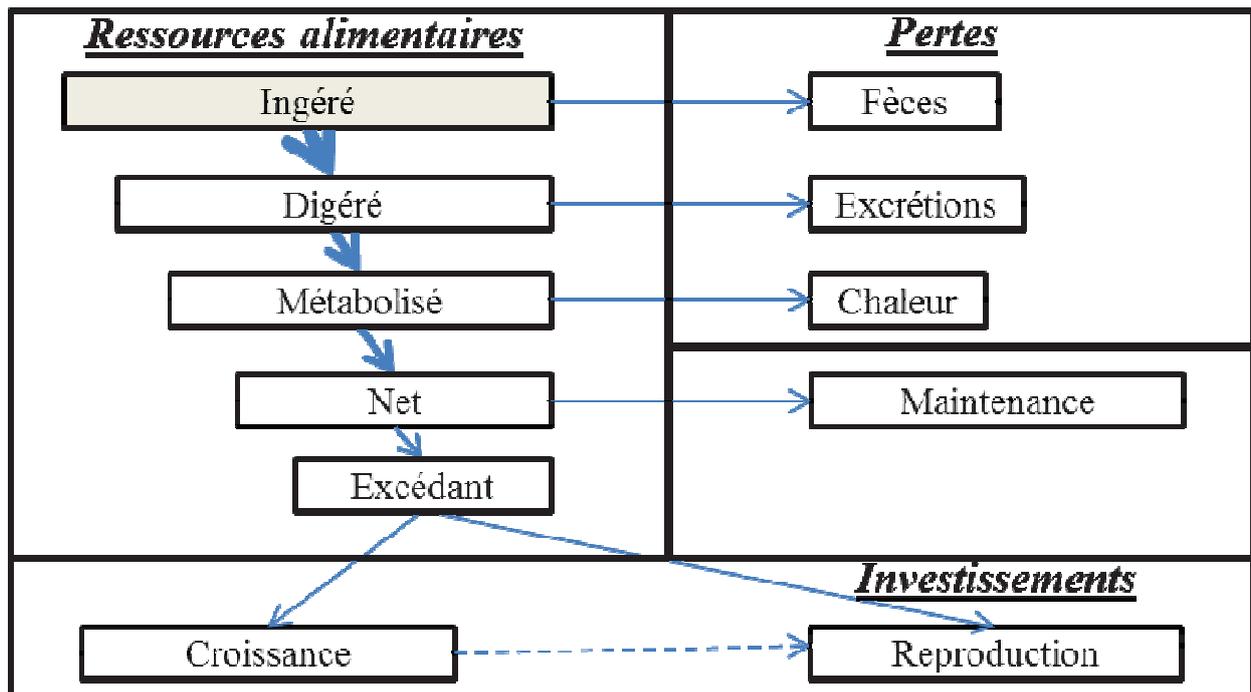


Figure 3 : Les flux de l'énergie et de la matière issues de la nourriture ingérée, répartis dans les pertes, la maintenance et les investissements dans la croissance et la reproduction. D'après Barbault, 1981 ; Stearns, 1992

Selon Barbault (1981) et Stearns (1992), seul l'excédant est investi dans la croissance et la reproduction. A l'échelle de la vie de l'organisme, investir dans la croissance est considéré comme un investissement indirect dans la reproduction future. En effet, la taille (corrélée positivement à la fécondité) et l'âge à la maturité sont des paramètres importants pour le succès reproducteur (Stearns, 1992). En revanche, à un instant t, les investissements dans la croissance se font au détriment de la reproduction. L'interaction entre 2 traits peut alors entraîner un coût immédiat ou un bénéfice par l'amélioration de la reproduction future.

Le coût d'un investissement accru dans un trait a généralement été mesuré en termes de conséquences ultimes (la survie, la croissance, la reproduction future, la taille ou le nombre de descendants...). Toutefois, les mécanismes physiologiques proximaux à l'origine des compromis sont encore très mal compris. Selon le principe d'allocation des ressources, la quantité de matière et d'énergie allouée à la reproduction ne serait plus disponible pour assurer les fonctions de maintenance. De ce fait, une augmentation de l'allocation d'énergie dans la reproduction, entraîne une diminution simultanée d'allocation d'énergie pour la survie. Bien que la plupart des modèles de stratégies d'histoire de vie soient basés sur les principes d'allocation des ressources, les bases mécanistiques, traduites par la notion de *monnaie*, demeurent obscures (Zera et Harshman, 2001 ; Alonso-Alvarez et al., 2006). Même si l'énergie est probablement à la base des compromis, ce principe ne permet pas d'identifier les causes et les conséquences fonctionnelles du compromis pour les traits impliqués. Pour cela, des progrès significatifs ont été réalisés ces dernières années quant à la compréhension des mécanismes physiologiques sous-jacents aux compromis. Le mécanisme *candidat* auquel les écologistes ont récemment porté beaucoup d'intérêts est le stress oxydatif (Alonso-Alvarez et al., 2004 ; Selman et al., 2008 ; Dowling et Simmons, 2009 ; Monaghan et al., 2009).

1.4 *Écologie du stress oxydatif*

1.4.1 **Essor d'une nouvelle approche**

Les recherches sur le stress oxydatif existent depuis plusieurs dizaines d'années mais sont utilisées pour comprendre les processus écologiques seulement depuis le début du XXI^{ème} siècle. Cette approche pluridisciplinaire a été nommée *écologie du stress oxydatif*, ou encore *écologie des antioxydants* (Costantini et al., 2010 ; McGraw et al., 2010 ; Metcalfe et Alonso-Alvarez, 2010) et a connu un essor remarquable ces dernières années. De manière à donner une représentation de la « naissance » et de la « croissance » exponentielle des recherches en écologie du stress oxydatif, Mc Graw et al. (2010) ont répertorié le nombre d'articles contenant les sujets « antioxydant* » plus « ecolog* » ou « oxidative stress » plus « ecolog* » à partir du moteur de recherche bibliographique « Web of Science ». Tous les

articles correspondants datent d'après 1990. Par ailleurs, plus de 85% de ces articles ont été publiés après 2000 (McGraw et al., 2010). L'envolée de cette discipline est encore plus remarquable lorsqu'on observe le nombre de publications durant l'année qui vient de s'écouler, entre l'article de McGraw (le 15 juillet 2010) et le 15 juillet 2011. Les sujets « antioxidant* » plus « ecolog* » ou « oxidative stress » plus « ecolog* » permettaient de référencer 595 articles en 2010, alors qu'un an plus tard, 817 articles sont inclus dans cette thématique. Cela signifie que 27% des études portant directement sur le stress oxydatif en écologie se sont réalisées pendant l'année qui vient de s'écouler.

Comment expliquer l'émergence de l'écologie du stress oxydatif ? Dans un contexte scientifique d'une recherche persistante des mécanismes proximaux sous-jacents aux compromis d'histoire de vie (Zera et Harshman, 2001 ; Roff et Fairbain, 2007), le stress oxydatif a été proposé comme un mécanisme candidat à la base des compromis. Basé sur la théorie radicalaire du vieillissement (Harman, 1956), il a été suggéré que le déclin des performances avec l'âge pourrait être dû à l'accumulation de dommages causés par les radicaux libres de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*) tout au long de la vie. Von Schantz, en 1999, puis Moller, en 2000, et Salmon, en 2001, ont été les premiers à souligner l'importance du stress oxydatif dans la sélection sexuelle, et plus globalement, en écologie évolutive. Puis progressivement, les recherches et les hypothèses ont été mises en place en incorporant la théorie radicalaire du vieillissement d'Harman dans la théorie d'histoire de vie (Alonzo-Alvarez et al., 2004 ; 2006, 2007 ; Wiersma et al., 2004 ; Costantini et al., 2008, 2010 ; De Block et Stoks, 2008 ; Selman et al., 2008 ; Dowling et Simmons, 2009 ; Monaghan et al., 2009 ; Nussey et al., 2009 ; McGraw et al., 2010 ; Metcalfe et Alonso-Alvarez, 2010, Isaksson et al., 2011).

1.4.2 Théorie radicalaire du vieillissement

L'idée que l'oxygène soit toxique pour l'organisme est connue depuis le XIX^{ème} siècle lorsque Paul Bert décrit les effets toxiques d'une forte pression partielle en oxygène, entraînant un état de convulsion chez les scaphandriers (l'effet Paul Bert, 1878). Quelques

années plus tard, l'oxydation de l'acide tartrique par le peroxyde d'hydrogène, catalysée par l'ion Fe^{2+} , a été mise en évidence par Fenton (1894). La connaissance de cette réaction chimique a permis de comprendre que les radicaux peroxydes subissent une réaction en chaîne, entraînant la formation de radicaux hydroxyles, connus aujourd'hui comme étant les plus toxiques (Haber et Weiss, 1932). Cette réaction, nommée réaction d'Haber-Weiss, est maintenant considérée comme centrale pour la formation du radical hydroxyle dans les cellules. Cependant, le lien entre toxicité de l'oxygène et production de ROS n'était encore pas compris. En 1954, grâce aux avancées technologiques, Comoner et ses collaborateurs ont montré que les radicaux libres sont produits dans les cellules vivantes et que leur production était plus élevée dans les tissus métaboliquement plus actifs. En 1956, Harman postule que l'utilisation d'oxygène provoque des lésions tissulaires dues à la production de radicaux libres. Il propose ensuite en 1972 que le fer et autres métaux physiologiques participent au métabolisme des ROS dans la cellule via la réaction d'Haber-Weiss. Les ROS seraient alors un sous-produit des réactions d'oxydoréduction qui endommageraient les molécules environnantes comme l'ADN mitochondrial (Harman, 1972). Au cours de la vie de l'organisme, l'accumulation de ces dégâts induit des dysfonctionnements cellulaires, aboutissant au vieillissement, voire à la perte des fonctions biologiques et à la mort de l'organisme. Ce processus de vieillissement naturel, aussi nommé sénescence, est constitué de quatre propriétés : il est progressif, endogène, irréversible et délétère pour l'organisme (Hulbert et al., 2007).

Les hypothèses d'Harman constituent la base de la théorie radicalaire du vieillissement, aujourd'hui soutenue par un grand nombre de travaux, principalement dans le domaine de la physiopathologie (Beckman et Ames, 1998 ; Brand, 2000 ; Finkel et Holbrook, 2000 ; Dröge, 2002 ; Balaban et al., 2005 ; Barja, 2007 ; Salmon et al., 2011). Selon une approche évolutive, cette théorie permet de comprendre le déclin des composantes de la valeur sélective des individus en fonction de l'âge (Kirkwood et Rose, 1991 ; Kirkwood et Austad, 2000). Ce mécanisme permettrait aussi d'expliquer la relation entre le taux métabolique basal et la durée de vie de l'individu, comme annoncé dans la théorie du taux de vie de Rubner. Cependant, l'implication des dégâts oxydatifs dans la mort de l'organisme reste énigmatique (Sohal et Weindruch, 1996 ; Finkel et Holbrook, 2000).

1.4.3 Stress oxydatif et traits d'histoire de vie

Étonnamment, le lien entre investissement dans un trait et stress oxydatif a été suggéré il y a seulement quelques années (Von Schatz et al., 1999 ; Salmon et al., 2001, Wang et al., 2001). Par exemple, il est bien admis que la reproduction demande de l'énergie, de la production de gamètes aux soins parentaux (Zera et Harshman, 2001 ; Alonso-Alvarez et al., 2004 ; 2007 ; Dowling et Simmons, 2009 ; Monaghan et al., 2009). Ceci est à l'origine d'une augmentation du métabolisme énergétique des parents, généralement mesurée par une augmentation de la consommation d'oxygène (Angilletta & Sears, 2000 ; Nilsson, 2002). Les auteurs montrent que la reproduction a pour conséquence d'accroître la susceptibilité au stress oxydatif, ce qu'ils expliquent par le fait qu'un taux métabolique plus élevé génèrerait une production de ROS accrue et / ou l'absence d'ajustement du système des défenses anti-oxydantes (Alonso-Alvarez et al., 2004 ; 2007 ; Dowling et Simmons, 2009 ; Monaghan et al., 2009). A l'échelle de l'organisme, les conséquences seront une diminution de la probabilité de survie et du succès reproducteur futur.

Dans le contexte des compromis évolutifs, cet exemple nous permet d'émettre l'hypothèse que les conséquences oxydatives de l'investissement énergétique dans un processus biologique peuvent résulter de deux mécanismes non exclusifs :

- Premièrement, l'investissement dans un trait peut entraîner **une réduction de l'allocation d'énergie dans le système de protection cellulaire contre les ROS**, rendant les individus plus sensibles aux attaques radicalaires (Finkel et Holbrook, 2000 ; Salmon et al., 2001 ; Wang et al., 2001 ; Wiersma et al., 2004 ; Monaghan et al., 2009 ; Hall et al., 2010 ; Horak et Cohen, 2010 ; Isaksson et al., 2011). Ainsi, le compromis entre le trait favorisé et la diminution de l'investissement dans les systèmes de protection cellulaire s'intègre dans le principe d'allocation des ressources (De Block et Stoks, 2008).

- Deuxièmement, l'approvisionnement d'un trait en énergie peut en soi **causer un stress oxydatif via une augmentation de la génération de ROS**. L'excès de stress oxydatif pourrait être la base mécanistique des compromis évolutifs, indépendamment des phénomènes d'allocation d'énergie dans un caractère (Alonso-Alvarez et al., 2004, 2006 ; De Block et Stoks, 2008, Selman et al., 2008 ; Dowling et Simmons, 2009 ; Monaghan et al., 2009 ; Isaksson et al., 2011). En effet, le fonctionnement de la mitochondrie permettant la

synthèse de l'énergie cellulaire nécessaire au développement d'un trait est un processus qui génère inévitablement une sous-production de ROS.

Afin de mieux comprendre l'implication du stress oxydatif dans les compromis d'histoire de vie, la contrainte oxydative impliquée lors d'investissement dans le trait « croissance » sera présentée après une définition détaillée de la balance oxydative.

2 Stress oxydatif : contrainte dans les histoires de vie

2.1 Notion de balance oxydative

La théorie radicalaire du vieillissement nous amène à considérer les ROS comme étant des déchets du métabolisme, qui altèrent les macromolécules de l'organisme et sont donc à l'origine d'une accumulation de dégâts (Harman, 1956 ; Kirkwood et Austad, 2000 ; Balaban et al., 2005 ; Hulbert et al., 2007). Il est maintenant reconnu que la relation stress oxydatif – dégâts oxydatifs est plus complexe (Beckman et Ames, 1998 ; Balaban et al., 2005). En effet, le stress oxydatif ne peut pas être estimé simplement par la mesure des pro-oxydants puisque les dégâts induits sont limités par des systèmes de défenses anti-oxydantes. En tenant compte de la résultante, les dégâts oxydatifs, ces notions sont regroupées sous le terme de balance oxydative (Dröge, 2002 ; Balaban et al., 2005 ; Monaghan et al., 2009 ; Figure 4).

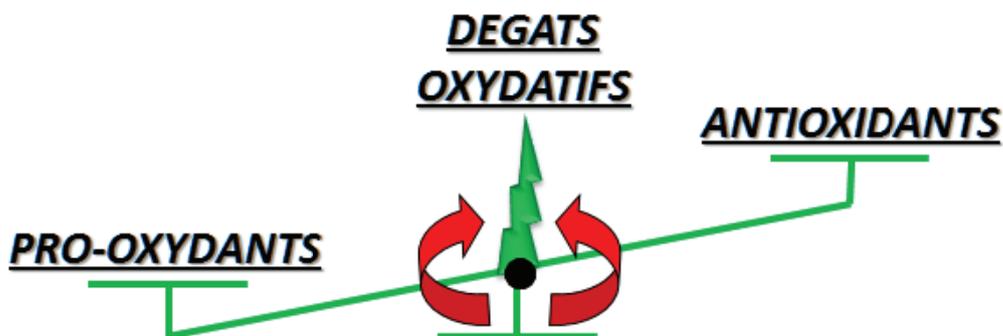


Figure 4 : La balance oxydative

Les études sur le stress oxydatif ont révélé de trop nombreuses variables pour en faire une présentation exhaustive. Bien qu'il soit important de tenir compte de la totalité des variables composant la balance oxydative, il ne sera exposé ici que les critères les plus communément considérés pour mesurer les pro-oxydants, les anti-oxydants et les dégâts oxydatifs.

2.1.1 Pro-oxydants :

Les molécules pro-oxydantes sont générés par de nombreux sites : les mitochondries (comme sous-produit de la synthèse d'énergie ; Boveris et al., 1972), les peroxysomes (majoritairement au cours de la β -oxydation des lipides ; Schrader et Fahimi, 2006), ainsi que diverses enzymes cytosoliques comme le cytochrome P450 (catalyseur de réactions d'oxydation), le complexe NADPH oxydase des phagocytes (Lambeth, 2004). Par ailleurs, de nombreux agents environnementaux sont à l'origine d'une production de ROS : les ultra-violets, les radiations ionisantes, ou encore certaines toxines (Finkel & Holbrook, 2000).

Bien que toutes ces sources contribuent au stress oxydatif, en conditions physiologiques, la majorité des ROS sont produits par la mitochondrie (Finkel & Holbrook, 2000 ; approximativement 90%, Balaban et al., 2005). C'est pourquoi la mitochondrie sera la seule source traitée dans mes travaux.

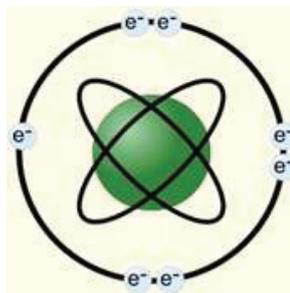


Figure 5 : Illustration d'une espèce radicalaire : un atome possédant un électron libre sur sa couche externe.

La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres de l'oxygène une grande instabilité (Figure 5). En conséquence, ils réagissent avec de nombreux composés dans

des processus le plus souvent non spécifiques. Ces molécules peuvent très rapidement interagir avec un autre atome afin d'équilibrer les charges, convertissant cet atome en un second radical libre, et générant ainsi une réaction en chaîne qui peut causer des dégâts au niveau des macromolécules biologiques. L'oxygène est un pro-oxydant qui se retrouve sous plusieurs formes moléculaires dont les principales sont : le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$, 1/2 vie à 37°C de 1.10^{-9} sec), l'anion superoxyde (O_2^- , 1/2 vie à 37°C de 1.10^{-6} sec) et une espèce réactive de l'oxygène non radicalaire, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , plus stable).

2.1.2 Défenses anti-oxydantes :

Dans l'organisme, deux niveaux de protection cellulaire contrecarrent l'effet nocif de la production « inévitable » de radicaux libres : 1- des défenses anti-oxydantes, ayant un rôle dans la détoxification des ROS ; 2- des mécanismes de réparation des dégâts oxydatifs des acides nucléiques, lipides et protéines (ils seront définis dans un paragraphe indépendant pour respecter la chronologie des processus).

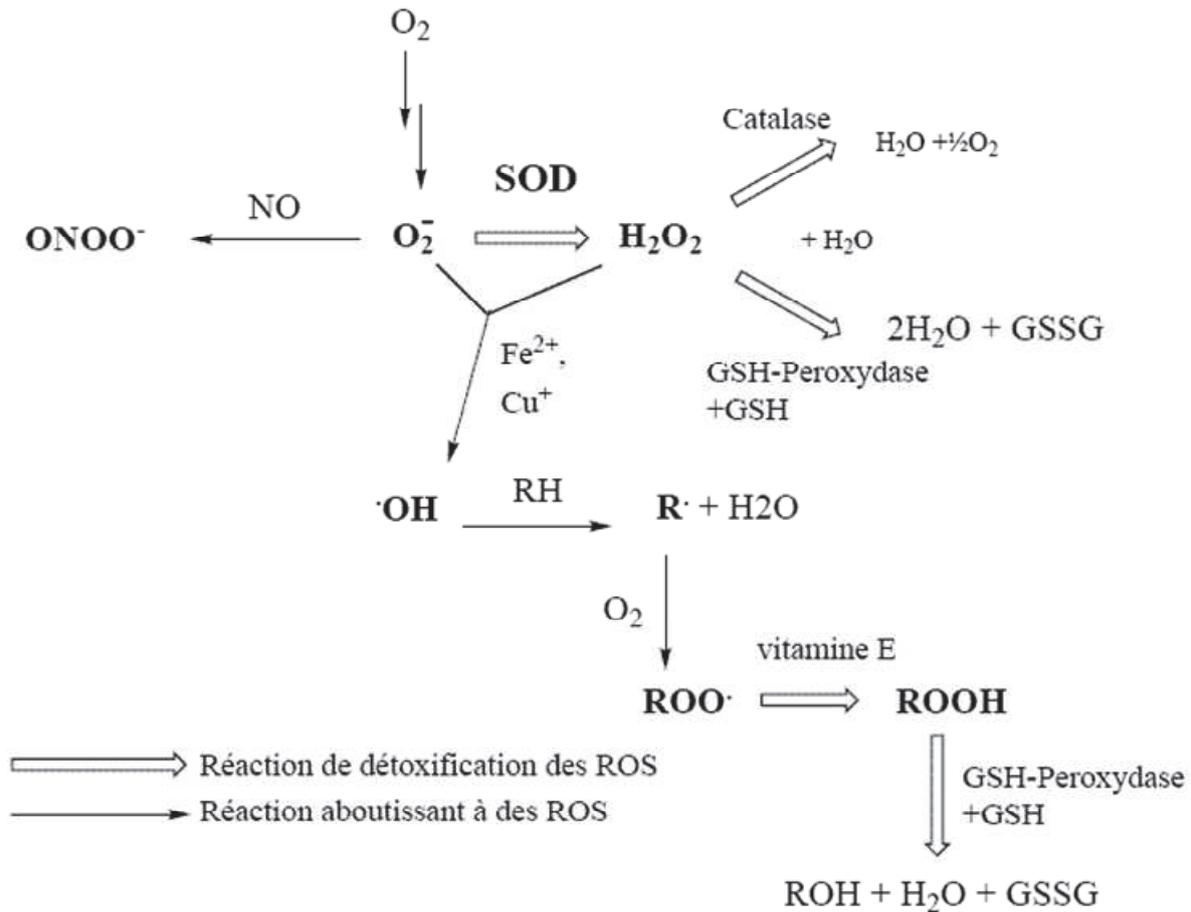


Figure 6 : Réactions de production et détoxification des espèces réactives de l'oxygène.

Les mécanismes de détoxification des ROS sont réalisés par des enzymes synthétisées par l'organisme : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx ou GSH-Peroxydase) (Figure 6). La SOD accélère la conversion de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, alors que la catalase et la glutathion peroxydase convertissent le peroxyde d'hydrogène en eau. Il existe aussi des anti-oxydants non enzymatiques, dont l'apport provient en partie de l'alimentation : il en existe un grand nombre mais l'ascorbate (vitamines C), les tocophérols (vitamines E), les flavonoïdes, les caroténoïdes (pro-vitamines A), la bilirubine et l'acide urique sont les principaux (Hulbert et al., 2007 ; Monaghan et al., 2009).

Lorsque le taux de pro-oxydant excède les mécanismes anti-oxydants, des dégâts oxydatifs sont générés.

2.1.3 Marqueurs du stress oxydatif :

Les ROS causent des dégâts oxydatifs au niveau des macromolécules biologiques clés, plus particulièrement les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

L'ADN mitochondrial est le plus sujet aux attaques radicalaires de part sa proximité avec les sites de production des ROS et aussi par la faible disponibilité des mécanismes de réparation (Balaban et al., 2005 ; Falnes et al., 2007). Les acides nucléiques, mitochondriaux et nucléaires sont principalement modifiés par des réactions d'oxydation au niveau des bases, ou des lésions sur les groupements méthyles, entraînant des conséquences phénotypiques majeures lorsque les modifications concernent les zones de transcription (Falnes et al., 2007). Par ailleurs, la réduction accélérée de la longueur des télomères a pour conséquence de stimuler les processus de sénescence cellulaire (Sahin et al., 2011).

Les ROS peuvent aussi induire des modifications des protéines. Les dégâts oxydatifs, en fonction des acides aminés oxydés, peuvent avoir des conséquences sur la structure tridimensionnelle de la protéine ou bien sur un site actif, aboutissant à une perte de fonction (Dröge, 2002). Les modifications trop importantes des protéines peuvent ainsi entraîner la molécule dans une voie de dégradation protéolytique (Dröge, 2002).

Les lipides, notamment les phospholipides constitutifs des membranes, sont également la cible d'attaques radicalaires, ce qui engendre des conséquences majeures sur la fluidité, la perméabilité, et à l'extrême, l'intégrité de la membrane. En effet, les lipides membranaires ont un rôle primordial dans la structure et la fonction des membranes cellulaires et mitochondriales. Une attaque radicalaire entraîne une diminution du taux d'insaturation des lipides et sont à l'origine de réactions en chaîne aboutissant à des dégâts oxydatifs sur les autres lipides, mais aussi sur les protéines et les acides nucléiques (Hulbert et al., 2007). Les dégâts lipidiques sont donc considérés comme un indice majeur du statut oxydatif car il affecte la maintenance cellulaire et favorise la propagation des dommages oxydatifs au sein de la cellule (Hulbert et al., 2007).

2.1.4 Réparation des dégâts oxydatifs :

Le dernier niveau de régulation permettant de faire face à l'accumulation des dégâts oxydatifs est constitué de mécanismes de réparation et d'élimination des macromolécules oxydées. A chaque type de dégâts correspond un mécanisme de réparation (Hulbert et al., 2007). Les bases oxydées de l'ADN peuvent être retirées par des mécanismes d'excision. Par ailleurs, lors de la réplication, l'ADN polymérase semble également corriger les erreurs induites par les attaques radicalaires. Les dégâts générés sur les protéines peuvent être aussi réparés ou supprimés. Par exemple, la méthionine endommagée est réparée par une enzyme, la méthionine sulfoxyde réductase. Les mécanismes de réparation étant limités, les protéines oxydées sont principalement éliminées par protéolyse. Enfin, les lipides oxydés peuvent être réparés, remplacés ou éliminés. La phospholipase A est une enzyme impliquée dans les mécanismes de suppression des acides gras endommagés, alors que l'acyltransférase, la glutathion peroxydase, la glutathion transférase et la transacylase sont des enzymes permettant la réparation des phospholipides oxydés.

Malgré tous ces niveaux de régulations, la cellule est capable de quantifier le stress et d'activer le programme de mort cellulaire (l'apoptose) quand les limites de tolérance aux dégâts sont dépassées.

→ Les défenses de type enzymatique, que ce soit les mécanismes de détoxification des ROS ou les mécanismes de réparation, nécessitent des ressources énergétiques et matérielles qui auraient éventuellement pu être allouées à d'autres fonctions (Kirkwook et Austad, 2000 ; Monaghan et al., 2008 ; Hall et al., 2010 ; Horak et Cohen, 2010, Isaksson et al., 2011).

2.2 *Mise en évidence de l'implication du stress oxydatif dans les compromis évolutifs*

Afin d'illustrer comment le stress oxydatif peut infléchir les trajectoires d'histoire de vie, nous prendrons comme exemple le cas de variations de croissance. Ainsi, en se basant sur le trait « croissance », de nombreuses études montrent que l'investissement dans ce trait

engendre un compromis entre ce trait et les autres traits d'histoire de vie, par l'intermédiaire du stress oxydatif.

2.2.1 Stress oxydatif, facteur de mortalité intrinsèque en milieu naturel

L'augmentation du métabolisme nécessaire pour alimenter une croissance rapide est supposée affecter certains paramètres physiologiques au niveau de l'organisme (Rollo et al., 1996 ; Farrell et al., 1997 ; Morgan et al., 2000). Une corrélation positive entre le taux de croissance et le niveau de stress oxydatif a été mesurée, suggérant qu'un des coûts possibles de la croissance pourrait donc être le stress oxydatif (Rollo, 2002, Brown-Brog et Rakoczy, 2003). Chez des animaux de laboratoire, cette corrélation positive a amené à concevoir le stress oxydatif comme l'une des causes proximales du lien croissance – longévité (Jennings et al., 1999 ; Miller et al., 2000 ; Rollo, 2002). La notion de longévité chez les animaux en milieu naturel est beaucoup plus complexe à appréhender puisqu'elle dépend à la fois de facteurs intrinsèques (la sénescence de l'organisme) et extrinsèques (la mortalité causée par des prédateurs, un manque de disponibilité en ressources, ou encore due à des stress environnementaux abiotiques). Il est pratiquement impossible de discriminer ces deux causes de mortalité dans la nature puisque les mortalités intrinsèques et extrinsèques semblent interconnectées dans de nombreux cas. Par exemple, le risque de prédation (facteur de mortalité extrinsèque) pourrait être accentué par la sénescence (facteur intrinsèque) (Coulson et Fairweather, 2001). Dans ce contexte, on peut estimer que le coût d'un investissement dans un trait peut s'étudier par la contrainte oxydative et non par la longévité.

2.2.2 Stress oxydatif, coût d'une croissance élevée ?

Les variations dans les taux de croissance nécessitent une attention particulière de par le lien direct avec l'âge et la taille à maturité. Ces deux traits d'histoire de vie sont impliqués dans le succès reproducteur des organismes puisqu'ils vont conditionner le nombre d'évènement de reproduction et le nombre et la taille des descendants (Stearns, 1992 ; Nylin et Gotthard, 1998). Il existe de nombreux avantages à atteindre une taille corporelle élevée, à la fois en terme de succès reproducteur, mais aussi de survie. Par exemple, au sein d'une

population, un individu de grande taille est meilleur compétiteur et meilleur prédateur relativement à un organisme de petite taille, plus vulnérable (Arendt, 1997). Une croissance rapide, voire « maximale » semblerait être avantageuse, accélérant ainsi le passage au-delà des stades vulnérables et pour atteindre rapidement la reproduction. Pourtant, des études montrent que les animaux ne grandissent généralement pas à un taux maximal, même lorsque l'environnement est favorable et que la nourriture est non-limitante (revue dans Arendt, 1997 ; Dmitriew, 2011). Pour de nombreux taxons, les individus contraints de réduire leur croissance au cours d'une restriction alimentaire sont capables par la suite d'accélérer leur taux de croissance lorsque les conditions nutritives sont améliorées, et ainsi de compenser leur retard initial (Arendt, 1997, Mangel et Stamps, 2001). Le taux de croissance « compensatoire » est alors supérieur au taux de croissance des organismes témoins, mettant en évidence une croissance optimale plutôt que maximale en situation non stressante. Toutefois, bien que cette croissance « compensatoire » apporte des bénéfices immédiats à l'organisme (tel qu'une réduction du risque d'être tué par un prédateur ou une augmentation du succès reproducteur), elle est aussi associée à de nombreux coûts qui n'apparaissent souvent pas immédiatement mais plus tard dans la vie de l'organisme, affectant sa survie (Arendt, 1997 ; Mangel et Stamps, 2001 ; Metcalfe et Monaghan, 2001, 2003 ; Olsson et Shine, 2002, Munch et Conover, 2003 ; Yearsley et al., 2004, Dmitriew, 2011).

Depuis une dizaine d'années, la plupart des études suggèrent qu'une croissance rapide peut avoir des effets négatifs sur les performances ultérieures et la durée de vie de l'organisme via l'influence du stress oxydatif (Metcalfe et Monaghan, 2003 ; Alonso-Alvarez et al. 2007, De Block et Stoks, 2008 ; Costantini et al. 2010 ; Kim et al. 2011). Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à la croissance et leurs coûts, des expériences de croissance accélérée suite à une période de privation/restriction alimentaire ont été employées (synthèse dans Dmitriew, 2011). Notamment, De Block et Stoks (2008) ont montré que suite à un jeûne transitoire, la croissance compensatoire chez les larves de libellule *Lestes viridis* était associée à une augmentation de l'activité des enzymes anti-oxydantes qui perdure jusqu'à l'émergence de l'animal. Plus spécifiquement, cette étude suggère que l'augmentation du métabolisme de l'animal, associée à la croissance compensatoire, pourrait causer une production de ROS accrue. Cette (possible) production excessive de pro-oxydants serait à l'origine de l'induction des enzymes anti-oxydantes. Selon De Block et Stoks (2008), cela pourrait expliquer les coûts associés à une croissance compensatoire. Un métabolisme élevé, permettant une croissance élevée, induirait alors une plus grande production de ROS et une diminution de la durée de

vie selon la théorie radicalaire du vieillissement. Cependant, cette étude ne présente ni la production de ROS, ni de marqueurs de dégâts oxydatifs. Une étude similaire, portée sur les diamants mandarins *Taeniopygia guttata*, a mis en évidence une augmentation de la susceptibilité aux attaques radicalaires pendant la période de croissance compensatoire des oisillons (Alonso-Alvarez et al., 2007). Ces résultats indiquent que les coûts d'une croissance compensatoire est éventuellement à l'origine d'une augmentation des dégâts oxydatifs via une diminution des défenses anti-oxydantes et / ou une augmentation des attaques radicalaires.

Par ailleurs, des études descriptives, sur animaux sauvages, ont montré chez le goéland leucophée *Larus michahellis*, tout comme chez le mouton *Ovis aries*, une corrélation négative entre le taux de croissance des juvéniles et le niveau de défenses anti-oxydantes (goéland), ou encore positive entre le niveau de dégâts oxydatifs et la croissance (mouton) (respectivement Kim et al., 2011 ; Nussey et al, 2009).

2.3 Limites des études sur le stress oxydatif comme contrainte des histoires de vie

2.3.1 Biais d'estimation du stress oxydatif

D'après les études précédemment exposées, le coût d'une croissance plus élevée en termes de dégâts oxydatifs peut résulter de deux mécanismes non exclusifs (Horak et Cohen, 2010). Premièrement, la croissance compensatoire peut affecter (diminuer) le système de défenses anti-oxydantes, rendant l'organisme plus sensible aux attaques radicalaires. Deuxièmement, la croissance compensatoire peut en soi induire une augmentation des pro-oxydants. A partir des approches actuelles qui ne mesurent qu'un seul de ces aspects de la balance oxydative, il n'est pas possible d'appréhender l'implication des coûts et / ou des contraintes du stress oxydatif dans les variations d'histoire de vie. De plus, le second problème dans l'évaluation du stress oxydatif intervenant dans les compromis est de distinguer si les tendances observées sont dues à un processus physiologique (contrôlé) ou pathologique (incontrôlé) (Horak et Cohen, 2010). En effet, en fonction des situations, les tendances de la variable mesurée peuvent être opposées, comme le suggère les mesures des capacités anti-oxydantes dans les études sur la croissance compensatoire de De Block et Stoks (2008) *versus* Alonso-Alvarez et al., (2007). Comme il a été écrit précédemment, chaque

paramètre de la balance oxydative (pro-oxydant, anti-oxydant et dégât oxydatif) est constituée de plusieurs variables (molécules, enzymes...). Ainsi, estimer judicieusement le statut oxydatif de l'animal nécessiterait de mesurer à la fois la contrainte radicalaire, l'investissement dans les défenses et enfin, les dégâts accumulés dans l'organisme. Même s'il est techniquement difficile de mesurer la totalité des variables pour chaque paramètre de la balance oxydative, il apparaît essentiel d'estimer les tendances des pro- *versus* des anti-oxydants, ainsi que des dégâts oxydatifs pour considérer le stress subit.

Pour aller plus loin dans l'analyse de ces résultats, l'emploi d'une double nomenclature de la discipline que sont « l'écologie du stress oxydatif » ou bien « l'écologie des antioxydants » ne révélerait-il pas l'ambiguïté persistante quant à la base mécanistique du compromis évolutif ? La notion de stress recouvre l'ensemble des perturbations biologiques provoquées par une agression quelconque sur un organisme. Selon Finkel et Holbrook (2000), la balance entre la production de ROS et les défenses anti-oxydantes déterminerait le degré de stress oxydatif. La conséquence de ce stress serait les dégâts induits sur les macromolécules (Finkel et Holbrook, 2000). Selon Hulbert (2007), la production de ROS générerait un stress au niveau de macromolécules lorsque le système de détoxification n'est pas suffisant, et les dégâts oxydatifs seraient la source du stress cellulaire. Au final, la notion de stress oxydatif semble impliquer tous les paramètres de la balance oxydative de manière non exclusive. On pourrait alors définir le stress oxydatif comme une perturbation d'un ou plusieurs paramètres de la balance oxydative qui affecterait l'organisme. Cela pourrait se traduire par une augmentation de la production de ROS et / ou par une diminution des défenses anti-oxydantes induisant une augmentation des dégâts oxydatifs, et qui serait alors le coût générant les compromis évolutifs. Cependant la question demeure de savoir si les perturbations de la balance oxydative sont bien la cause proximale des compromis évolutifs. En effet, on pourrait parfaitement émettre l'hypothèse qu'une restriction de la ressource contraint l'organisme à allouer moins d'énergie dans les défenses anti-oxydantes.

D'un autre côté, la détermination des activités anti-oxydantes est utilisée de manière ambivalente : certaines études interprètent une capacité anti-oxydante élevée comme une réponse à un fort stress anti-oxydant. Dans ce cas, les modèles étudiés pourraient ne pas présenter d'augmentation des dégâts oxydatifs (malheureusement non mesurés par De Bloks et Stock, 2008), et le compromis pourrait mettre en cause l'allocation d'énergie dans les défenses au détriment des autres traits. D'autres études suggèrent qu'une diminution des

défenses anti-oxydantes serait la conséquence directe d'une allocation d'énergie en faveur de la croissance et au détriment des défenses. Dans ce cas, à niveau d'agression équivalent, des pro-oxydants, l'animal possédant une croissance accélérée serait plus susceptible d'accumuler des dommages oxydatifs (Alonzo-Alvarez, 2007, Kim et al., 2011). Par ailleurs, mesurer directement le taux de dégâts oxydatifs est certes la seule manière d'estimer « l'état physiologique » de l'animal (Nussey et al., 2009), mais ne permet pas cependant de fournir des informations quant aux mécanismes oxydatifs sous jacents impliqués dans la mise en place des compromis évolutifs. Les recherches sur les mécanismes physiologiques à l'origine des compromis d'histoire de vie devraient prendre en compte l'ensemble des paramètres de la balance oxydative, c'est-à-dire les pro-oxydants, les anti-oxydants et les dégâts oxydatifs.

2.3.2 Besoins énergétiques, le mécanisme implicite

Comment expliquer le paradoxe selon lequel la sélection naturelle, mécanisme maximisant la valeur sélective des individus, n'a pas éliminé ou contre-sélectionné les pro-oxydants, qui pourtant limitent la valeur sélective des individus ? Les radicaux libres sont (pour la quasi-totalité) produits par la mitochondrie lors du processus de synthèse d'énergie, qui aboutit à l'adénosine triphosphate (ATP). Cette génération de ROS est certes nuisible pour l'organisme, mais reste pourtant un processus physiologique normal et inévitable. L'ensemble de la littérature s'accorde à dire qu'accroître la valeur d'un trait (grandir plus vite, se reproduire plus de fois...) nécessite d'augmenter l'apport en énergie pour alimenter ce trait, et que cette augmentation du métabolisme serait à l'origine de l'élévation de la production de ROS.

Plusieurs points noirs entachent ce raisonnement, dont certains ont déjà été soulevés au cours de ces dernières années :

- Une augmentation du métabolisme ne signifie pas systématiquement une augmentation de la production de ROS. En effet, il est reconnu que le métabolisme, mesurable par la consommation d'oxygène, n'est pas nécessairement proportionnel à la production mitochondriale de ROS (Brand, 2000 ; Barja, 2007). De nombreux mécanismes mitochondriaux impliqués dans ce rapport doivent absolument être pris en compte pour estimer la relation métabolisme – production de ROS.

- Une augmentation du métabolisme ne signifie pas systématiquement une augmentation des apports énergétiques. En effet, la production d'énergie (ATP) n'est pas une fonction constante de la consommation d'oxygène, mais variable, dont la plasticité dépend des capacités de la mitochondrie à convertir l'énergie chimique des nutriments en énergie utilisable par la cellule, l'ATP (Brand, 2005). Au regard de la figure 3 (paragraphe 1.3.2), l'estimation des apports énergétiques par l'ingéré n'autorise l'évaluation de la quantité d'énergie cellulaire disponible, « l'énergie nette », que si l'on tient compte de l'efficacité de conversion énergétique mitochondriale. Ce facteur d'efficacité conditionne la quantité d'ATP produit à partir de l'énergie ingérée.

- Bien que l'ATP et les ROS soient tous deux générés au niveau de la mitochondrie, leur taux de production est loin d'être une relation isométrique et implique des mécanismes de régulation sous influence de facteurs environnementaux, nutritionnels, hormonaux, génétiques, ... Il n'est donc pas possible d'extrapoler une relation ATP/ ROS sans avoir mesuré le fonctionnement mitochondrial.

Ainsi, il est nécessaire d'inclure de nouvelles perspectives écophysiologiques aux mécanismes proximaux à l'origine des stratégies d'histoire de vie. Pour cela, le fonctionnement mitochondrial dans son ensemble devrait être pris en compte, c'est-à-dire la production d'énergie nécessaire aux processus biologiques de l'organisme, mais aussi la sous-production inévitable des radicaux libres.

3 La mitochondrie, centrale énergétique cellulaire & source de stress oxydatif.

3.1 Généralités

La mitochondrie est un organe de quelques micromètres, présent dans la majorité des cellules eucaryotes (Figure 7).

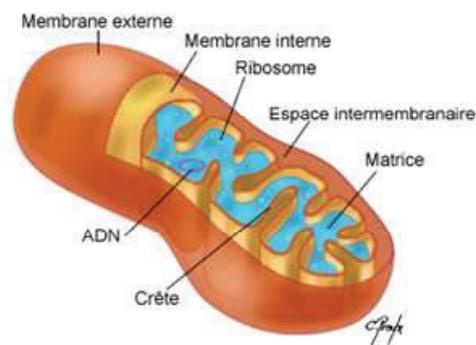


Figure 7 : Illustration d'une mitochondrie.

Plutôt qu'un organe isolé, les mitochondries *in vivo* sont organisées sous forme de réseaux dynamiques (Benard et Karbowski, 2009). La mitochondrie est enveloppée de deux membranes à bicouche phospholipidique, une membrane externe et une membrane interne, renfermant l'espace intermembranaire. Alors que la membrane externe est lisse, la membrane interne est repliée sur elle-même, formant ainsi des crêtes, et délimite une zone nommée la matrice mitochondriale.

Les mitochondries sont la principale source de production de l'ATP, une molécule qui libère de l'énergie au cours de l'hydrolyse de ses liaisons phosphates, alimentant ainsi les réactions endergoniques qui ont lieu dans les cellules (figure 8).

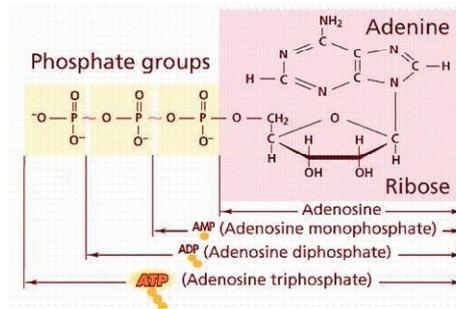


Figure 8 : La molécule d'ATP et ses dérivés, l'ADP et l'AMP

Il sera d'abord présenté les mécanismes de production d'ATP au niveau de la mitochondrie, puis il sera expliqué en quoi la production de ROS est indissociable de ces réactions. La majorité des études sur les mécanismes fondamentaux des mitochondries a été réalisée sur des modèles endothermes (essentiellement rats, souris et pigeons). Il est globalement admis que la bioénergétique mitochondriale est très conservée au cours de l'évolution et les mécanismes généraux sont similaires entre les différentes espèces animales.

3.2 Centrale énergétique cellulaire

3.2.1 Théorie chimio-osmotique

L'alimentation permet à l'organisme un apport en molécules énergétiques (Glucides, Lipides et Protides) mais elles ne sont pas directement utilisables par la cellule. Les nutriments sont dégradés et leurs catabolites sont les substrats du cycle de Krebs. A l'issue de ce cycle, de nombreux catabolites sont générés, certains à l'origine de plusieurs voies de biogénèses, mais aussi des molécules de NADH et de FADH₂. Ces équivalents réduits sont des molécules véhiculant des électrons extraits des nutriments et utilisés par la mitochondrie pour le processus de synthèse de l'ATP. La mitochondrie synthétise l'ATP grâce à un ensemble de complexes enzymatiques incrustés au niveau de sa membrane interne à partir de l'oxydation des équivalents réduits.

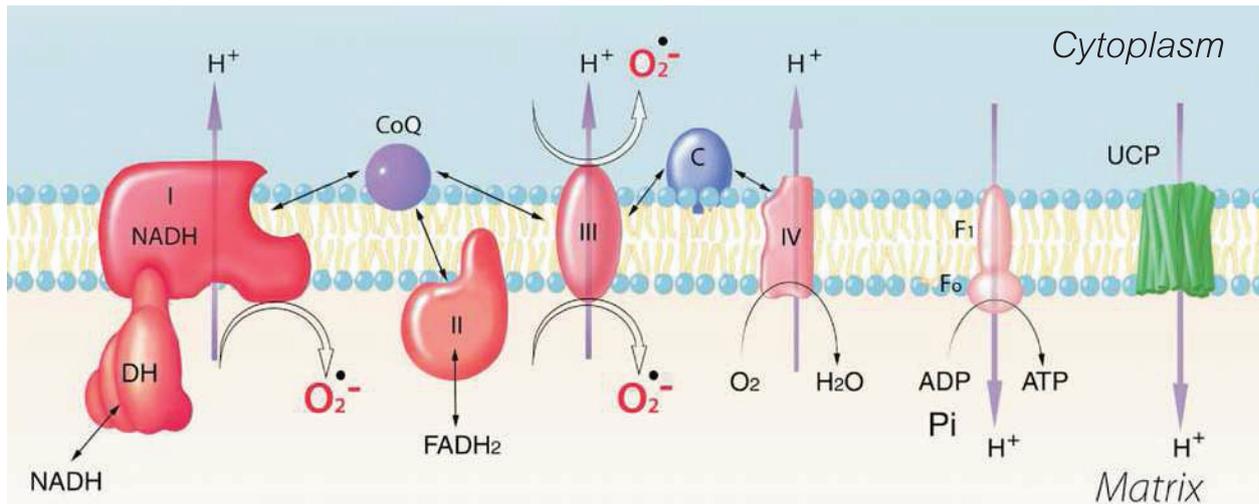


Figure 9 : Schéma des complexes de la chaîne respiratoire, de l'ATP synthétase et de la protéine découplante, UCP. Balaban et al., 2005

Les complexes enzymatiques I, II, III et IV forment la chaîne respiratoire, aussi appelée la chaîne de transport des électrons (figure 9). Les complexes I et II oxydent respectivement le NADH et le FADH₂, libérant des électrons qui sont transportés le long de la chaîne respiratoire jusqu'à l'oxygène, l'accepteur final. Les électrons sont relayés entre ces complexes par deux transporteurs mobiles, l'ubiquinone (des complexes I et II au complexe III) et le cytochrome c (du complexe III au complexe IV) jusqu'à l'oxygène pour former une molécule d'eau. Comme il sera expliqué par la suite, la production de ROS est liée à ce flux d'électrons. Au niveau des complexes I, III et IV, chaque transfert d'électrons cause l'expulsion de protons (H⁺) de la matrice vers l'espace intermembranaire. L'accumulation de protons dans l'espace intermembranaire forme un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane interne, que l'on nomme également force proton-motrice (Δp). Cette force proton-motrice est utilisée pour synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate, lorsque les protons retournent dans la matrice par le complexe V, l'ATP synthétase. L'ensemble des réactions qui permet à la force proton-motrice de coupler les réactions d'oxydation, au niveau de la chaîne respiratoire, avec les réactions de phosphorylation, au niveau de l'ATP synthétase, est appelée la phosphorylation oxydative.

L'ATP produit est principalement utilisé dans l'anabolisme (majoritairement dans la synthèse de protéines) et le maintien des gradients ioniques transmembranaires (Hulbert et Else, 2000), mais aussi par l'activité contractile des muscles, ou encore par les processus impliqués dans la division cellulaire. Ainsi, la réalisation de ces processus est dépendante de la disponibilité cellulaire en ATP, elle-même dépendante des capacités de la mitochondrie à

synthétiser de l'ATP. En effet, le niveau d'activité ainsi que l'efficacité de transformation de l'énergie par la mitochondrie sont deux paramètres impliqués dans les capacités de synthèse d'ATP. Le nombre de molécules d'ATP synthétisées par atome d'oxygène consommé au cours des oxydations phosphorylantes est un ratio qualifié de P/O. Les mesures *in vitro* montrent que le couplage entre l'ATP synthétisé et l'oxygène consommé est variable (Kadenbach, 2003 ; Brand, 2005 ; Hinkle, 2005). Le nombre de molécules d'ATP que peut produire la mitochondrie par molécule d'oxygène consommée pendant le processus de phosphorylation oxydative est donc une relation très importante dans la balance énergétique. La valeur du ratio P/O conditionne à la fois les besoins en oxygène et nutriments indispensables dans la réalisation des réactions biochimiques et constitue l'élément clé entre ces besoins en apport énergétique et la disponibilité énergétique.

3.2.2 Plasticité du rendement énergétique mitochondrial, le ratio P/O

Les complexes enzymatiques impliqués dans la transduction d'énergie des oxydations aux phosphorylations sont structurellement indépendants mais fonctionnellement connectés par le gradient de protons, générant une force électrochimique au niveau de la membrane interne mitochondriale. Ainsi, l'efficacité de conversion énergétique de la mitochondrie peut être affectée par différents mécanismes non exclusifs, que l'on peut regrouper en deux phénomènes bioénergétiques, au niveau de trois sites de la mitochondrie :

- Le premier phénomène, initialement suggéré par Nicholls (1974) est une fuite de protons de part et d'autre de la membrane interne liée à la conductance de cette membrane.

- Le second phénomène en cause dans la diminution du rendement énergétique mitochondrial est le changement de stœchiométrie H^+/e^- des pompes à protons, à savoir les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire et l'ATP synthétase.

Le principal mécanisme qui diminue l'efficacité mitochondriale est la fuite de proton liée aux membranes biologiques qui présentent toujours une certaine perméabilité aux protons (Brand et al, 1994 ; Porter et al., 1996 ; Rigoulet et al., 1998 ; Brand, 2005). Cette fuite est à l'origine d'un cycle futile qui consomme des substrats énergétiques et de l'oxygène pour assurer le transfert actif des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire dans le but de compenser les fuites de protons (retour passif) vers l'intérieur de la matrice mitochondriale

(Brand et al, 1994). La perméabilité de la membrane est à la fois une propriété intrinsèque de la membrane, dépendante de sa composition (longueur et degré d'insaturation des acides gras des phospholipides, Porter et al., 1996 ; Hulbert et al., 2002 ; concentration et activation des protéines découplantes, Cannon et Nedergaard, 2004), mais aussi de la valeur de la force proton-motrice (Nicholls, 1974). Au niveau tissulaire, ou au niveau de l'organisme entier, il a été estimé que la fuite de protons serait responsable de 25% de la consommation d'oxygène chez différentes espèces de mammifères (Porter et Brand, 1995 ; Rolfe et Brand, 1996). Cela signifie qu'au niveau de l'organisme, un quart de la ressource alimentaire ne rentre pas dans le budget énergétique à allouer entre les investissements, mais sert à maintenir le gradient de protons dans la mitochondrie. Les conséquences de la dissipation de la force proton-motrice sont une augmentation du taux respiratoire et une diminution de la synthèse d'ATP ; et il en découle alors une diminution du ratio P/O (Brand, 1990).

Un certain nombre de controverses a porté sur le fait que les pompes à protons pourraient présenter des stœchiométries variables. L'hypothèse d'un changement de stœchiométrie a émergé de l'observation que la fuite des protons à elle seule ne serait pas suffisante pour expliquer la relation entre le taux de respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP (Zoratti et al., 1986). D'autres études ont montré que l'effet du potentiel de membrane sur la stœchiométrie des pompes à protons variait en fonction de la pompe considérée (Pietrobon et al, 1981, 1983). En effet, le ratio H^+/e^- dans la chaîne respiratoire (donc le rapport H^+/O), et la stœchiométrie H^+/ATP au niveau de l'ATP synthétase, pourraient être réduits à fort potentiel de membrane (Pietrobon et al, 1981, 1983). Des mesures directes du ratio H^+/e^- ont permis de mettre en évidence que le cytochrome bc1 oxydoreductase (complexe III) possède une stœchiométrie constante quelque soit le potentiel, alors que la stœchiométrie du cytochrome c oxydase (complexe IV) est réduite à fort potentiel (Murphy et Brand, 1987, 1988). Par ailleurs, il a été observé chez des bactéries que le mécanisme de rotation de l'ATP synthétase peut ne pas toujours être parfaitement couplé au flux de protons, particulièrement quand les concentrations d'ADP sont faibles, conduisant à une production inférieure d'ATP (Feniouk et al., 2005). En revanche, l'existence de ce mécanisme est beaucoup moins certaine chez les animaux. Les connaissances actuelles suggèrent que la cytochrome c oxydase pourrait être particulièrement sujet à des changements de stœchiométrie H^+/e^- , cependant la présence d'un découplage H^+/ATP dans l'ATP synthétase reste encore à être démontré dans les mitochondries des animaux (Kadenbach, 2003 ; Brand, 2005 ; Hinkle, 2005).

Dans un processus aussi complexes que les phosphorylations oxydatives, l'approche quantitative qui semble la plus adaptée est la mesure du rendement énergétique, soit le nombre de molécules d'ATP synthétisées par atome d'oxygène consommé (ATP/O). Par cette approche, les différents mécanismes pouvant faire varier le rendement énergétique sont pris en compte (Kadenbach, 2003 ; Brand, 2005 ; Hinkle, 2005).

3.3 Source de radicaux libres

3.3.1 Mécanisme

La mitochondrie est une structure cruciale du fonctionnement cellulaire par sa capacité de convertir l'énergie des nutriments en forme d'ATP. Cependant, elle est aussi considérée comme une des principales sources de ROS dans la cellule par le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Les électrons sont issus de l'oxydation des équivalents réduits, permettant ainsi l'expulsion de proton de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, ce qui aboutit à la formation d'ATP. Dans la majorité des cas, les électrons sont transportés par la chaîne respiratoire jusqu'à la cytochrome c oxydase, où l'accepteur final des électrons, l'O₂, se combine à l'hydrogène pour former une molécule d'H₂O. Cependant, une partie des électrons peuvent spontanément réduire directement l'oxygène, ce qui est à l'origine de la production de l'anion superoxyde (O₂⁻). *In vitro*, une proportion d'1 à 2% des molécules d'oxygène consommées serait convertie en anion superoxyde (Boveris & Chance, 1973). Selon certains auteurs, le pourcentage d'O₂ consommé par la chaîne respiratoire qui est transformé en ROS pourrait même atteindre 4%. Mais ces estimations ont été réalisées à partir de mesures *in vitro*, sur des mitochondries isolées, en conditions non-physiologiques, avec des concentrations en oxygène et substrat saturantes. Il est plus vraisemblable que la production de ROS mitochondriale *in vivo* soit beaucoup plus faible (inférieure à 1% ; Hansford et al., 1997 ; Finkel et Hoolbrook, 2000, St Pierre et al., 2002).

La formation des radicaux libres se déroule au niveau de deux sites de la chaîne respiratoire mitochondriale : le complexe I et le complexe III (Boveris et al., 1972). De nombreux facteurs sembleraient jouer sur la production de ROS.

3.3.2 Régulation

Plusieurs études ont montré que la proportion d'électrons circulant dans la chaîne respiratoire donnant un radical libre n'est pas une constante, mais varie en fonction du tissu considéré et de nombreux paramètres physiologiques (Barja, et al., 1994 ; Herrero et Barja, 1997 ; Gredilla et al., 2001 ; Barja, 2004 ; 2007 ; Murphy, 2009). Cela suggère que la production de ROS et la consommation d'oxygène mitochondriale ne constituent pas une fonction linéaire, contrairement à ce qui est souvent suggéré. De nombreux paramètres sont susceptibles d'affecter la production de ROS et la plupart interagissent entre eux.

Le taux de production de ROS dépend du flux d'électron et de l'état de réduction des transporteurs d'électrons (Barja, 2007 ; Murphy, 2009) : plus les transporteurs d'électrons sont réduits, plus il y a génération de ROS. Ainsi, quand le flux d'électron est lent, les électrons s'accumulent au niveau de la chaîne respiratoire, ce qui augmente l'état de réduction de la chaîne respiratoire, et donc la probabilité que ces électrons rencontrent une molécule d'oxygène pour générer des ROS. Par ailleurs, la production de superoxyde est très sensible au potentiel transmembranaire (Korshunov et al., 1997). Miwa et Brand (2003) ont montré en ce sens qu'une diminution du potentiel de membrane d'environ 5% est associée à une diminution de la production de superoxyde de 70 %. Ainsi, tous les paramètres pouvant affecter la perméabilité de la membrane, et donc moduler le potentiel de membrane, impactent indirectement la production de ROS. Ces paramètres peuvent être dépendants de la structure même de la membrane, comme la composition lipidique de la membrane interne ou bien la présence de protéines découplantes (revue dans Hulbert et al., 2007).

Au-delà des capacités intrinsèques de la mitochondrie, son environnement physiologique peut également moduler de façon considérable les taux de production de ROS à court et long termes. Sur une échelle de temps relativement « instantanée », l'état de réduction de la chaîne respiratoire peut varier en fonction de la disponibilité en oxygène au niveau de la chaîne respiratoire, de la température ou de la fuite de protons (Abele et al., 2002 ; Heise et al., 2003 ; Keller et al., 2004 ; Philipp et al., 2005). Au long terme, la perméabilité de la membrane interne (via les protéines découplantes et la composition lipidique) est un

paramètre important qui influence le potentiel de membrane, et par conséquent la production de ROS (Barja, 2007).

3.4 Relation génération de ROS, synthèse d'ATP

Comme il vient d'être décrit, de nombreux facteurs affectent la production de ROS et d'ATP ; certains facteurs sont communs (disponibilité en oxygène ou potentiel de membrane), d'autres non, tout au moins, pas directement. En effet, dans un système aussi complexe et dynamique que la bioénergétique mitochondriale, la plupart des paramètres sont interconnectés avec de nombreuses boucles de rétroaction, et il n'est donc pas judicieux d'exposer une relation production d'ATP – génération de ROS comme un rapport linéaire et figé. Je vais donc exposer différentes approches de la fonction mitochondriale, en réintégrant³ les mécanismes dans la biologie de l'organisme, principalement au niveau de la balance énergétique. Cette partie est une synthèse réalisée à partir de Kadenbach, 2003 ; Brand, 2005 ; Hinkle, 2005 ; Barja, 2007.

3.4.1 État basal versus état phosphorylant

Le graphique issu de Kadenbach (2003) permet de visualiser l'interaction de nombreuses variables impliquées dans le fonctionnement mitochondrial (figure 10). Les états fonctionnels de la mitochondrie qui sont fréquemment mesurés sont des capacités oxydatives nommées état 3 (phosphorylant) et état 4 (non – phosphorylant).

³ La majorité des connaissances actuelles résultent de mesures d'activité mitochondriale *in vitro*, c'est-à-dire sur des mitochondries isolées, mises dans des conditions artificielles de mesures. Les extrapolations de la mitochondrie à l'organisme sont donc hypothétiques. Néanmoins, tout comme l'ambition d'appréhender des questions d'écologie évolutive sur des animaux sauvages, plutôt que de laboratoire, observer les mitochondries *in vivo* fait partie des challenges actuels de la recherche.

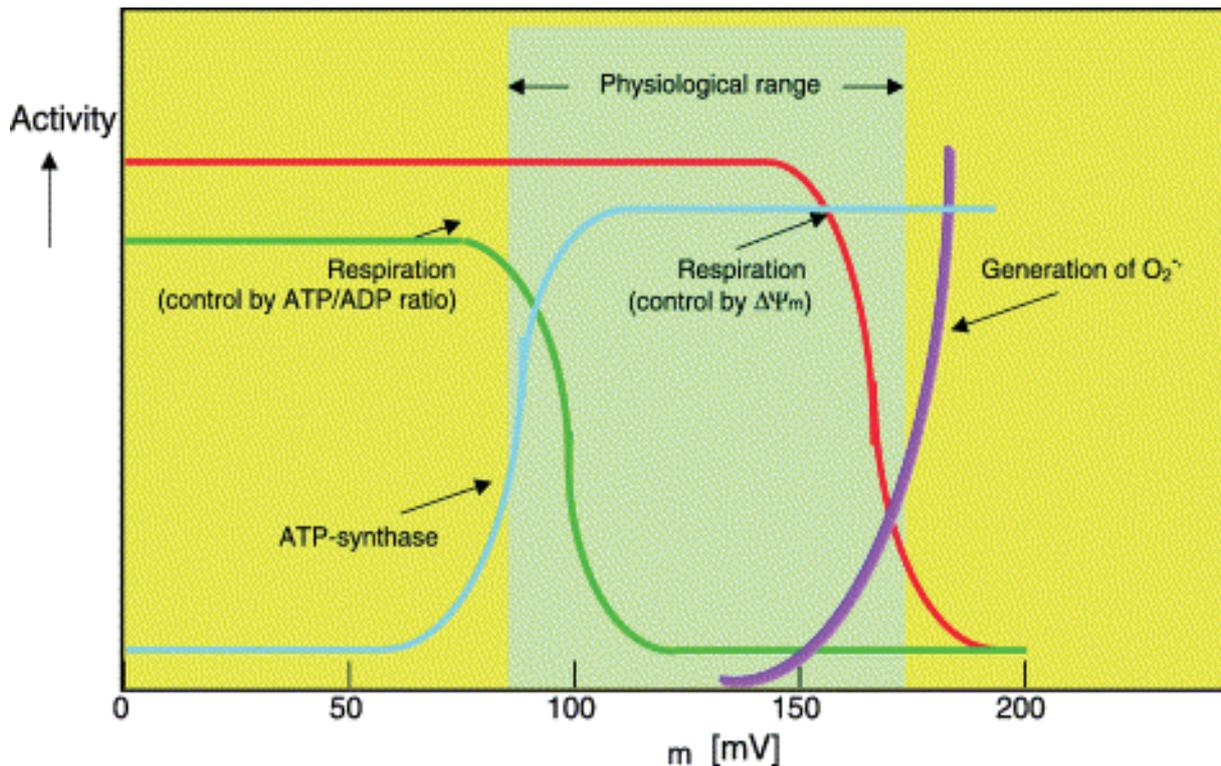


Figure 10 : Relation entre potentiel de membrane (mV), le taux respiratoire, la production de ROS et la synthèse d'ATP mitochondriale.

Ces deux états sont en réalité les extrémités d'un continuum entre :

- une respiration mitochondriale qui se déroule en l'absence de synthèse d'ATP (partie droite du graphique). La respiration mitochondriale permet de compenser la fuite de proton à travers la membrane interne. Expérimentalement, l'état 4 est atteint par une inactivation de l'ATP synthétase, soit parce qu'il n'y a plus d'ADP, son substrat, soit par l'action d'un inhibiteur spécifique de l'enzyme (l'oligomycine). Physiologiquement, les mitochondries approchent l'état 4 lorsque le ratio ATP/ADP est élevé. Cela signifie que la cellule n'a pas besoin d'énergie chimique. D'un point de vue mécanistique, le ratio ATP/ADP inhibe la respiration par une action directe sur la cytochrome c oxydase (enzyme terminale de la chaîne respiratoire, permettant la réaction entre les électrons et l'oxygène). Ce système de rétrocontrôle permet de réguler la respiration en fonction de la consommation d'ATP de la cellule. Dans ces conditions, le potentiel de membrane est maximal, ce qui freine les pompes à protons et ralentit les consommations d'oxygène et de substrats. Il y a alors une forte pression partielle en oxygène au niveau de la mitochondrie, ainsi qu'une accumulation des

électrons. Les transporteurs d'électrons sont donc dans un état fortement réduit. Toutes ces conditions expliquent qu'à l'état 4 la production de radicaux libres est très forte.

- une respiration mitochondriale associée à la synthèse d'ATP (État 3, partie gauche du graphique en figure 10). L'activité de l'ATP synthétase est favorisée par une diminution du ratio ATP/ADP, signifiant des besoins cellulaires en ATP. L'apport en ADP dans la mitochondrie va stimuler l'ATP synthétase, ce qui sera accompagné par une baisse du potentiel de membrane, qui, en conséquence, stimulera les pompes à protons et donc la respiration mitochondriale. Dans ce cas là, deux phénomènes interviennent dans la faible production de ROS. Premièrement, les transporteurs d'électrons se trouvent dans un état oxydé car le flux d'électron est canalisé vers le complexe IV pour réduire l'oxygène en eau et permettre le maintien d'un potentiel de membrane compatible avec la synthèse d'ATP et les besoins énergétiques de la cellule. Cette canalisation des électrons évite leur accumulation dans la chaîne respiratoire. Deuxièmement, la diminution locale de la pression partielle en oxygène induite par la consommation mitochondriale va permettre une diminution de la production radicalaire. Ce mécanisme apparaît comme étant une des principales raisons de la diminution de la production de ROS à l'état 3 (Ludwig et al, 2001). L'affinité de l'oxygène est beaucoup plus élevée pour la cytochrome c oxydase qu'avec les transporteurs d'électrons, qui sont générateurs de ROS, ce qui favorise la réaction d'oxydoréduction avec le cytochrome c oxydase. Cela explique aussi la corrélation positive entre la synthèse de ROS et la pression partielle en oxygène (Barja, 2007).

In vivo, la mitochondrie oscille entre ces deux états, répondant aux besoins de la cellule. A l'échelle d'une mitochondrie, la production d'ATP est effectivement corrélée positivement à la consommation en oxygène de la mitochondrie, et inversement proportionnel à la production de ROS. Toute chose étant égale par ailleurs, un organisme dont les mitochondries tendent à rester à l'état 3 produirait très peu de ROS et beaucoup d'énergie comparé à un organisme tendant à rester à l'état 4.

Cependant, les relations entre consommation d'oxygène, production de ROS et synthèse d'ATP ne s'arrêtent pas à une régulation de l'activité mitochondriale. D'autres paramètres peuvent affecter la structure même de la mitochondrie, ou encore au niveau de l'organisme entier.

3.4.2 Fuites de protons

Comme il a été expliqué précédemment, la plasticité du couplage énergétique (ratio P/O) de la mitochondries s'explique par les variations de la fuite de protons et de la stœchiométrie des pompes à protons. Les deux phénomènes sont dépendants du potentiel de membrane et donc confondus dans les processus qui viennent d'être exposés. Au delà de l'effet du potentiel de membrane, la plasticité des fuites⁴ de protons est une caractéristique primordiale dans les processus de conversion énergétique et de production de ROS. Une augmentation de la perméabilité membranaire engendre une chute de potentiel qui stimule les oxydations et diminue à la fois la production d'ATP et la génération de ROS.

En effet, il a été observé dans de nombreuses situations des différences de fuite de protons liées à des changements de la structure de la membrane interne mitochondriale. Par exemple, les oiseaux possèdent une perméabilité membranaire supérieure aux mammifères (revue dans Hulbert et al., 2007). Ainsi, la théorie radicalaire du vieillissement fournirait une base mécanistique à la théorie de Rubner : les organismes qui consommeraient plus d'oxygène comme les oiseaux, mais présentant une longévité supérieure, posséderaient des mitochondries avec une plus forte fuite de protons et donc une moindre production de ROS (Speakman, 2005). Cette dissociation entre les oxydations et les phosphorylations causées par la fuite de proton est appelé découplage mitochondriale. De nombreux cas ont montré la mise en place de ce découplage, par exemple face à une exposition au froid chez des endothermes (Cannon et Nedergaard, 2004). En condition physiopathologique, une hyperthyroïdie est à l'origine d'un découplage mitochondriale (Cannon et Nedergaard, 2004). *In vivo*, ce découplage n'est jamais total puisqu'il engendrerait la mort de l'organisme.

Au niveau de l'organisme, en condition physiologique, avoir des mitochondries légèrement découplées permet certes de produire moins de ROS, mais aussi moins d'ATP. Il apparait ici un compromis physiologique entre produire de l'énergie en proportion importante mais générer beaucoup de ROS. De ce principe a découlé des théories en physiologie, comme celle de Brand (2000) sur la longévité qui stipule qu' « être découplé permet de survivre plus longtemps ». D'un point de vue ultime, affecter la perméabilité membranaire peut avoir divers fonctions : chez les endothermes, lors d'exposition au froid, un découplage mitochondrial

⁴ A ma connaissance, il n'y a pas eu d'études de menées pour comparer les changements de stœchiométrie entre mitochondries.

permet l'activation du métabolisme et une production de chaleur (Cannon et Nedergaard, 2004). De plus, il a été montré qu'un découplage mitochondrial pourrait jouer un rôle protecteur face à un stress pro-oxydatif (Rey et al., 2010)

3.4.3 Fonctionnement mitochondrial, le compromis physiologique à la base du compromis évolutif ?

Une autre hypothèse, jusqu'alors abordée par l'étude des causes ultimes, suggère une relation entre « vivre vite (croissance rapide, fécondité élevée), mourir jeune » (Promislow et al., 1990). En terme de cause ultime, cette stratégie se mettrait en place dans les milieux à fort risque de mortalité extrinsèque, alors qu'un milieu stable favoriserait des stratégies du type « vivre lentement, mourir vieux » (Promislow et al., 1990 ; Stearns, 1992 ; Kraus et al., 2005).

→Au regard des informations développées dans ce chapitre au sujet des mécanismes mitochondriaux, la relation entre investissement dans la croissance / reproduction et mortalité pourrait s'expliquer par une forte production d'énergie permettant une croissance / reproduction rapides, au détriment d'une forte génération de ROS et donc d'une durée de vie plus courte. Dans ce cas, la cause proximale des compromis évolutifs entre les traits d'histoire de vie pourrait être le fonctionnement mitochondrial, où la base mécanistique serait la perméabilité membranaire.

4 Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse a pour but d'apporter des éléments de réponses, par une approche physiologique, à une problématique fondamentale de la biologie évolutive : la compréhension des mécanismes proximaux façonnant les compromis évolutifs entre les traits d'histoire de vie d'un organisme.

Au vu de la littérature, il apparaît que la plasticité mitochondriale est un facteur clé du stress oxydatif, via la production de ROS, mais aussi l'ATP, qui est la vraie forme d'énergie partagée entre les traits. Ces dix dernières années ont vu émerger une vague d'études interdisciplinaires, centrées sur les mécanismes sous-jacents aux compromis évolutifs, en plaçant le stress oxydatif au cœur du mécanisme. Jusqu'alors, le stress oxydatif était considéré comme le coût immédiat d'un investissement énergétique dans la croissance ou la reproduction. Le mécanisme physiologique à la base de ce coût reste cependant ambigu. Deux hypothèses émergent de la littérature. Premièrement, l'investissement dans un trait peut entraîner une réduction de l'allocation d'énergie dans le système de protection cellulaire contre les ROS, rendant les individus plus sensibles aux attaques radicalaires. Ainsi, le compromis entre le trait favorisé et la diminution de l'investissement dans les systèmes de protection cellulaire s'intègre dans un contexte de compromis dont le principe d'allocation des ressources et le stress oxydatif sont en cause. Deuxièmement, l'autre vision du compromis est de considérer le stress oxydatif comme un mécanisme candidat, impliqué dans les stratégies d'histoire de vie, indépendamment des phénomènes d'allocation de ressources. Ici, la fourniture en ressource dans un trait peut en soi causer le stress oxydatif via une augmentation de la génération de ROS au niveau de la mitochondrie. Cependant, il me paraît contestable de dissocier l'implication des phénomènes d'allocation de ressources dans cette hypothèse : un meilleur système de défenses anti-oxydantes pourrait être mis en place dans l'organisme pour faire face à une production de ROS accrue si la disponibilité en ressource n'était pas limitante. Par ailleurs, ces deux hypothèses sont non-exclusives : un organisme peut associer une production accrue de ROS et en même temps diminuer ses systèmes de défenses.

Quelque soit l'hypothèse considérée, le stress oxydatif et l'allocation de ressources semblent être en cause dans les trajectoires d'histoire de vie. Cependant, malgré une intégration de plus en plus commune de certains paramètres de la balance oxydative comme bases physiologiques, l'implication du métabolisme énergétique a considérablement été négligée dans la compréhension des compromis évolutifs. Pourtant, le rôle premier de la mitochondrie est la conversion d'énergie, avec une efficacité de conversion énergétique variable, pouvant impacter les paramètres énergétiques fondamentaux d'un organisme tels que le coût de la vie (le flux entrant) et les dépenses énergétiques (le flux sortant).

Deux questions générales ont orienté mes travaux :

→ L'évolution d'un trait est-elle contrainte par le stress oxydatif qu'il génère ou bien par l'apport énergétique qu'il nécessite ?

→ Les compromis évolutifs sont-ils générés intrinsèquement par la mitochondrie, en fonction de la quantité d'ATP et/ou de ROS générés, ou bien l'allocation d'énergie est-elle contrôlée à l'aval de la mitochondrie entre investissement dans un trait et investissement dans les défenses anti-oxydantes ?

Ainsi, le but de ces travaux de thèse est de donner de nouvelles perspectives écophysiologiques aux mécanismes proximaux à l'origine des stratégies d'histoire de vie. Pour cela, le fonctionnement mitochondrial dans son ensemble sera pris en compte, c'est-à-dire la production d'énergie nécessaire au processus biologique de l'organisme, mais aussi la sous-production inévitable des radicaux libres. Ces deux variables (production de ROS et d'ATP) seront reliées à la consommation d'oxygène de l'organisme afin d'illustrer leur stœchiométrie. Par ailleurs, afin de mieux comprendre l'implication du stress oxydatif, les études réalisées au cours de cette thèse prendront en compte l'ensemble des paramètres de la balance oxydative, c'est-à-dire les pro-oxydants, les anti-oxydants et les dégâts oxydatifs.

Ce travail a été mené par deux approches complémentaires, sur lesquelles reposera la structure du manuscrit de thèse :

-une approche descriptive a consisté à comparer le fonctionnement mitochondrial de populations naturelles présentant différents taux de croissance.

-une approche expérimentale : l'exposition chronique à un traitement affectant le fonctionnement mitochondrial a permis de mesurer l'impact du fonctionnement mitochondrial sur la croissance et le développement des organismes.

Matériel et Méthodes

1 Démarche scientifique générale

La démarche scientifique pour l'ensemble de ces études a été la plus intégrative possible, de la bioénergétique mitochondriale à l'organisme, en incluant l'ensemble des paramètres de la balance oxydative mais aussi les critères caractérisant le flux énergétique (figure 11).

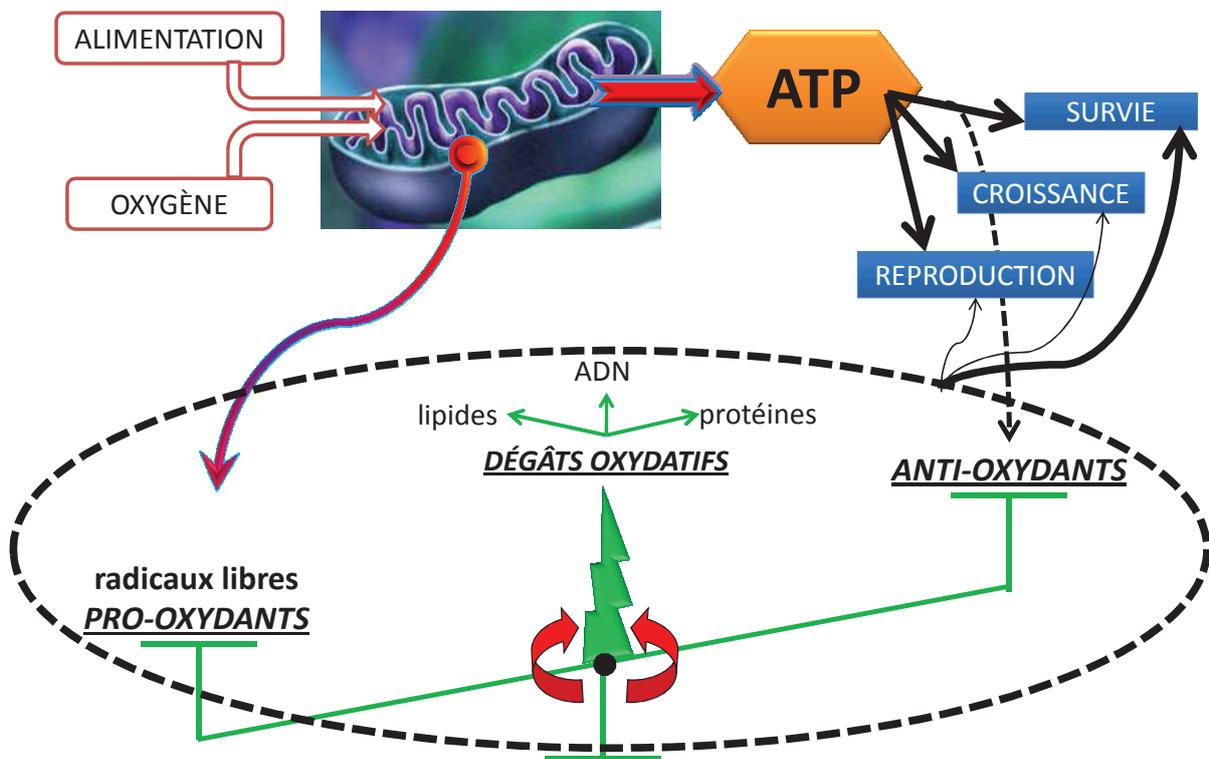


Figure 11 : Intégration de la mitochondrie dans les flux énergétiques et la balance oxydative.

La balance oxydative a été décrite par 1- la mesure de la production mitochondriale de molécules pro-oxydantes, les ROS, 2- la capacité du système de défenses anti-oxydantes à détoxifier les ROS et 3- des dosages des dégâts oxydatifs. Par ailleurs, le flux énergétique a été considéré par 1- les entrées, c'est-à-dire l'acquisition des ressources énergétiques

(nourriture et / ou oxygène) pour fournir les substrats à la mitochondrie, et 2- les dépenses énergétiques, estimées par l'allocation d'énergie dans les performances de l'organisme, en passant par 3- le système de conversion d'énergie au niveau de la mitochondrie, mesuré par le rapport ATP/O.

2 Modèle d'étude : les amphibiens anoures

Afin de répondre au volet descriptif de ma thèse, la connaissance de populations sauvages présentant des patrons de traits d'histoire de vie différents était obligatoire. Les amphibiens représentent ainsi un bon modèle d'étude de par la diversité naturelle de leurs stratégies d'histoire de vie. En effet, les amphibiens présentent une plasticité exceptionnelle entre les espèces et entre les populations au sein même d'une espèce (Smith et Skulason, 1996). Les espèces qui se reproduisent au niveau d'un point d'eau stable et permanent (lacs, rivières...) ont généralement un développement larvaire plus lent que les espèces qui vivent dans un habitat imprévisible et éphémère (Denver, 1997). Par ailleurs, au stade adulte, une grande diversité est observable. En France, les différentes espèces de grenouilles montrent une variabilité importante en termes de taille à l'âge adulte : -avec la plus grande espèce rencontrée, *Lithobates catesbeianus*, la grenouille taureau d'Amérique, d'une taille allant de 15 à 25 cm, -puis des espèces de taille intermédiaire, comme *Pelophylax ridibunda*, la grenouille rieuse, qui mesure environ 11 cm, -ou la grenouille rousse *Rana temporaria* dont la taille avoisine les 6 cm, -et aussi des grenouilles encore plus petites, la rainette arboricole, *Hyla arborea*, mesurant en général 3 à 4 cm (Duguet et Melki, 2003).

Ces dimensions ne sont bien sûr que des moyennes, puisque les amphibiens ont une croissance continue, mais surtout parce qu'au sein même d'une espèce, il existe des variabilités inter-populationnelles considérables. Lors d'études préliminaires, des différences de stratégies d'histoire de vie ont été mises en évidence entre des populations géographiquement voisines de grenouilles rousses de la Bresse Jurassienne (Joly, 1991 ; Augert et Joly, 1993). Les résultats montrent des variations inter-populationnelles de tailles corporelles des grenouilles adultes, associées à des différences de la structure d'âge. Ainsi, les populations constituées d'individus de grande taille sont caractérisées par un âge moyen inférieur relativement aux populations d'individus de petite taille. Une étude basée sur une

comparaison intraspécifique – inter-populationnelle, portera sur deux populations de grenouilles rousses connues pour présenter des traits d’histoire de vie variables (taille corporelle, âge à maturité, nombre d’évènements de reproduction, structure d’âge). Elle a pour but d’appréhender les différences dans les processus physiologiques qui résident entre les animaux à croissance variable.

2.1 *Stade adulte*

Le problème majeur posé lors de l’acquisition des données sur les traits biologiques des animaux sauvages était la nécessité d’un suivi à long terme des animaux, par des méthodes de marquage individuel. Cette technique est très lourde à mettre en place, surtout dans le cas de populations aux effectifs très élevés. Grâce à la technique de squelettochronologie, nous avons pu déterminer l’âge de tous nos animaux. La relation entre l’âge et la taille corporelle des individus à la capture permettra d’estimer le taux de croissance annuelle des animaux. L’analyse de l’âge des animaux rend possible l’estimation de la croissance, mais aussi l’âge à maturité sexuelle, deux paramètres déterminants des stratégies d’histoire de vie.

2.2 *Stade larvaire*

Une seconde phase de mon travail de thèse a porté sur l’impact du fonctionnement mitochondrial sur les traits d’histoire de vie larvaire. Des variations intraspécifiques des taux de développement et de croissance larvaires ont été observées dans beaucoup d’espèces animales. Par exemple, si des individus issus de populations vivant naturellement sous différentes conditions climatiques sont expérimentalement élevés dans un même environnement, les individus en provenance d’un milieu plus froid présentent un développement plus rapide (Conover et Shultz, 1995). Pourtant, puisque leur environnement d’origine est plus froid, dans la nature, leur développement peut prendre plus de temps que les larves issues de populations vivant en climats plus chauds (Conover et Shultz, 1995). Pour de nombreux organismes, tels que les amphibiens, la vitesse de développement et de croissance sont donc des traits connus pour avoir une forte association avec leur valeur sélective (Altwegg et Reyer, 2003 ; Ficetola et de Bernardi, 2006 ; Van Allen et al., 2010). Nous avons choisi d’attirer notamment l’attention sur le rôle de la fonction mitochondriale sur la durée de développement et la croissance larvaire. Pour cela, nous avons expérimentalement affecté la

fonction mitochondriale par une exposition chronique à un découplant durant la phase larvaire sur un modèle de têtards de grenouilles rousses *Rana temporaria*.

3 Paramètre taille et âge des adultes

Toutes les grenouilles capturées sont sexées, seules les femelles sont gardées, puis pesées et mesurées (longueur museau-urostyle). Sur chaque femelle, le deuxième doigt de la patte avant droite a été prélevé et conservé dans l'alcool pour la détermination de l'âge selon la méthode de squelettochronologie (Smirina, 1972 ; Castanet et al., 1977). Cette mesure repose sur le principe qu'en milieu naturel, la croissance osseuse des grenouilles est cyclique, ce qui forme des couches osseuses séparées par des lignes d'arrêt de croissance (LAC) en réponse à la dépression métabolique pendant la période hivernale. Ainsi, ces lignes représentent une année de croissance, et leur nombre donne une estimation précise de l'âge des grenouilles en années. Le but de la squelettochronologie est donc de révéler et compter les LAC. La taille des animaux ramenée à l'âge permet de mettre en évidence que la taille élevée des grenouilles est bien due à un taux de croissance supérieure, et non pas à une durée de croissance plus importante que les grenouilles de petite taille. De plus, la détermination de l'âge nous permet d'inclure l'interaction de l'âge avec les autres variables dans l'analyse statistique. Pour l'ensemble de mes travaux de thèse, les études de squelettochronologie ont été entièrement réalisées par Odile Grolet (technicienne de l'équipe).

Le protocole de squelettochronologie se déroule en plusieurs étapes : après avoir été coupé, l'os est préparé par une étape de dissection puis une étape de décalcification. Ensuite, on réalise des coupes transversales de l'os, qui sont colorées afin d'être lues.

La dissection se fait sous loupe binoculaire, dans une boîte de pétri contenant de l'éthanol. A l'aide de deux pinces fines, la peau est pincée à hauteur de la première articulation du doigt, puis la peau, les muscles et les ligaments sont délicatement ôtés afin de dégager la phalange à couper.

Pour la décalcification, un rinçage à l'eau de 30 min est effectué avant l'immersion dans une solution d'acide nitrique à 1%. Cette concentration est variable en fonction de l'espèce et de la taille de l'os. Par exemple, l'immersion des os de grenouilles vertes et grenouilles taureaux se déroule respectivement dans 3% et 5% d'acide nitrique. De même, la

durée de décalcification dépendra de la grosseur de l'os et variera de 5 min à plusieurs dizaines de minutes jusqu'à l'obtention d'une souplesse suffisante au toucher. Les os sont ensuite rincés dans un bain d'eau (l'eau du robinet suffit), pendant environ 12h, si possible sur agitateur orbital. Les doigts peuvent ensuite être coupés ou conservés dans l'alcool pour réaliser les coupes ultérieurement.

Les coupes transversales sont effectuées au niveau d'une phalange, les meilleures coupes se situant dans la partie centrale, la diaphyse, puisqu'à ce niveau la lumière de l'os est la plus petite et donc la surface de l'os la plus grande, laissant apparaître plus nettement les lignes d'arrêt de croissance (LAC) de l'os qu'aux niveaux des épiphyses. Les coupes se font à l'aide d'un microtome à congélation (Microm HM330) selon une épaisseur de coupe de 16 à 20 μm sous un angle de 9° , à une température de -40°C . Les coupes sont récupérées sur le fil du rasoir du microtome à l'aide d'un pinceau puis déposées dans une lame creuse contenant de l'eau distillée. La qualité des coupes est contrôlée au fur et à mesure sous loupe binoculaire.

Toujours sous loupe binoculaire, quelques gouttes de colorant (Hématoxyline d'Erlich) sont ajoutées aux coupes. Le colorant est laissé environ 2 min puis nettoyé progressivement par de l'eau (du robinet) jusqu'à ce que la coupe soit totalement limpide. A l'aide d'une minutie, une douzaine de coupes sont déposées dans une goutte de baume aqueux (aquamount Gurr BdH) entre lame et lamelle. Afin d'évacuer les bulles d'air et fixer le montage, un poids est posé sur l'ensemble lame / lamelle pendant environ une nuit avant de réaliser la lecture.

L'observation des lames se fait au microscope photonique. Le nombre de LAC est compté comme le nombre de lignes épaisses et plus chromophiles sur la coupe (figure 12). En fonction des espèces, la première ligne est fine et peu visible et peut disparaître avec l'augmentation de la croissance endostéale lors du vieillissement de l'individu. Dans notre étude la croissance endostéale ne semble pas limiter la lecture de la coupe, les premières lignes étaient toujours bien visibles et continues.

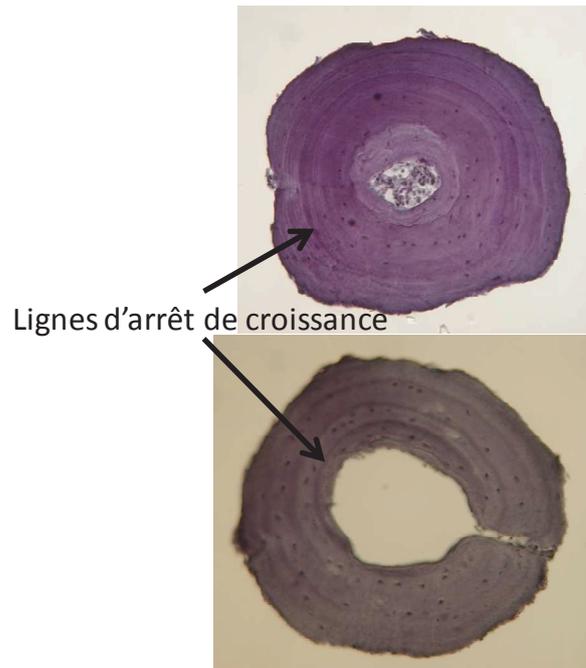


Figure 12 : Photographies de coupes obtenues par la méthode de squelettochronologie.

Noter qu'il subsiste une part d'interprétation dans la lecture des âges, l'important étant de garder toujours la même logique. L'interprétation est difficile car il peut y avoir des dédoublements s'il y a reprise de croissance lors du réchauffement d'un hiver doux. Deux lectures par deux personnes différentes sont recommandées.

4 Croissance et Développement des têtards

Après l'éclosion, les têtards se développent en puisant dans les réserves de l'œuf. Cette phase est associée à une respiration branchiale et un mode de vie fixe. Puis la larve devient mobile, acquiert la capacité de s'alimenter de manière autonome, alors que les branchies sont devenues invisibles car recouvertes d'un opercule. Les têtards ne sont manipulés et mesurés qu'à partir de ce stade, des manipulations plus précoces affecteraient leur survie.

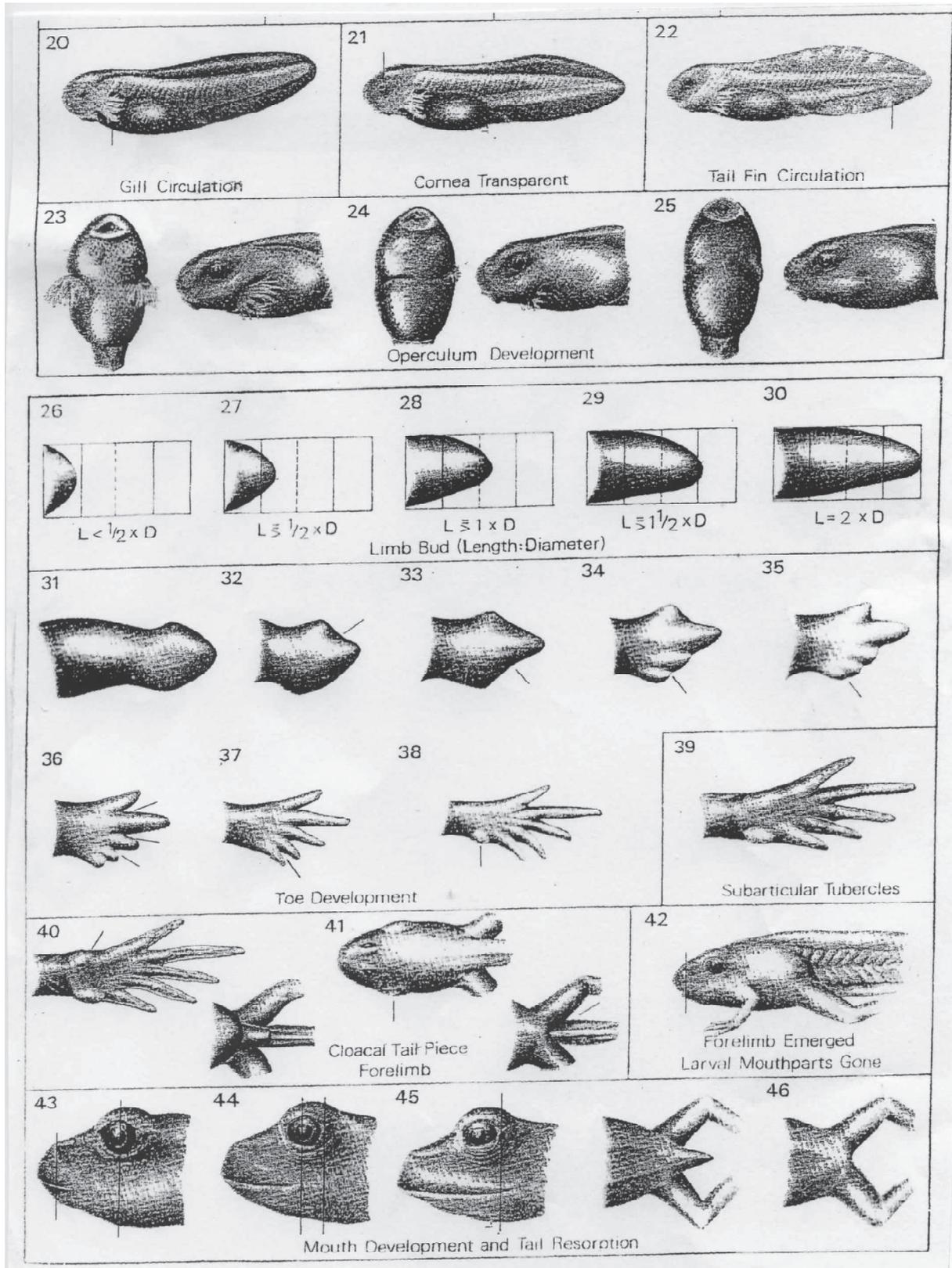


Figure 13 : Table de Gosner (1960) permettant la détermination les différents stades de développement des têtards.

Les animaux sont pesés et leur développement est estimé par des critères morphologiques en se basant sur des stades de développement définis dans une table par Gosner en 1960 (Figure 13). Cette table détaille 46 étapes, ou stades, qui révèlent les transformations morphologiques par lesquelles passent les têtards avant de se métamorphoser en une grenouille. La durée des stades n'est pas homogène.

Le stade 25 est donc associé au début des mesures, lorsque les branchies ont disparu et que l'animal nage. Le suivi des stades se fait à la loupe binoculaire, en positionnant l'animal latéralement. Le développement des animaux n'est pas toujours parfaitement symétrique, il est donc nécessaire d'observer toujours le même côté du têtard au cours du suivi développemental. Les stades 26 à 30 sont caractérisés par l'apparition des bourgeons des membres postérieurs. Puis les stades 31 et 39 sont définis par la différenciation des doigts de la patte postérieure de l'animal. Après le stade 39, l'animal subit d'importants remaniements internes anatomiques et métaboliques assurant sa métamorphose. Le stade 40 est défini par l'apparition de tubercule au niveau des mains. Puis les membres intérieurs se développent (stade 41 à 42) et l'ouverture de la bouche s'agrandit jusqu'à un niveau postérieur aux yeux (stade 42 à 45). La régression complète de la queue caractérise une métamorphose complète (stade 46). La régression de la queue, associé à un arrêt de prise alimentaire, expliquent que les animaux perdent du poids entre les stades 39 et 46.

5 Isolement des mitochondries

5.1 Mitochondries hépatique de grenouilles

Les grenouilles sont mises à jeûner 48 à 72h avant d'être sacrifiées par décapitation. Le sang est récupéré pour les mesures de génotoxicité (expliquées au paragraphe 11.2 de la section Matériel et Méthodes) puis le foie est immédiatement prélevé et mis dans un tampon d'isolement (250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM tris-HCl, pH 7.4). A partir de cette étape, et jusqu'aux mesures de respirations mitochondriales, toutes les étapes s'effectuent à 4°C pour conserver au mieux les mitochondries. Après avoir été finement émincé aux ciseaux, le foie est homogénéisé dans le tampon d'isolement par potterisation (3 passages

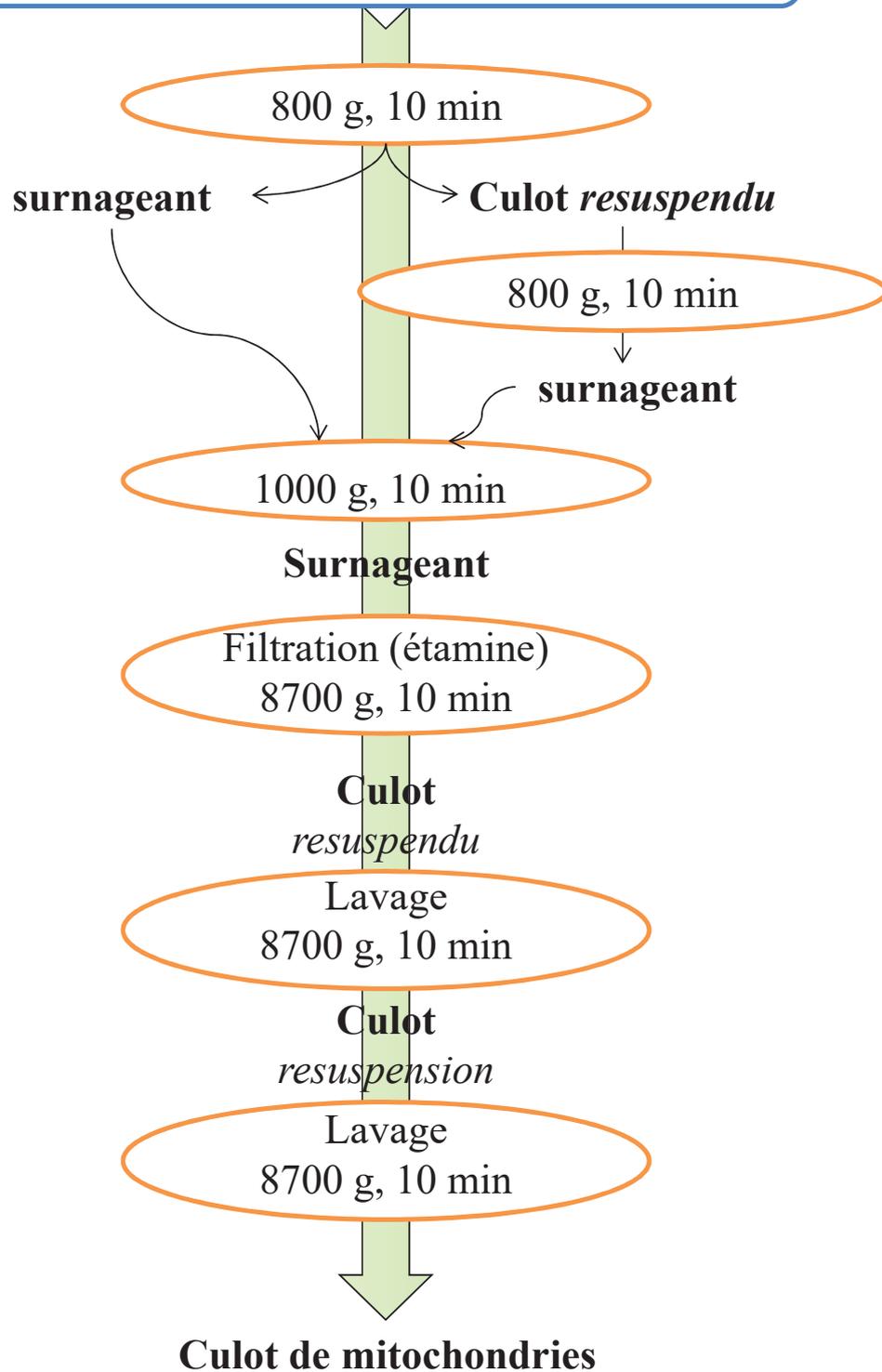
successifs). Cela permet de casser mécaniquement les membranes cellulaires en minimisant l'altération des mitochondries.

L'isolement des mitochondries est réalisé par centrifugation différentielle, comme expliqué dans la figure 14 a. Les premières centrifugations, à 800 et 1000 g permettent de sédimenter les grosses structures, comme les cellules entières et les noyaux. A noter que la 2^{ème} centrifugation à 800 g permet d'augmenter le rendement d'isolement mitochondrial de manière considérable, ce qui nous a permis de récupérer plus de matériel biologique. Après filtration du surnageant, les mitochondries sont sédimentées avec une centrifugation à 8700 g. Le culot de mitochondries est resuspendu avec le tampon d'isolement puis recentrifugé à 8700 g deux fois de suite afin de laver la suspension mitochondriale des structures plus petites. Finalement, les mitochondries sont resuspendues dans un petit volume de tampon d'isolement. La teneur en protéines mitochondriales est dosée par spectrophotométrie par la méthode Biuret, avec une gamme d'albumine sérique de bœuf (BSA) comme standard, lecture à 540 nm, comme expliqué dans ce tableau :

	Blanc (µL)	BSA (µL)	Mitochondries (µL)	Blanc mito (µL)
BSA à 10%	-	4	-	-
Suspension mitochondriale	-	-	4	4
Déoxycholate 3%	6	6	6	6
Tampon isolement	44 (qsp 50)	40 (qsp 50)	40 (qsp 50)	40 (qsp 50)
Biuret	150 (qsp 200)	150 (qsp 200)	150 (qsp 200)	-
Biuret sans cuivre	-	-	-	150 (qsp 200)

Les mitochondries de grenouilles présentant un pigment qui absorbe à cette longueur d'onde, un blanc était réalisé en présence des mitochondries avec un tampon sans cuivre pour tenir compte de la quantité des pigments.

Homogénéisation des tissus au potter , dans le tampon d'isolement



resuspendu dans un petit volume de milieu d'isolement

Figure 14 a : Protocole d'isolement de mitochondrie de foie de grenouille.

5.2 Mitochondries de têtards

Les têtards étant des organismes de petites tailles, les mitochondries ont été isolées à partir de l'organisme entier, comme il est fait chez la drosophile. Il n'existe pas de protocole d'extraction mitochondriale sur les têtards dans la littérature. L'ensemble des étapes de mises au point est expliqué dans la partie « Résultat ».

Le protocole d'isolement est en partie le même que celui des mitochondries hépatiques de grenouilles, avec un tampon à plus forte osmolarité (10 mM tris-HCl, 10 mM acide maléique, 600 mM mannitol, 2 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0,5 mM Na₂HPO₄, 2% de sérum d'albumine de veau sans acide gras, pH 7,4 à 4°C ; (Guérin et al., 1979) ainsi qu'une étape de purification des mitochondries par une centrifugation sur gradient de densité au percoll (figure 14 b). Comme pour l'isolement de mitochondries de foie, des centrifugations à faible vitesse sont réalisées, et les mitochondries sont sédimentées à 8700 g. Ce culot est resuspendu dans du tampon d'isolement contenant 15% de percoll. Cette suspension mitochondriale est déposée sur la couche supérieure d'un gradient de percoll préformé, constitué d'une couche de tampon d'isolement à 23% et d'une couche à 40% de percoll. Une centrifugation à 31000 g permet de séparer les mitochondries des autres particules en fonction de leur densité. La couche de mitochondries, qui se retrouve à la frontière des couches de percoll à 23% et 40%, est délicatement prélevée et diluée dans trois volumes de tampon d'isolement sans percoll. Ce mélange est centrifugé à 16000 g, puis le culot est récupéré et resuspendu pour un dernier lavage à 8700 g. Le culot est resuspendu dans un milieu d'isolement à forte osmolarité et dosé au Biuret.

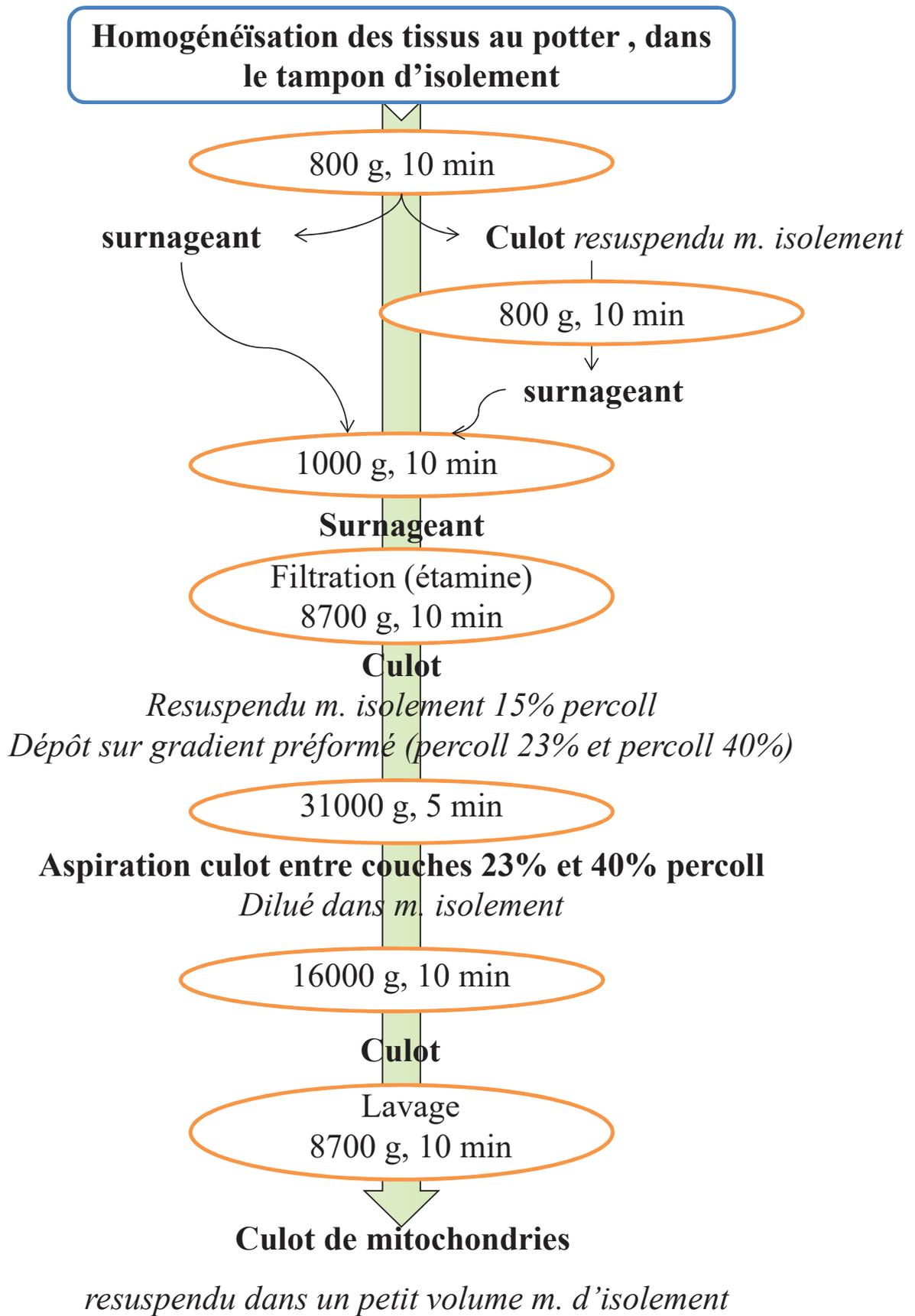


Figure 14 b : Protocole d'isolement de mitochondrie têtards

6 Respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale est mesurée par une électrode à oxygène de type Clark dans une chambre de mesure fermée hermétiquement par un bouchon, sous agitateur magnétique et thermostatée à 20°C (figure 15). L'ajout de substrats et d'inhibiteurs après fermeture de la cellule est rendu possible par un fin passage dans le bouchon, conçu pour y introduire l'aiguille d'une seringue Hamilton.

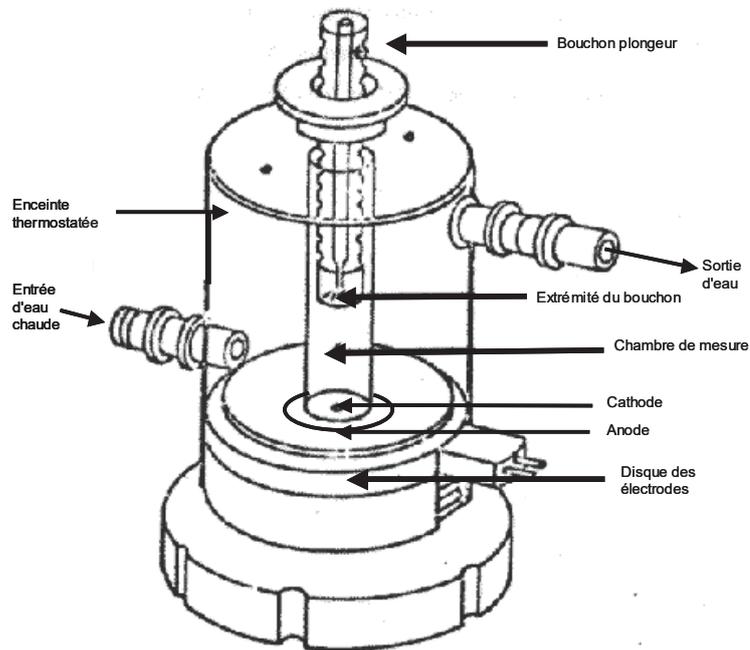


Figure 15 : Illustration de la cellule de mesure de respiration mitochondriale.

La respiration mitochondriale est mesurée par polarographie, méthode qui repose sur une réaction d'oxydo-réduction permettant la mesure en temps réel de la teneur en oxygène dans un milieu donné. La consommation d'oxygène est mesurée par une électrode de Clark (Rank Brothers Ltd, France), composée d'une cathode en platine et d'une anode en argent.

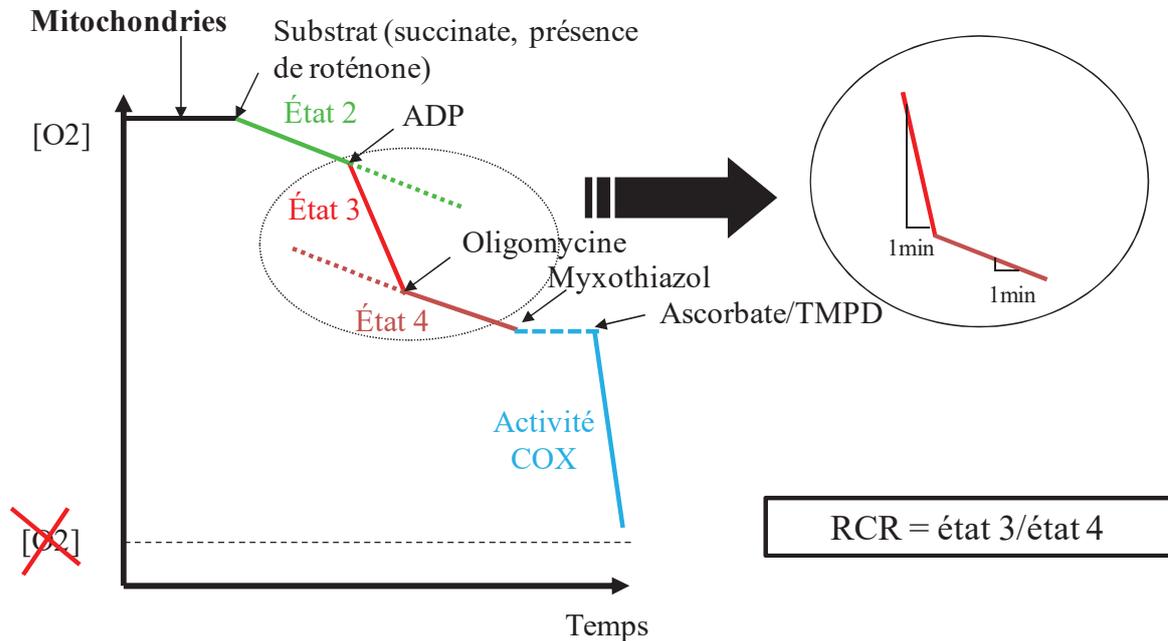
Le milieu de la chambre de mesure et la cathode sont séparés par une membrane de téflon perméable à l'oxygène. La cathode de platine et l'anode d'argent sont reliées par un « pont » KCl (une feuille à cigarette imbibée de solution KCl à 3M). Un potentiel électrique est appliqué aux électrodes. L'anode d'argent est ainsi oxydée en $\text{Ag} \rightarrow \text{Ag}^+ + \text{e}^-$. Ces électrons réagissent avec l'électrode de platine pour former l'ion Pt^{2-} . L'oxygène du milieu

respiratoire réagit avec la cathode selon la réduction $O_2 + 2H_2O + 2Pt^{2+} + 4e^- \rightarrow 4OH^- + 2Pt$. La respiration des mitochondries engendre une diminution de la concentration d'oxygène dans le milieu qui est caractérisé par une diminution linéaire de l'intensité du courant.

L'électrode est étalonnée avec du milieu respiratoire qui contient 521 nmoles d'oxygène/mL à 20°C. Le 0% d'oxygène était réalisé soit par respiration mitochondriale jusqu'à épuisement de l'oxygène du milieu, soit par ajout de disulfite de sodium (Na_2SO_3) dans la cuve qui réduit instantanément tout l'oxygène du milieu. Cependant, le Na_2SO_3 risque de polluer la cuve, un nettoyage méticuleux de la cuve est nécessaire avant les mesures. Par ailleurs, l'ajout de Na_2SO_3 en quantité trop importante génère une cristallisation instantanée dans la cellule de respiration qui peut altérer la membrane en téflon.

Les mitochondries de foie de grenouilles et de têtards sont incubées dans un milieu respiratoire approprié. Pour les mitochondries de foie de grenouille, le milieu est composé de 120 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM KH_2PO_4 , 2 mM $MgCl_2$, 0.3% BSA, 3 mM Hepes, pH 7,4 ; et pour les mitochondries de têtards, le milieu est constitué de 20 mM Tris-Base, 650 mM Mannitol, 0,5 mM EGTA, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM KH_2PO_4 , 1% BSA sans acide gras, pH 7,4. Les mesures ont été réalisées à des concentrations entre 3 et 5 mg de protéines mitochondriales/mL, cette concentration dépendant de la précision des appareils de mesures. Par ailleurs, les concentrations des substrats et inhibiteurs, ainsi que des enzymes pour l'ATP/O, dépendent aussi de la concentration en protéines mitochondriales. Adapter ce protocole à un nouveau modèle implique donc de faire des mises au point pour trouver la concentration optimale en mitochondrie et de substrats / inhibiteurs, de manière à obtenir un signal recouvrant les bruits de fond, mais aussi de façon à être en quantité saturante, mais non excessive, des molécules testées.

La respiration est initiée par l'addition de succinate (5 mM) (figure 16), un substrat entrant au niveau du complexe II de la chaîne respiratoire, en présence de roténone (5 μ M), un inhibiteur du complexe I. La présence de roténone évite un retour d'électrons du complexe II vers le complexe I, réduisant ainsi la formation de radicaux libres de l'oxygène, c'est-à-dire une consommation d' O_2 non couplée à la formation du gradient électrochimique de protons.



Roténone : Inhibiteur du complexe I

Succinate : substrat du complexe II

Oligomycine : inhibiteur de la synthèse d'ATP

Antimycine (ou *Myxothiazol*) : inhibiteur du complexe III

Ascorbate / TMPD : fournisseurs d'électrons à la COX.

Figure 16 : Illustration de la courbe obtenue pour tester les capacités oxydatives des mitochondries sous différentes conditions.

L'ajout d'ADP (1 mM), substrat de l'ATP synthétase, en quantité saturante induit une augmentation de la consommation d'O₂, caractérisant l'état 3 de la respiration ou état phosphorylant. Dans ces conditions, la chaîne respiratoire répond à la diminution du potentiel provoqué par le retour des protons à travers le complexe V pour la phosphorylation d'ADP en ATP.

L'état 4 respiratoire ou état non-phosphorylant caractérisé par une faible consommation d'O₂ était obtenu par ajout d'oligomycine (2.5 µg/mL) en quantité saturante, un inhibiteur spécifique de l'ATP synthétase. Cet état respiratoire est un indice de la

perméabilité membranaire car la consommation d'oxygène, en absence de synthèse d'ATP ne sert qu'à compenser les fuites de protons qui retournent dans la matrice mitochondriale à travers la membrane interne. A noter que les intensités respiratoires à l'état 2 et à l'état 4 (Figure 16 ci-dessus) sont sensiblement similaires, à l'exception de la présence d'un inhibiteur de l'ATP synthétase qui assure l'arrêt de la pompe à proton du complexe V, alors qu'une possible présence d'ADP résiduel peut intervenir à l'état 2.

L'ajout d'ascorbate (concentration saturante, 4 mM) et de TMPD (concentration saturante, 0,5 mM), délivrant directement des électrons au cytochrome c, permettent de mesurer de façon isolée l'activité de la cytochrome-c oxydase. La mesure de la consommation d'oxygène associée à l'activité de la cytochrome-c oxydase était réalisée en présence de myxothiazol (concentration saturante, 3 μ M), un inhibiteur du complexe III, afin d'éviter un flux inverse d'électrons, du cytochrome c vers le complexe III.

Le rapport de contrôle respiratoire (RCR) est le rapport entre l'état 3 phosphorylant, induit par la présence d'ADP dans le milieu de respiration et l'état 4 non phosphorylant, obtenu en inhibant l'ATP synthétase par ajout d'oligomycine. Ce rapport est classiquement utilisé pour estimer le niveau de couplage mitochondrial à partir des activités respiratoires, ce qui peut refléter la qualité de la préparation mitochondriale. Dans la littérature, il existe des valeurs « consignes » de ce RCR qui dépendent des substrats énergétiques et des tissus (Brand, 2000). Cependant comme ces valeurs ont été essentiellement définies chez des modèles endothermes ; elles ne s'appliquent pas strictement à nos modèles amphibiens.

7 Mesure du rapport ATP/O

La mesure du rendement de la phosphorylation oxydative (le rapport ATP/O) peut être réalisée par différents protocoles (Hinkle, 2005). Cependant, la technique utilisée ici permet d'exclure de nombreux biais car elle met en relation une mesure de la consommation d'oxygène et de la synthèse d'ATP réalisées sur les mêmes mitochondries, dans les mêmes conditions.

Le principe de cette méthode repose sur un système de régénération de l'ATP en ADP, permettant de doser l'ATP tout en maintenant les concentrations en ADP constantes dans la

cellule de mesure (Salin et al., 2010 – Annexe A ; adapté de Rigoulet et al., 1998 ; Nogueira et al., 2001 ; Clerc et al., 2007). Ce système de régénération de l'ADP est réalisé grâce au glucose et à l'hexokinase et fait intervenir 2 réactions enzymatiques (Figure 17). La première est la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate (G6P), réaction catalysée par l'hexokinase exogène. L'ATP nécessaire à cette réaction est produit par la mitochondrie, qui le synthétise dans la matrice mitochondriale puis le transporte vers l'extérieur à l'aide d'un transporteur spécifique, l'Adénine Nucléotide Translocase (ANT). Lors du dosage spectrophotométrique, une deuxième réaction est induite par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, qui transforme le G6P en gluconolactone-6-phosphate. *In vitro*, cette réaction peut utiliser comme cofacteur le NAD^+ et produire ainsi du NADH. Le NADH est dosé à 340 nm. Comme toutes ces réactions sont équimolaires, le dosage du NADH permet de calculer la production d'ATP mitochondriale.

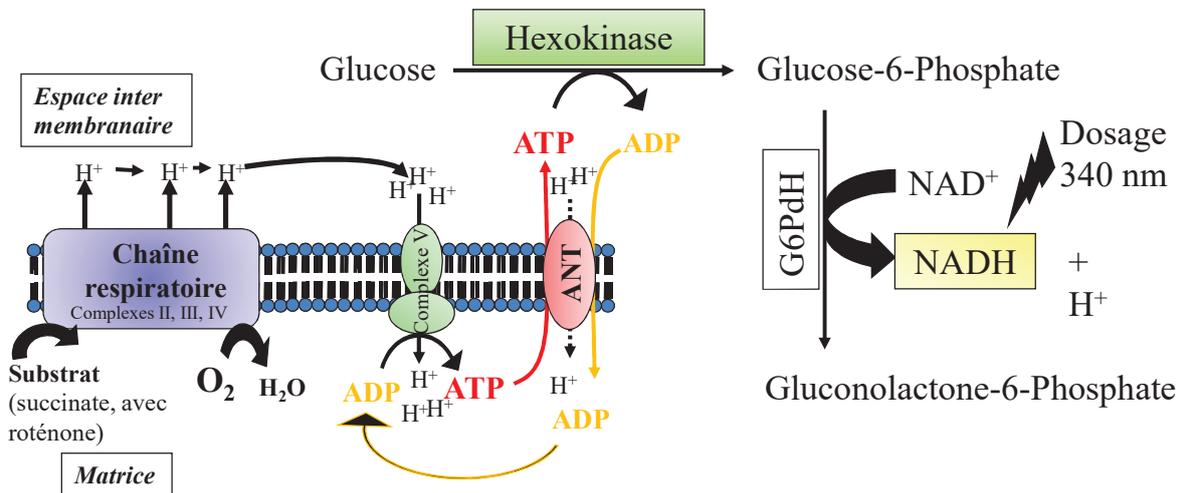


Figure 17 : principe de la mesure du rapport ATP/O. ANT : Adénine Nucléotide Translocase ; ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate ; G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase ; NAD^+/NADH : Nicotamide adénine dinucléotide

La solution de mitochondries est placée dans les mêmes conditions (tampon et température) que pour les mesures de capacités oxydatives expliquées précédemment, supplémentée avec de la roténone (5 μM), du succinate (5 mM), ainsi que du glucose (20 mM) et de l'hexokinase (1,5 U/mL) pour le système de régénération de l'ADP. L'état phosphorylant est induit par l'addition de différentes concentrations d'ADP, entre 5 et 200 μM . Après s'être assuré de la stabilité de l'état phosphorylant pendant quelques minutes, 4

aliquots de suspension mitochondriale (60 μ L) étaient prélevés de la cuve de mesure toutes les 2 minutes. Ce temps de 2 minutes entre les aliquots était suffisant pour permettre la mesure d'un delta d'ATP produit entre 2 points. Ces prélèvements sont immédiatement ajoutés à une solution d'acide perchlorique (40 μ L ; 10% HClO₄, 25 mM EDTA) afin de stopper toutes les réactions enzymatiques. Après centrifugation des protéines dénaturées (15000 g, 5 min), le surnageant est neutralisé à l'aide d'une solution de KOH (0,2 M KOH et 0,3 M MOPS). Une nouvelle centrifugation est réalisée (15000 g 5 min) et le G6P contenu dans le surnageant est dosé à 340 nm en présence d'un tampon de dosage (50 mM triethanolamine-HCl, 7,5 mM MgCl₂ and 3,75 mM EDTA, pH 7,4, température ambiante), supplémenté avec du NAD (0,5 mM) et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (0,5 U) (Lang and Michal, 1974). Les mesures sont réalisées avant et 1h après l'ajout de glucose-6-phosphate déshydrogénase. La mise en relation du taux d'ATP synthétisé par unité de temps et par quantité de protéines mitochondriales avec la consommation d'O₂ par unité de temps et par quantité de protéines mitochondriales permet de visualiser le rapport ATP/O. De manière à s'assurer que l'ATP était d'origine mitochondriale la synthèse d'ATP a été déterminée en présence d'oligomycine (5 μ g.ml⁻¹).

8 Mesure d'activité ATPasique

L'activité de l'ATP synthétase sur des mitochondries isolées est basée sur la mesure de l'activité ATPasique de l'enzyme, c'est-à-dire sa capacité à hydrolyser l'ATP plutôt qu'à le synthétiser lorsque l'enzyme est placée dans certaines conditions expérimentales.

Pour faire fonctionner l'ATP synthétase en sens « inverse », il est nécessaire de dissocier la protéine IF1 (facteur inhibiteur) du complexe V. *In vivo*, le détachement de cette protéine est provoqué par l'effondrement du potentiel transmembranaire (favorisé par la congélation et la décongélation des mitochondries et la présence d'alaméthicine dans le milieu d'incubation) et un pH alcalin (Vernard et al. 2003). A noter que l'étape de congélation / décongélation des mitochondries n'étant peut être pas suffisante pour casser toutes les membranes mitochondriales, l'ajout d'alaméthicine permet la génération de pores artificiels au niveau de la membrane interne, permettant le passage d'IF1 à l'extérieure de la mitochondrie.

Les mitochondries décongelées ont été incubées à 0,5 mg/mL dans un tampon contenant 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, et 2,5 mM MgCl₂, pH 8, dans une cuve à spectrophotomètre thermostatée à 20°C et sous agitateur magnétique. Pour éviter que le complexe I ne consomme le NADH, 10 µM de roténone sont ajoutés. Le système de régénération de l'ATP (2 mM phosphoenol-pyruvate, 20 U/mL pyruvate kinase, et 50 unités/mL lactate déshydrogénase) est ajouté. De manière à éliminer le NADH résiduel, quelques minutes d'incubations sont effectuées avant d'ajouter 0,4 mM NADH. De la même manière, quelques minutes de stabilisations sont réalisées, pour permettre de consommer l'ATP résiduel. La mesure de la réaction d'hydrolyse est démarrée par l'ajout d'ATP, l'activité des ATP synthétases dont l'IF1 s'est décroché est suivie par spectrophotométrie à 340 nm. Le taux de disparition du NADH représente de façon équimolaire l'hydrolyse de l'ATP par l'ATP synthétase. Avant que le NADH ne soit complètement épuisé, de l'oligomycine peut être ajoutée de manière à vérifier que la mesure de l'hydrolyse d'ATP est complexe V dépendante. De la même manière, de l'ADP peut aussi être ajouté afin de confirmer que le système régénérant l'ATP n'était pas limitant dans notre mesure.

9 Pro-oxydant = Production mitochondriale de radicaux libres

La mesure de la production de ROS s'effectue indirectement par le dosage de H₂O₂ issu de la dismutation de l'anion superoxyde produit par la superoxyde dismutase mitochondriale. Le dosage se réalise sur mitochondries fraîchement isolées. En présence de peroxydase, l'amplex red réagit pour former la resorufin, qui, excitée à 563 nm, émet à 587 nm. La gamme étalon est réalisée à partir d'H₂O₂ (Figure 18 ; Zhou et al., 1997).

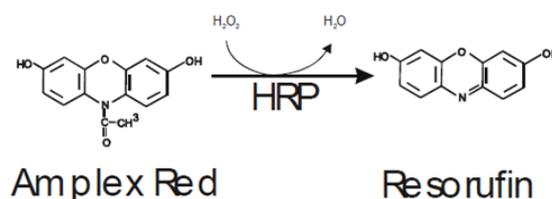


Figure 18 : Réaction enzymatique permettant le dosage du peroxyde d'hydrogène.

Les conditions de tampon et température (20°C) sont similaires aux mesures des capacités respiratoires et phosphorylantes. Les mitochondries, ou le H₂O₂ pour la gamme

étalon, sont mis en suspension dans un tampon respiratoire préalablement supplémenté d'amplex red 10 μ M, de peroxydase 1 U/mL, et de succinate 5 mM comme substrat de la chaîne respiratoire. Toutes ces molécules doivent être en condition saturante pour les mesures.

Des contrôles peuvent être réalisés par l'ajout de roténone en concentration saturante qui stoppe la production de ROS due au retour d'électron du complexe II vers le complexe I), ou d'ADP en concentration saturante (l'activation de l'ATP synthétase génère, via l'effondrement du potentiel de membrane, une diminution de la production de ROS). Les mesures se font sous agitation magnétique, après quelques dizaines de secondes de stabilisation, et peuvent être réalisées sur 10 à 15 minutes. La pente d'émission de fluorescence permet de calculer, en fonction de la gamme, une production d' H_2O_2 par unité de temps et par quantité de protéines mitochondriales.

10 Anti-oxydants

10.1 Enzymes anti-oxydantes

Afin d'estimer les capacités de protections radicalaires des grenouilles, deux enzymes anti-oxydantes du foie ont été étudiées : la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx). Les deux dosages ont été réalisés à partir d'un même échantillon, en utilisant des kits enzymatiques Cayman (SOD : n°706002 ; Gpx : n°703102). L'ensemble du protocole est détaillé dans la notice du kit enzymatique.

10.2 Capacités anti-oxydantes

Les capacités de défenses anti-oxydantes chez les têtards traités au dNP ont été estimée par la mesure de l'activité anti-oxydante totale, c'est-à-dire que le dosage comprend les enzymes (SOD, GPx, Catalase), ainsi que les macromolécules comme l'albumine et les petites molécules, telles que les vitamines, l'acide urique... Les dosages ont été réalisés à partir d'un kit enzymatique (Cayman, n°709001). La mesure repose sur la capacité anti-

oxydante de l'échantillon à inhiber la dégradation d'ABTS[®]. La quantité de métabolites générés a été mesurée à 405 nm. La capacité des antioxydants à prévenir la dégradation d'ABTS[®] est comparée à une gamme étalon de Trolox, un analogue des tocophérols. L'ensemble du protocole est détaillé dans la notice du kit enzymatique.

11 Dégâts oxydatifs

Deux types de dégâts ont été dosés : des dommages au niveau des lipides, et au niveau de l'ADN.

11.1 Peroxydation lipidique : acide malondialdéhyde

Les TBARS, ou Thiobarbituric Active Reactive Substance, est une méthode permettant le dosage des molécules réagissant avec les TBARS, dont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE), des marqueurs de la peroxydation lipidique. Le 1,1,3,3-tétraéthoxypropane (TEP), précurseur du MDA, est utilisé pour la gamme étalon. Le protocole utilisé est inspiré d'Ohkawa *et al.* 1979.

Principe :

-Les tissus (morceaux de foie de grenouilles) ou les organismes entiers (têtards) ont été congelés instantanément à l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'au dosage.

-Les tissus/animaux sont broyés dans un tampon (100 mM KH₂PO₄, 0,05% BSA, 10 mM EDTA, 0,13 mM butylated hydroxytoluène et 0,13 mM deferoxamine, pH 7,4 à 4°C) au broyeur à bille jusqu'à obtention d'une solution dénuée de particules en suspension (30 sec, 30 Hz pour quelques mg de foie, à 2 min, 30 Hz, en présence de 2 billes, pour un têtard). La dilution de base est de 1 mg de masse fraîche pour 400 µL de tampon ; à ajuster en fonction du tissu et du modèle animal.

-L'homogénat est centrifugé à 1100 g, 10 min, 4°C. Le surnageant est récupéré ; il peut être congelé à -80°C et dosé ultérieurement.

- La gamme étalon est réalisée à partir de TEP, dilué à l'eau distillée (peut être conservé à -20°C).
- Dans des tubes résistants à la chaleur et hermétiques (type tubes en pyrex, à bouchon vissé et joint en silicone), 8 volumes de surnageant, ou de gamme étalon, sont mis en présence de :
 - > 1,2 volume de sodium dodecylsulfate 8,1% (dilué dans une solution de citrate 100 mM pH 3,5 ; à faire le jour même),
 - > 9 volumes de solution acétique 20 % (acide acétique glacial dilué dans une solution de citrate 100 mM pH 3,5 ; se conserve à 4°C)
 - > 9 volumes d'acide thiobarbiturique 0,8% (dilué dans une solution de citrate 100 mM pH 3,5 ; à faire le jour même).
- Incuber environ 1h, à 95°C, sous agitation
- Après refroidissement, pour 27,2 volumes de milieu incubé, ajouter 24,2 volumes d'un mélange butanol / pyridine (volume / volume : 15 / 1). Manipuler sous hotte à cause de la pyridine
- Agiter très fortement (type vortex) pendant 10 minutes.
- Centrifuger 10 min à entre 1500 et 2880 g pour séparer les deux phases (liquides).
- Quand les phases ne sont plus troubles (quelques minutes), prélever la phase supérieure et la doser au spectromètre à 532 nm (fonctionne aussi à 540 nm).

11.2 Génotoxicité

Des mesures de dégâts au niveau de l'ADN ont été réalisées sur les globules rouges de grenouilles adultes. Cette technique, appelée *Comet assay*, permet de quantifier la proportion d'ADN fragmenté à l'échelle d'un noyau. Après sacrifice de l'animal, du sang a été prélevé par ponction cardiaque avec une seringue héparinée. Le sang a été dilué par 100 dans un tampon cryoprotecteur (250 mM sucrose, 40 mM citrate trisodium, 5% sulfoxyde diméthyl (DMSO), pH 7,6, ajusté avec 1 M d'acide citrique), congelé instantanément à l'azote liquide et stocké à -80°C jusqu'au dosage. Toutes les étapes qui ont suivi ont été réalisées dans le

cadre d'une collaboration avec Sylvie Bony et Alain Devaux, chercheurs de l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat, utilisant le protocole de Singh et al. (1988) avec quelques modifications. Après plusieurs étapes de traitement, les cellules étaient analysées sur lame, au microscope à fluorescence par un système d'analyse d'image de comet assay (figure 19).

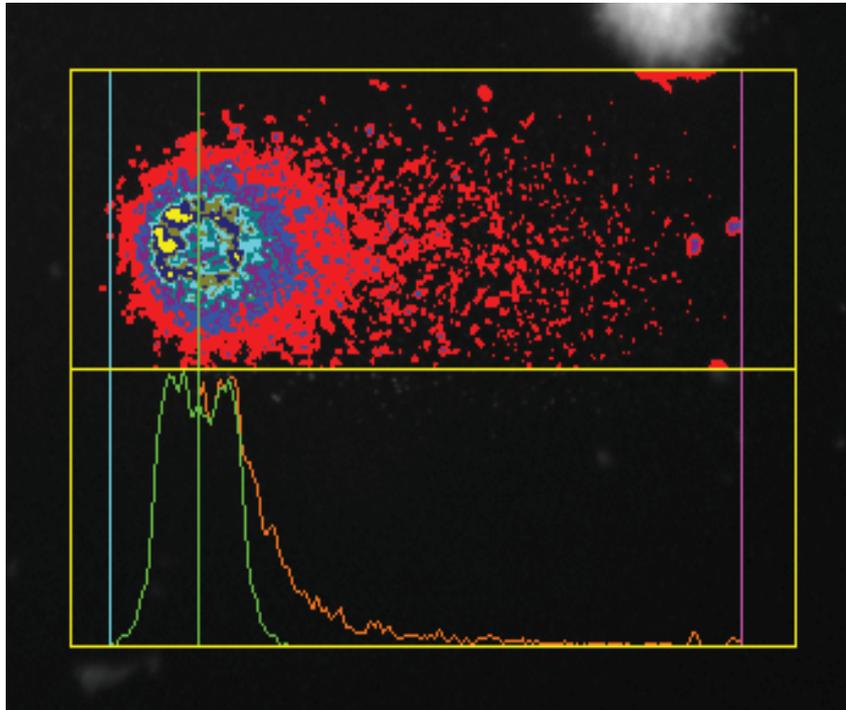


Figure 19 : Image de comet assay (de Sylvie Bony et Alain Devaux)

L'image permet de visualiser la migration de l'ADN à l'échelle d'un noyau, sur lequel on distingue deux zones (précisément délimitées par le logiciel) : la tête de la comète, colorée en vert / bleu, et la queue de la comète, les petites taches rouges à la droite de l'image. Alors que la tête de la comète représente les longs brins d'ADN, la queue permet d'identifier les petits brins d'ADN, soit les morceaux d'ADN fragmentés. La proportion d'ADN fragmenté dans la cellule est calculée par un pourcentage de fluorescence généré par la queue de la comète (Collins, 2004).

Études expérimentales

1 Comparaison de populations naturelles de grenouilles présentant des taux de croissance variables - *PARTIE DESCRIPTIVE*

1.1 Relation entre production d'énergie, balance oxydative et taille corporelle – Article 1, en préparation

En milieu naturel, des femelles de grenouilles rousses, *Rana temporaria*, ont été prélevées dans des étangs voisins, dans lesquels on distingue deux patrons d'histoire de vie. Une population présente des individus de taille plus élevée que les individus de l'autre population.

L'analyse de la taille des animaux ramenée à l'âge a permis de mettre en évidence que la taille élevée des grenouilles était bien due à un taux de croissance supérieure, et non pas à une durée de croissance plus importante. Chez les amphibiens, des pontes issues de femelles de taille élevée ont un nombre d'œufs supérieurs et / ou des œufs de taille plus élevée, comme cela a déjà été mesuré au cours de travaux sur cette espèce (Joly, 1991 ; Augert et Joly, 1993). L'élevage de têtards issus de pontes provenant chacune des deux populations étudiées nous a permis de mettre en évidence que les têtards issus de grosses femelles sont plus gros et se métamorphosent plus rapidement (données non présentées ici).

Deux hypothèses non exclusives ont été testées :

- les grenouilles de grande taille produisent beaucoup d'énergie pour la croissance mais au détriment d'une production élevée de radicaux libres, ce qui représente le cas de mitochondries à fort rendement énergétique.
- Les grenouilles de grande taille allouent beaucoup d'énergie à la croissance au détriment d'une allocation plus faible dans les défenses anti-oxydantes.

Au cours de cette étude, les paramètres des balances oxydative et énergétique ont été mesurés. Les consommations d'oxygène des organismes entiers, ainsi qu'au niveau mitochondrial, sont équivalentes entre les deux populations de grenouilles. Alors que la production mitochondriale de ROS est similaire entre les deux populations, l'efficacité de conversion énergétique mitochondriale (mesurée comme le rapport ATP/O) varie du simple au triple entre mitochondries de petites et grandes grenouilles. Par ailleurs, la globalité de la balance oxydative (les pro-oxydants, les anti-oxydants et les dégâts oxydatifs) a été prise en compte. Les grenouilles à croissance lente avaient au niveau hépatique, pour une même production de ROS, plus de dégâts oxydatifs en dépit d'une activité SOD (défense anti-oxydante) plus élevée et GPx équivalente. Nos résultats confortent l'idée d'estimer la complexité de la balance oxydative en tenant compte de tous les paramètres de cette balance (défenses anti-oxydantes, production de pro-oxydant et dégâts oxydatifs). De plus, cette étude montre qu'une forte efficacité mitochondriale, certainement à l'origine d'un apport élevé en énergie, est associée à une croissance rapide.

Mitochondrial plasticity in relation to body size and oxidative stress in frogs

By

Salin Karine^{1}, Rey Benjamin², Grolet Odile¹, Luquet Emilien¹, Devaux Alain⁴, Bony Sylvie⁴,
Hemmer Claire⁵, Teulier Loic³, Roussel Damien³ and Voituron Yann¹*

¹Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (U.M.R. CNRS 5023)
43 Bvd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

² Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (U.M.R. CNRS 5558)
43 Bvd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

³ Laboratoire de Physiologie Intégrative, cellulaire et moléculaire (U.M.R. CNRS 5123)
43 Bvd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

⁴ Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (U.M.R. CNRS 5023)
3 rue Maurice Audin 69518 Vaulx en Velin, France

⁵ Laboratoire d'écosystème des lacs (Cemagref-HYAX)
3275 Route de Cézanne CS 40061 13182 Aix en Provence Cedex 5, France.

Keywords: ATP/ROS ratio; energy allocation; growth rate; mitochondria activity; oxidative stress.

* To whom correspondence should be addressed: karine.salin@univ-lyon1.fr; Tel: +33 4 72 43 15 20; FAX: +33 4 72 43 11 41.

ABSTRACT

The relation within a species between energy metabolism and fitness components (growth, maintenance and reproduction) has been extensively studied and results have showed very different patterns. Depending on the environmental resources, cellular energy metabolism is produced by the mitochondrial ATP synthesis, before to be allocated in the different life history traits. However, as a by-product of the normal aerobic ATP-producing processes mitochondria generate Radical Oxygen Species (ROS), that also affect life history traits. Study the both sides of the mitochondrial functioning (ATP vs. ROS productions) appears a relevant way to understand the relation between environmental resources, energy metabolism and a life history traits.

Using two neighboring wild populations of female common frog (*Rana temporaria*) exhibiting dissimilar body size, we showed a clear relation between growth rate and mitochondrial functioning. Frog population exhibiting high growth rate (HGR) revealed 3-fold higher mitochondrial energy synthesis efficiency (higher ATP synthesized per Oxygen consumed) than low growth rate frog population (LGR). The inter-population plasticity of the ATP/O ratio is surprisingly not associated with higher ROS-mediated cost for larger frogs, weighted by the mitochondrial density and the animal metabolic rate. Regarding oxidative balance, the growth rate seems negatively impact investment in antioxidant capacities.

We thus support that ATP/O ratio could be the physiological mechanism occupying a pivotal position between energy metabolism and growth rate. In addition, we support the acceptance of a new eco-physiological index (ATP/ROS) taking into account both characteristics of the mitochondrial functioning which could reflect animal performances.

INTRODUCTION

For the last ten years, a large number of studies allowed the emergence of the “oxidative stress ecology” concept addressing the role of reactive oxygen species (ROS) production as a biochemical basis of life history trade-offs (Dowling and Simmons, 2009; Metcalfe and Alonzo-Alvarez 2010, Marko et al. 2011). This highly reactive molecules known to affect lipids, proteins, and nucleic acids can lead to cellular damages and ultimately to a disruption of the cell structures that directly and/or indirectly impact individual performances. Because the ROS production is linked to the different components of animal life history as (i) the cost of sustained growth (Metcalfe and Monaghan, 2003; Alonso-Alvarez et al. 2007, De Block and Stoks, 2008; Costantini et al. 2010; Kim et al. 2011), (ii) a proximate cost of reproduction (Alonzo-Alvarez et al. 2004; Metcalfe and Alonzo-Alvarez, 2010) and (iii) affecting lifespan (Speakman, 2005; Neretti et al. 2009), oxidative stress is supposed to be a key fitness component of an organism (Dowling and Simmons, 2009; McGraw et al. 2010; Monaghan et al. 2009).

The oxidative stress results from an imbalance between pro-oxidant molecules and battery of oxidative scavenging systems also called antioxidant defenses (Monaghan et al. 2009, Salmon et al. 2011). Cellular protection against the harmful effects of ROS includes prevention (decrease ROS production), interception and repair (increase anti-oxidant system) and several markers are available for the evaluation of the resultant, the oxidative stress status (Costantini, 2008). Whereas antioxidant capacities depend upon both diet and organism energy allocation, ROS are mainly generated by mitochondrial respiratory chain activity as a by-product of oxidation/phosphorylation reactions, during the normal aerobic ATP-producing process (Korshunov, 1997; Jezek and Hlavata, 2005). As mitochondria, the major ATP cell generator, regulates ATP homeostasis (Lehninger et al. 1993), its activity depends upon the cellular energy needs and constitutes the link organic between environmental resources and animal performances (Seebacher et al. 2010). When the needs increase, organisms can regulate the ATP production by increasing the oxidative phosphorylation rate with concomitant increased oxygen consumption (VO_2) by modulating the tissue mitochondrial density and/or the mitochondrial efficiency (ATP/O), all these changes also potentially impacting the mitochondrial ROS generation (Korshunov, 1997; Brand, 2005; Barja 2007).

In this study, we used an integrative approach in evaluating a panel of physiological variables, ranging from cellular to whole-organism levels in the common frog (*Rana temporaria*) stemming from two neighboring populations with dissimilar life-history patterns and particularly different mean body sizes and age (Joly, 1991; Augert and Joly, 1993). Combining the mitochondrial ATP synthesis, with the analysis of oxidative balance may allow a better understanding of the physiological and biochemical basis of life history strategies. We thus propose to describe the implication of mitochondria functions (ATP synthesis and ROS production) according the body size, a key life history parameter that plays a central role in determining the time-scale of animal's life history; almost all life-history parameters being correlated with body size (Calder, 1984, Arendt, 1997). In addition, regarding the oxydative balance, this study also allows to test if rapid growth is associated with decrease resistance to oxydative stress and/or increase oxidative attack in vertebrate wild populations, potentially providing an proximate cost of growth (Brand, 2000; Metcalfe and Monaghan, 2003; Alonso-Alvarez et al. 2007, De Block and Stoks, 2008; Costantini et al. 2010; Kim et al. 2011).

We thus described the variation in three components of the oxidative balance (oxidative damage, antioxidant capacity and mitochondrial pro-oxidant production), developed in conjunction with the mitochondria efficiency, calculated as the ratio between ATP production and oxygen consumed (ATP/O ratio) weighted by the mitochondrial density and the animal metabolism rate.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The common frog, *Rana temporaria* is widely distributed in Eurasia and inhabits an extensive range of habitats from sea level to nearly 2500m (Vences et al. 2003). It is an explosive breeder with a normal spawning period of 7 days in March under French latitudes. In 2009, frogs in amplexus were caught in two ponds located in Jurassian Bresse, respectively near Montcoy (46° 47' 27" N 5° 00' 31" E) and near Chemenot (46° 50' 32" N 5° 33' 10" E), the two sites being 40 km apart. One population exhibits a low growth rate (LGR, n = 124) and the other one a high growth rate (HGR, n = 115). Frogs were caught by means of bow nets set on the spawning sites. Only females were kept (more reproductive investment and body size variation) weighed and measured from snout to urostyle. Animals were maintained individually in laboratory at 17-19°C, with a 12:12h light-dark cycle, and were fed on crickets once a week.

Index of life-history traits

For each of the two populations, life-history have been characterized by body size and age. The second toe of the right forelimb of each animal was clipped for age determination, following the skeletochronological method (Smirina, 1972). In their natural environment, the growth of bone in frogs is cyclic, producing bony layers separated by lines of arrested growth in response to metabolic depression during winter period. Thus, these lines represent one year of growth, and so their number gives an accurate estimate of the age of frog in years. Ryser (1989) has shown by the skeletochronological method that breeding common frogs experienced a reduction in growth rate relative to nonbreeding frogs of the same age. According to Ryser, a smaller interval between two lines of arrested growth (LAG) indicates a lower growth rate due to the reproductive investment, and the first of these smaller intervals indicates the age of maturity. Consequently, the size at maturity is the snout-urostyle length of the first breeders. The growth rate was estimated by age-size relationship with respectively skeletochronology and the snout-urostyle length.

Organismal and tissue metabolic parameters

Energy expenditure was determined by measuring rate of oxygen consumption in an open-circuit gas analyzing system (indirect calorimetry). For both populations, the rate of oxygen consumption was measured at the same time of the day to avoid potential effects due to circadian rhythm. Prior to oxygen uptake determination, animals were fasted for three days to ensure that they were post-absorptive. Frogs were placed in a 750 mL metabolic chamber connected to a high pressure air bottle (Air Liquide, SA) filled with breathable gas (Respal-CT), allowing air entrance at a rate of 150 ml min^{-1} . The animals were acclimatized in the test chamber for several hours and the respiration was then measured for two hours. A subsample of the exhaust air from the chamber was drawn continuously through columns of Drierite to trap moisture and oxygen content measured by a Servomex O₂ Analyser. The fractional oxygen concentration of sampled air was averaged every 10s and converted into \dot{V}_{O_2} ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) using standard equation (Depocas and Hart, 1957). At the end of each run, a stable baseline was observed with the setup assembled without animals ensuring that the setup was leak proof. To assay liver cytochrome c oxidase activity, a small piece of frozen liver (approximately 10 mg) was homogenized with a mixer mill (60 Hz; 30 sec) (Retsch MM200; Fisher Bioblock Scientific) in a buffer containing 1 mM ATP, 50 mM HEPES, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, and 5 mM EGTA, pH 7.4. Thereafter, the same volume of buffer containing 10 mg/mL lubrol was added. Cytochrome c oxidase was determined polarographically at 20°C, with a Clark oxygen electrode (Rank Brother LTD), in 500 μL of assay medium containing 30 μM cytochrome c, 4 μM rotenone, 0.5 mM 2-4 dinitrophenol, 10 mM sodium malonate, and 75 mM HEPES adjusted to pH 7.4 at 20°C. Then, 10 mM ascorbate, and 0.3 mM N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine were added, and the maximal respiration rate associated with cytochrome c oxidase activity was recorded. Tissue Cox activity has been considered as an estimation of mitochondrial density.

Isolation of mitochondria.

Animals were killed by decapitation. The liver was immediately dissected, weighed and placed in an ice-cold isolation medium (250mM sucrose, 1mM EGTA, 20mM tris-HCl, pH 7.4, at 4°C). Mitochondria were isolated from two to five frogs per preparation, by groups of identical age and population, all steps being carried out at 4°C. The liver was cut up finely

with sharp scissors and homogenized with a Potter–Elvehjem homogenizer (three passages). The purification of mitochondria has been realized by differential centrifugation as described in Salin et al. 2010. Finally, the pellet was stored in 100 μ L of ice-cold isolation medium. Protein concentration was measured at 540nm using the biuret method with bovine serum albumin as a standard. The frog mitochondrial preparations contained a dark pigment which absorbed at 540 nm, the absorbance of the same volume of mitochondria in water containing 0.6% deoxycholate and 3% NaOH was subtracted.

Mitochondrial respiration and ATP synthesis measurements.

Mitochondrial oxygen consumption was measured with a Clark oxygen electrode (Rank Brother LTD), in a stirred and closed chamber of 250 μ L volume, thermostatically controlled at 20°C. Liver mitochondria were incubated in a respiratory medium containing 120mM KCl, 1mM EGTA, 5mM KH₂PO₄, 2mM MgCl₂, 20mM glucose, 1.5U/mL hexokinase, 0.3% bovine serum albumin and 3mM Hepes (pH 7.4, 20°C), and supplemented with 5mM succinate and 5 μ M rotenone. The mitochondrial ATP synthesis was followed by glucose-6-phosphate accumulation using an ADP-regenerating system (hexokinase plus glucose) and increasing concentrations of ADP, ranging from 5 to 100 μ M (Salin et al. 2010; Teulier et al. 2010). After recording the respiration rate for 6 minutes, four 60 μ L aliquots of mitochondrial suspension were withdrawn from the chamber every two minutes and were immediately quenched in 40 μ L perchloric acid solution (10% HClO₄ and 25mM EDTA). After centrifugation (15,000 \times g for 5 min), supernatants were neutralized with a KOH solution (0.2M KOH, 0.3M MOPS). Glucose-6-phosphate content was measured by spectrophotometry at 340nm (Lang and Michal, 1974) in an assay medium consisting of NAD (0.5mM), triethanolamine-HCl (50mM), MgCl₂ (7.5mM), EDTA (3.75mM) adjusted to pH 7.4 at room temperature. Glucose-6-phosphate concentration was calculated from the difference between the level of NADH measured before and 1 hour after the addition of glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.5U). The rate of mitochondrial ATP production was calculated from the slope of the linear accumulation of glucose-6-phosphate over the sampling time interval (6 minutes). The linearity of glucose-6-phosphate accumulation allowed us to check that the system was at a steady state. It is also important to note that we made sure that the rates we measured were specific of the mitochondrial ATP synthase activity, by determining oxygen consumption and ATP synthesis rates in the presence of

oligomycin ($5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Over the range of ADP concentration used, no oligomycin-insensitive ATP synthesis activity was measurable.

Mitochondrial cytochrome c oxidase (COX) activity was measured in the buffer used for the respiration assay supplemented with 10 mM antimycin, 5 mM ascorbate and 2 mM TMPD.

Index of oxydative balance

We measured three main parameters aiming at describing the oxidative balance, *i.e.* i) mitochondrial oxidant molecule generation, ii) main antioxidant enzymes activities and iii) an index of oxidative injuries measured in liver.

The peroxide anion (O_2^-) is the radical oxygen species generated by mitochondria and its dismutation product hydrogen peroxide (H_2O_2), molecule usually assayed to measured ROS mitochondrial production. Mitochondrial H_2O_2 generation was detected using Amplex red fluorescent dye in the presence of horseradish peroxydase (HRP). The assay medium ($200\mu\text{l}$) was supplemented with 1U HRP, $10\mu\text{M}$ Amplex red reagent and $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ mitochondrial protein was given at the start of the detection (Zhou et al. 1997). Succinate (5mM) was used as respiratory substrates. Fluorescence was measured at 20°C using a fluorescence spectrophotometer (Xenius, SAFAS Monaco) at excitation and emission wavelengths of 563 and 587 nm, respectively. The fluorescent signal was calibrated by standard curve prepared with H_2O_2 (20 to 400nM) at each measurement.

The activities of two key antioxidant enzymes, total Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione Peroxidase (GSH-Px), were determined by using commercially available kits (706002 Superoxide Dismutase Assay Kit and 703102 Glutathione Peroxidase Assay Kit, Cayman Chemical). A portion of liver was homogenized with a mixer mill (30Hz; 30 sec) (Retsch MM200; Fisher Bioblock Scientific) in a buffer containing 100mM KH_2PO_4 , 1mM dithiothreitol, and 2mM EDTA (pH 7.4). All procedures completely complied with the manufacturer's instructions. The activities of enzymes were expressed as units per milligram protein and the proteins were assayed with the Pierce BCA (Bicinchoninic acid) protein assay.

Oxidative damage have been determined though both blood DNA damage and liver lipid peroxydation. Genotoxicity has been evaluated in erythrocytes by measuring the formation of primary DNA damage using the Comet assay since this technique enables the

assessment of DNA damage stemming from ROS oxidative effect (Risso De Faverney et al. 2001). Heparinized blood samples collected by cardiac puncture on sacrificed animals were diluted ($\times 100$) in a cryopreservative buffer (250mM sucrose, 40mM trisodium citrate, 5% DMSO, pH 7.6), flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . The Comet assay was performed according to the procedure described by Singh *et al.* (1988). The percentage of tail DNA was chosen as being the most relevant Comet parameter according to Collins (2004). Thiobarbituric acid reactive substances are an index of lipid peroxidation and oxidative stress. A portion of liver was homogenized with a mixer mill (30Hz; 30 sec) (Retsch MM200; Fisher Bioblock Scientific) in a buffer containing 100mM KH_2PO_4 , 0.05% BSA, 10mM EDTA, 0.13mM butylated hydroxytoluene and 0.13 mM deferoxamine (pH 7.4). Liver lipid peroxides content was assessed spectrophotometrically at 540 nm, measuring the malondialdehyde (MDA) as an index of thiobarbituric acid-reactive products (TBARs) following the method described by Ohkawa *et al.* 1979. Results are expressed in nmol MDA/mg liver.

Statistical Analysis

For both populations, values are presented as means \pm SEM. Statistical analyses were performed with JMP software (version 7.0.1). Statistical differences between populations were assessed by linear model of analyses of variance (ANOVA) and covariance (ANCOVA) and Student-test. The effect of population origin, age of individuals and interaction of these factors has been tested. A 5% ($P < 0.05$) level of significance was used in all tests.

RESULTS

Life-history traits

i) Body size

As observed in Fig. 1, at each age, mean body length was greater in HGR than in LGR frogs (ANOVA 2, $F_{1,230} = 329.76$, $P < 0.001$). The growth rate before sexual maturity was also higher in HGR compared to LGR when body size at the first reproduction was considered (ANOVA 1, $F_{1,112} = 137.82$, $P < 0.001$). Moreover, the growth rate for reproductive females (as described by the slope of the linear relationship between body length and age after first reproduction) was significantly higher in HGR ($y = 2.09x + 62.75$) than in LGR group ($y = 0.69x + 56.89$; ANOVA 2, $F_{1,233} = 5.0499$, $P < 0.001$).

ii) Age distribution

Calculated mean age of the LGR population was significantly higher than the HGR population (3.77 ± 0.08 vs. 3.30 ± 0.08 , respectively, ANOVA 1, $F_{1,230} = 17.80$, $P < 0.001$; Fig. 1). As observed in Fig. 1, maximum recorded lifespan, described as the maximum number of LAGs, was higher in the LGR population than in the HGR one (7 vs 6 years, respectively).

Metabolic parameters

i) Basal metabolic rate

Body mass had a significant effect on basal metabolic rate (Fig. 2, ANCOVA, $F_{1,164} = 33.03$, $P < 0.001$). Individual rate of oxygen consumption expressed per gram of body weight showed no difference between the two populations (ANOVA, $F_{1,164} = 2.38$; $P = 0.09$).

ii) Liver mitochondrial oxidative capacity and density

Liver COX oxygen consumption was similar for the two frog phenotypes (HGR COX activity = $6.97 \pm 0.57 \mu\text{mol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ of fresh liver and LGR COX activity = $6.28 \pm 0.49 \mu\text{mol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ of fresh liver; ANOVA 1, $F_{1,36} = 1.63$, $P = 0.21$). Similarly, mitochondrial COX activity was not significantly different between HGR and LGR frogs ($16.2 \pm 1.3 \text{ nmol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein *versus* $13.1 \pm 1.3 \text{ nmol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein, respectively; ANOVA 1, $F_{1,45} = 2.88$, $P = 0.10$). Hence, the liver mitochondrial content, estimated as the COX activities ratio between tissue homogenate and isolated mitochondria, showed no difference between the two groups.

Liver mitochondrial efficiency

As shown in Fig. 3a, liver mitochondria extracted from HGR individuals presented a 3-fold higher rate of ATP production per oxygen consumed than the LGR individuals (ANOVA 2, $F_{1,37} = 52.20$, $P < 0.001$). This ratio was not affected by the age of individuals (ANOVA 2, $F_{1,37} = 2.24$, $P = 0.14$).

Oxidative balance parameters

i) Mitochondrial H₂O₂ generation

As visible in Fig. 3b, liver mitochondrial H₂O₂ generation is similar in the two populations (38.29 ± 7.30 and $39.16 \pm 6.18 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \cdot \text{prot}^{-1}$ in HGR and LGR, respectively; ANOVA 1, $F_{1,14} = 0.0083$; $P = 0.93$).

ii) Liver antioxidant enzymes activities

When including age as a co-variable, SOD activity was significantly 16% higher in the liver of LGR than of HGR frogs (ANOVA 2, $F_{1,75} = 6.05$, $P = 0.02$; Fig. 3c); but without any age interaction whatever the populations (ANOVA 2, $F_{1,75} = 2.05$, $P = 0.16$).

No difference in liver GPX activity was noticeable between the two populations (ANOVA 2, $F_{1,74} = 0.01$, $P = 0.94$; Fig. 3d). On the other hand, this antioxidant enzyme activity decreased with age (ANOVA 2, $F_{1,74} = 4.83$ $P < 0.05$).

iii) Index of oxidative damage.

Liver lipid oxidative damage, level of malondialdehydes, was 10% higher in LGR than HGR frogs (Fig. 3e, ANOVA 2, $F_{1,75} = 10.16$, $P < 0.05$) with negative effect of age (ANOVA 2, $F_{1,7} = 11.98$ $P < 0.001$) in both populations.

Blood cell DNA damage level (Fig. 3f) was not significantly different between the two frog populations (ANOVA 2, $F_{1,140} = 0.40$, $P = 0.28$) and without any age interaction (ANOVA 2, $F_{1,140} = 0.17$, $P = 0.74$).

DISCUSSION

This study presents an association between growth rate and mitochondrial functioning, suggesting that plasticity of mitochondrial efficiency of the energy transduction system (the ATP/O ratio variation) could be a proximal parameter to support body size variations into a species. Our results also suggest that greater growth rate is not correlated to an increased pro-oxidant production (ROS), but rather a decrease in antioxidant capacities.

Our data revealed that the effective mitochondrial energy synthesis efficiency (ATP synthesized per oxygen consumed) was about 3-fold greater for HGR population compared to LGR population despite equivalent basal metabolic rate, mitochondrial oxidative capacity and density. Thus, for the same energy cost (in terms of oxygen quantity used), some individuals produce far more ATP molecules that could be allocated to different functions. In other words, the higher availability of ATP would in turn explain the higher growth rate and higher adult body size of HGR frogs. Hence, this study clearly illustrates the fact that, with the same amount of oxygen and energetic substrates consumed, energy production may differ. This important result makes sense in the light of the literature, in which the energy availability is historically estimated by the oxygen consumption and/or food intake (reviewed by Speakman, 2005, Brand, 2005). In this condition, the ATP/O ratio appears as an important parameter not only to estimate the energy cellular amount that promotes metabolic activities, but also to adjust environmental energetic constraints when it is estimated by the oxygen consumption and/or the energy of food intake.

The classic life history theory predicts a negative association between high growth investment and lifespan (Stearns, 1992; Zera and Harshman, 2001). Indeed, in literature, rapid growth is associated with reduced longevity (Metcalf and Monaghan 2003). This hypothesis is in accordance with the present results since the HGR population was on average younger than the LGR population, and the observed maximal lifespan of individuals was lower in HGR frogs than in LGR frogs (6 versus 7 years old). Hence, individual frogs with high mitochondrial efficiency have greater growth rate and body size but probably live shorter.

Numerous studies have shown a link between fast growth and oxidative stress that may potentially function as an important constraint in the evolution of growth rate (Metcalf and Monaghan, 2003; Alonzo-Alvarez et al. 2007, De Block and Stoks, 2008; Costantini et al.

2010; Kim et al. 2011). From a mechanical perspective, our data does not completely support this point of view for two reasons. Firstly, we found that the mitochondrial ROS production and the erythrocyte DNA damage, an index of the whole body oxidative stress status, were not different between the two frog populations. Moreover, although we effectively found a higher oxidative scavenger activity of SOD in liver of LGR population, this result was associated with a higher hepatic lipid peroxidation. Secondly, we did not systematically find a correlation between the damages or defenses and age. In particular, the level of DNA damage in blood cells and liver SOD activity were not significantly correlated with age in our frog specimens. These results are consistent with numerous studies, focused on other animal species exhibiting continuous growth, like mollusks or fish, in which the level of DNA damage in different cell types is not influenced by age or size which is age-correlated (Hartl et al. 2004; Wilson et al. 1998). Moreover, Lopez-Torres *et al.* (1991, 1993) and Pérez-Campo *et al.* (1993) reported no age-related decrease in the activities of the antioxidant enzymes and no age-related increase in the level of TBARs of young (2 years old) and old (4 and 5 years old) *Rana Perezi*. The different patterns of age-related change in antioxidant enzyme activity reported in *R. perezi* (Lopez-Torres et al. 1993; Pérez-Campo *et al.* 1993) , in *R. nigromaculata* (Kashiwagi et al. 2005) and in *R. temporaria* (present study) may involve some species specific factors, but could also be attributed to some experimental conditions. For instance, *R. perezi* and *R. temporaria* specimens were collected in the field, whereas *R. nigromaculata* were raised under controlled laboratory conditions. The literature also shows that this is not only true for amphibians, as Nussey *et al.* (2009) found no evidence for any systematic change in oxidative damage levels with age amongst a cross-sectional sample of sheep living in wild population. The lack of clear correlation, between oxidative damages , growth rate, and age may highlight the potential limitations of estimating oxidative balance in natural population. This problem can be caused by several reasons, in particular the divergence between the biology of the animal and our method of measurement. Firstly, since senescence would be a very fast phenomenon and therefore difficult to highlight in wild animals. Secondly, a larger set of markers - lipid, protein and nucleic acid - is likely necessary to be representative of oxidative status of an organism.

CONCLUSION

Even if our data do not disentangle genetic and environmental effects on ATP/O variations, they suggest that this parameter is associated with growth rate in natural populations. A potential explanation of such plasticity of energy transduction may come from conditions during development. Indeed, Dillin *et al.* (2002) proposed that constraints faced by the developing animals shape mitochondrial functioning that persist during adulthood. We can thus hypothesize that biophysical parameters of the ponds differ sufficiently to induce a different mitochondrial functioning in tadpoles leading to the differences observed on adults in this study.

In addition, the predictive positive correlation between growth rate and oxidative stress seem not imply mitochondrial trade off between ATP and ROS production. Therefore, investment of ATP in growth should be constrained by investment in resistance to oxidative stress, the anti-oxidant molecule, suggesting a more complicated view of physiological basis of aging and the interplay between physiology and trait expression. A recent study focused on mutant *Caenorhabditis elegans* (Neretti, 2009) defined an ATP/ROS ratio into a physiopathological context. In addition, ATP production is expressed as $\text{mol.mg protein mitochondrial}^{-1}.\text{minute}^{-1}$ and ROS production as $\text{mol.mg protein mitochondrial}^{-1}.\text{minute}^{-1}$, we could calculate an ATP/ROS ratio (*i.e.* in our study 78.6 for HGR and 25.5 for LGR). We thus plead for the development of ratio into an ecological framework that may strongly increase the understanding of life-history traits.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present investigation was carried out according to the ethical principles of the French Ministry of agriculture and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Scientific Purposes (Council of Europe, n°. 123, Strasbourg). This work was supported by the Center National de la Recherche Scientifique and the University of Lyon. We are particularly indebted to Bruno Zagrodnik, aquaculturist, for his collaboration in this work. We acknowledge Caroline Romestaing and Maud Belouze for their scientist advices and their technical assistance.

BIBLIOGRAPHY

- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Prost J, Faivre B, Sorci G (2004) Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters* 7:363-368
- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Faivre B, Sorci G (2007) Increased susceptibility to oxidative damage as a cost of accelerated somatic growth in zebra finches. *Functional Ecology* 21:873-879
- Arendt JD (1997) Adaptive intrinsic growth rates: An integration across taxa. *Quarterly Review of Biology* 72:149-177
- Augert D, Joly P (1993) Plasticity of age at maturity between two neighboring populations of the common frog (*Rana temporaria*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 71:26-33
- Barja G (2007) Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: Implications for aging studies. *Rejuvenation Research* 10:215-223
- Brand MD (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol* 35:811-820
- Brand MD (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochemical Society Transactions* 33:897-904
- Calder WA (1984) *Size, Function, and Life History*. Harvard university press
- Castellano S, Cucco M, Giacoma C (2004) Reproductive investment of female Green Toads (*Bufo viridis*). *Copeia*:659-664
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair - Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 26:249-261
- Costantini D (2008) Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecology Letters* 11:1238-1251
- Costantini D, Carello L, Fanfani A (2010) Relationships among oxidative status, breeding conditions and life-history traits in free-living Great Tits *Parus major* and Common Starlings *Sturnus vulgaris*. *Ibis* 152:793-802
- De Block M, Stoks R (2008) Compensatory growth and oxidative stress in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 275:781-785

- Depocas F, Hart JS (1957) Use of the Pauling Oxygen Analyzer for Measurement of Oxygen Consumption of Animals in Open-Circuit Systems and in a Short-Lag, Closed-Circuit Apparatus. *Journal of Applied Physiology* 10:388-392
- Dillin A, Hsu AL, Arantes-Oliveira NA, Lehrer-Graiwer J, Hsin H, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Kenyon C (2002) Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science* 298:2398-2401
- Dowling DK, Simmons LW (2009) Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 276:1737-1745
- Hartl MGJ, Coughlan BM, Sheehan D, Mothersill C, van Pelt F, O'Reilly SJ, Heffron JJA, O'Halloran J, O'Brien NM (2004) Implications of seasonal priming and reproductive activity on the interpretation of Comet assay data derived from the clam, *Tapes semidecussatus* Reeves 1864, exposed to contaminated sediments. *Marine Environmental Research* 57:295-310
- Jezek P, Hlavata L (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37:2478-2503
- Joly P (1991) Variation in size and fecundity between neighbouring populations in the common frog, *Rana temporaria*. *Alytes* 9:79-88
- Kashiwagi K, Shinkai T, Kajii E, Kashiwagi A (2005) The effects of reactive oxygen species on amphibian aging. *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol* 140:197-205
- Kim SY, Noguera JC, Morales J, Velando A (2011) Quantitative genetic evidence for trade-off between growth and resistance to oxidative stress in a wild bird. *Evol Ecol* 25:461-472
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *Febs Letters* 416:15-18
- Lehninger AL, Nelson DL, Cosx MM (1993) *Principles of Biochemistry*. In: 2nd ed. NY, NY. (ed). Worrth Publishers
- Lopez-Torres M, Pérez-Campo R, Dequiroga GB (1991) Effect of natural aging and antioxidant inhibition on liver antioxidant enzymes, glutathione system, peroxidation, and oxygen-consumption in *Rana perezi*. *J Comp Physiol B-Biochem Syst Environ Physiol* 160:655-661

- Lopez-Torres M, Pérez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G (1993) Simultaneous Induction of Sod, Glutathione-Reductase, Gsh, and Ascorbate in Liver and Kidney Correlates with Survival During Aging. *Free Radical Biology and Medicine* 15:133-142
- Marko G, Costantini D, Michl G, Torok J (2011) Oxidative damage and plasma antioxidant capacity in relation to body size, age, male sexual traits and female reproductive performance in the collared Xycatcher (*Ficedula albicollis*). *J Comp Physiol B-Biochem Syst Environ Physiol* 181:73-81
- McGraw KJ, Cohen AA, Costantini D, Horak P (2011) The ecological significance of antioxidants and oxidative stress: a marriage between mechanistic and functional perspectives. *Functional Ecology* 24:947-949
- Metcalf NB, Alonso-Alvarez C (2010) Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Functional Ecology* 24:984-996
- Metcalf NB, Monaghan P (2003) Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology. *Exp Gerontol* 38:935-940
- Monaghan P, Metcalf NB, Torres R (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* 12:75-92
- Neretti N, Wang PY, Brodsky AS, Nyguen HH, White KP, Rogina B, Helfand SL (2009) Long-lived *Indy* induces reduced mitochondrial reactive oxygen species production and oxidative damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:2277-2282
- Nussey DH, Pemberton JM, Pilkington JG, Blount JD (2009) Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population. *Functional Ecology* 23:809-817
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for Lipid Peroxides in Animal-Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry* 95:351-358
- Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Rojas C, Cadenas S, Barja G (1993) A comparative study of free radicals in vertebrates--I. Antioxidant enzymes. *Comp Biochem Physiol B* 105:749-755
- Risso-de Faverney C, Devaux A, Lafaurie M, Girard JP, Bailly B, Rahmani R (2001) Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquatic Toxicology* 53:65-76
- Ryser J (1989) Weight-Loss, Reproductive Output, and the Cost of Reproduction in the Common Frog, *Rana temporaria*. *Oecologia* 78:264-268

- Salin K, Teulier L, Rey B, Rouanet JL, Voituren Y, Duchamp C, Roussel D (2010) Tissue variation of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in cold-acclimated ducklings. *Acta Biochim Pol* 57:409-412
- Salmon AB, Richardson A, Perez VI (2011) Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radical Biology and Medicine* 48:642-655
- Seebacher F, Brand MD, Else PL, Guderley H, Hulbert AJ, Moyes CD (2010) Plasticity of Oxidative Metabolism in Variable Climates: Molecular Mechanisms. *Physiol Biochem Zool* 83:721-732
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A Simple Technique for Quantitation of Low-Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research* 175:184-191
- Smirina EM (1972) Les couches annuelles dans les os de *Rana temporaria*. *Zoolicheskii Zhurnal* 51:1529-1534
- Speakman JR (2005) Body size, energy metabolism and lifespan. *Journal of Experimental Biology* 208:1717-1730
- Stearns SC (1992) *The evolution of life histories*. Oxford university press
- Teulier L, Rouanet JL, Letexier D, Romestaing C, Belouze M, Rey B, Duchamp C, Roussel D (2010) Cold-acclimation-induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency. *Journal of Experimental Biology* 213:2476-2482
- Vences M, Grossenbacher K, Puente M, Palanca A, Vieites DR (2003) The Cambales fairy tale: elevational limits of *Rana temporaria* (Amphibia : Ranidae) and other European amphibians revisited. *Folia Zool* 52:189-202
- Wilson JT, Pascoe PL, Parry JM, Dixon DR (1998) Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca : Pelecypoda). *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399:87-95
- Zera AJ, Harshman LG (2001) The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32:95-126
- Zhou MJ, Diwu ZJ, PanchukVoloshina N, Haugland RP (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide:

Applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases.
Analytical Biochemistry 253:162-168

Fig. 1: Relationship between body length (measured from snout to urostyle) and age (determination by skeletochronological method) in two common frog populations. Data are presented as means \pm SEM; n = 113 for High growth rate frogs (HGR) and n = 124 for Low growth rate frogs (LGR).

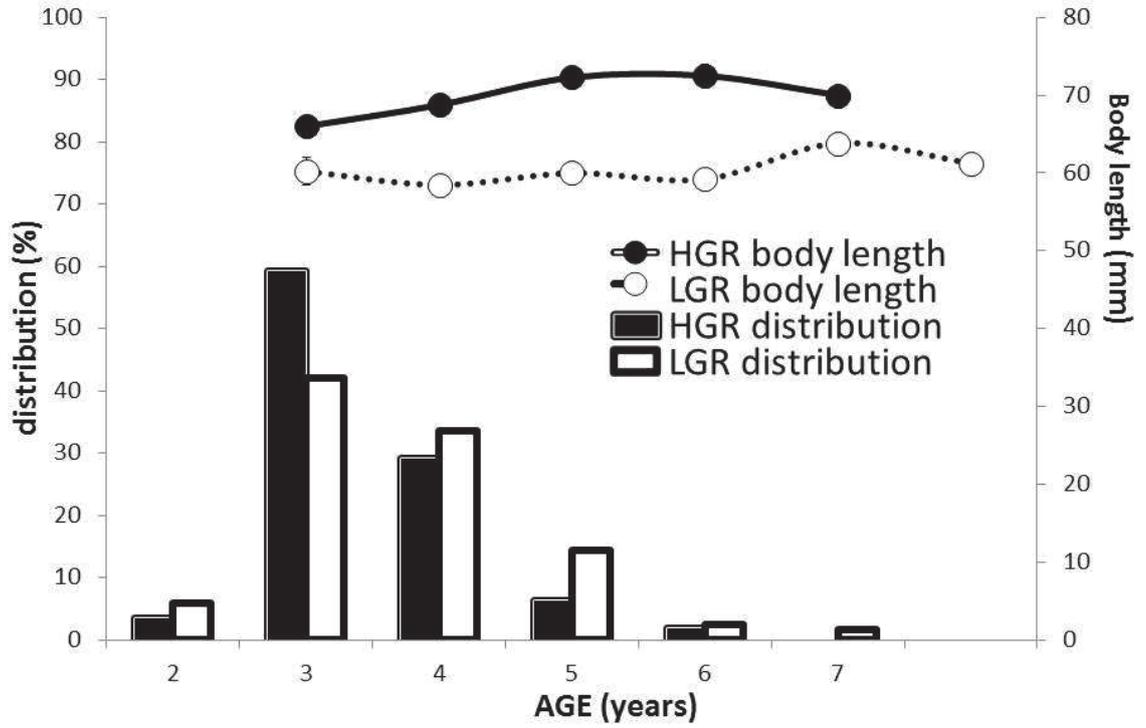


Fig 2: Basal metabolic rate as a function of body mass in the two populations of common frog *Rana temporaria*. High growth rate (HGR) and low growth rate (LGR) morphs showed similar oxygen consumption by unit of mass (ANOVA 2, $p=0,09$). The number of individual is presented in parentheses.

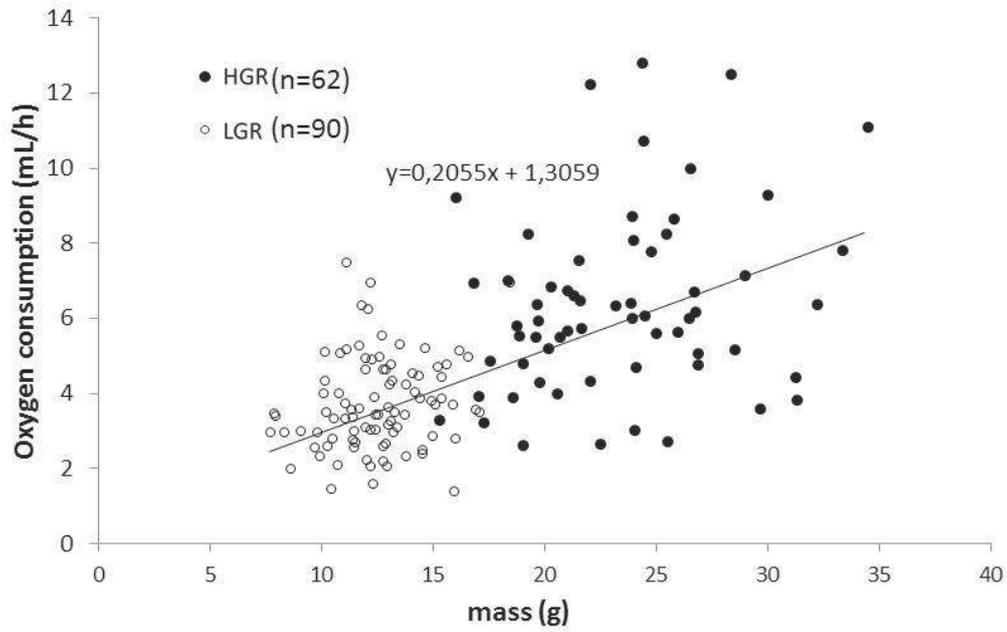
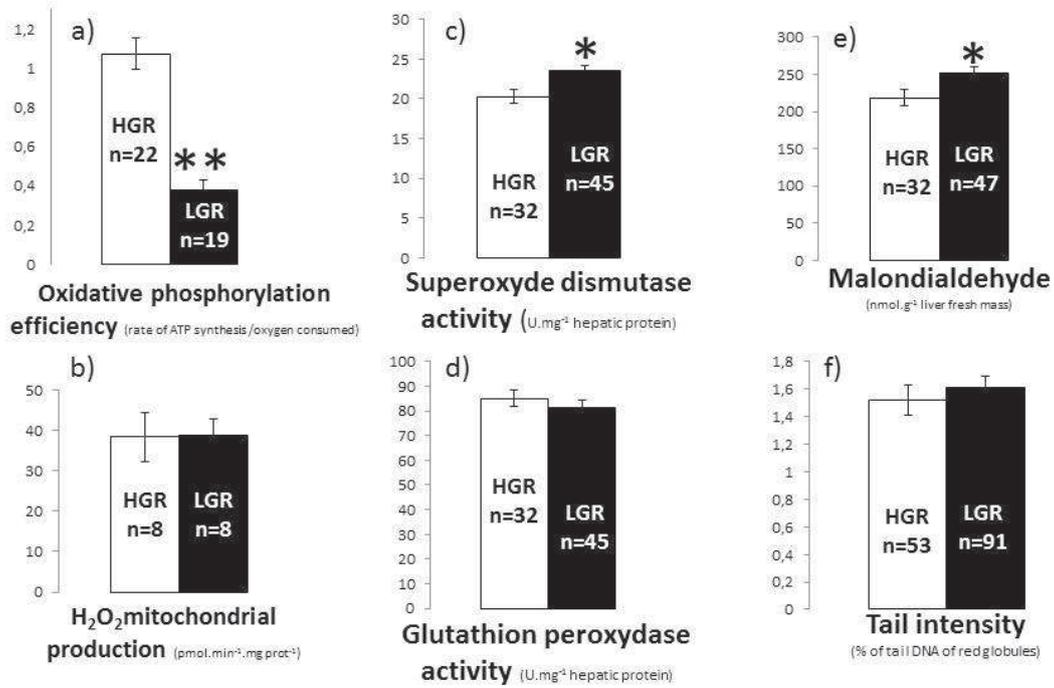


Fig 3: Mitochondrial efficiency (ATP/O) and different parameters of oxidative balance in two populations of common frog, *Rana temporaria*. Data shown are mean \pm SEM. *, $P < 0,05$; ** $P < 0,001$. The number of individual is presented on each diagram.



1.2 Base mécanistique du système de conversion énergétique mitochondriale : variations du rendement des oxydations phosphorylantes – Article 2, soumis à Journal of Experimental Zoology Part A:

Les différences de rendement énergétique mitochondrial associées au taux de croissance variables révélées lors de l'étude précédente peuvent mettre en cause plusieurs sites de la mitochondrie, et ce de manière non-exclusive. Comme il a été expliqué en introduction, l'activité et la stœchiométrie des pompes à protons (la chaîne respiratoire et l'ATP synthétase) sont des paramètres variables, de même la fluidité de la membrane interne mitochondriale peut affecter la force protomotrice. Nous avons alors effectué des études plus approfondies du fonctionnement mitochondrial de manière à comprendre quels pourraient être les mécanismes sous-jacents à nos résultats. Alors que les capacités oxydatives de la chaîne respiratoire sont équivalentes, une faible variation du potentiel de membrane laisse suggérer une différence non négligeable de la perméabilité membranaire. Par ailleurs, les mesures des capacités de phosphorylation et d'hydrolyse de l'ATP synthétase révèlent des capacités enzymatiques considérablement plus importantes dans les mitochondries à rendement énergétique élevé. Le complexe V semble être le site majeur à l'origine des changements du rendement énergétique dans les mitochondries hépatiques étudiées dans deux populations de grenouilles rousses.

David and Goliath: a mitochondrial coupling problem?

By

Salin Karine^{1*}, Roussel Damien¹, Rey Benjamin² and Voituron Yann¹

1. Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (U.M.R. CNRS 5023), Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 43 Bvd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

2. Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (U.M.R. CNRS 5558), Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 43 Bvd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

Running title: Mitochondrial efficiency and body size

* To whom correspondence should be addressed: karine.salin@univ-lyon1.fr; Tel: +33 4 72 43 15 20; Fax: +33 4 72 43 11 41.

SUMMARY

An organism's size, known to affect biological structures and processes from cellular metabolism to population dynamics, depends upon the duration and rate of growth. However, it is still poorly understood how mitochondrial function affects the energetic basis of growth, especially in ectotherms, which represent a huge majority of animal biodiversity. Here we present an intra-species comparison of neighboring populations of frogs (*Rana temporaria*) that have large differences in body mass even at the same age. By investigating liver mitochondrial bioenergetics, we find that frogs with high growth rates and large body sizes exhibit higher ATP synthesis rates and more efficient oxidative phosphorylation compared to the smaller frogs with low growth rates. This higher energy transduction efficiency is not associated with significant increased oxidative capacity or membrane potential values, but instead may rely on a higher mitochondrial phosphorylation system activity in combination with a lower inner membrane proton leakage. Overall, the present study introduces the mitochondrial energy transduction system as an important mechanism for balancing physiological and ecological trade-offs associated with body size. Our findings highlight the need for closer consideration of all aspects of mitochondrial metabolism for a better understanding of the physiological basis of the link between size, metabolism, and energy production in wild-dwelling organisms.

Keywords: frog, ectotherm, growth rate, mitochondria efficiency, oxidative phosphorylation.

INTRODUCTION

As William A. Calder (1984) stated, “there is no doubt that body size is a major factor in an animal’s life history and requirements”. Indeed, an organism’s size, which can range nearly two thousand-fold in vertebrates from the gecko *Sphaerodactylus ariasae* (16 mm long) to the blue whale *Balaenoptera musculus* (30 m long), affects the state of all of its biological structures and processes, from cellular metabolism up to population dynamics (Banavar et al., 2010; Peters and Wassenberg, 1983). As all biological activities depend on energy, a considerable effort for over 150 years has been put forth to document the relation between body size and energy metabolism. Respiratory metabolic rate (R) typically scales with body mass (M) according to the power function $R = aM^b$, where a is a normalization constant, and b is the scaling exponent, which is usually 0.75, though this is still under much debate (Banavar et al., 2010; West et al., 2003). Because of its link with energy metabolism, body size has a strong impact on whole body performances, such as tolerance to environmental variations such as temperature and food deprivation, and on physical capacities, such as running speed and diving performance (Schreer and Kovacs, 1997). At the subcellular level, studies performed mainly in endotherms have reported that inter-specific variation in body mass can be related to some aspects of mitochondrial bioenergetics, such as oxidative capacity and membrane proton leak activity (Brand et al., 2003; Drabkin, 1950; Kunkel et al., 1956; Porter and Brand, 1993). However, because mitochondrial bioenergetics are directly or indirectly involved in thermoregulatory processes, the constraint of thermoregulation in endotherms may induce a highly confounding effect on the relation between body size and mitochondrial function. Therefore, using ectotherms may be a more promising way to understand the causes and effects of the relation between body size and mitochondrial functioning.

From a physiological point of view, body size depends on two parameters: growth duration and growth rate, which are both genetically and hormonally controlled (Caldwell et al., 2005; Tissenbaum and Guarente, 2001). However, beyond such growth triggers, little is known about the mitochondrial energetic aspects of growth. Indeed, mitochondria are the cell's powerhouses, providing cells with energy in the form of ATP, which is then used to carry out diverse vital functions, including growth. It is surprising that only a few studies have focused on the impact of mitochondrial function on organismal growth, when this organelle might actually be the key to controlling the rate of growth. For

instance, recent studies in endotherms that focused on feed efficiency in poultry and livestock species have suggested that the mitochondrial metabolism phenotype might impact the rate of growth (Bottje and Carsten, 2009). Interestingly, a study focused on *C. elegans* clearly demonstrated that reducing the rates of oxygen consumption and ATP production induced a decrease in growth rate and body size (Dillin et al., 2002). From these examples, it appears that modifying mitochondrial activity, i.e., mitochondrial ATP production, can impact the rate of growth and, therefore, the body size of an organism.

Whether a mitochondrial phenotype can differentially evolve in the wild to cause variation in some biological traits (e.g., body size, growth rate) remains largely unexplored. To address this question, we examined the relation between mitochondrial bioenergetics and growth rate by comparing two neighboring populations of the common frog (*Rana temporaria*), which exhibit a large difference in body size at the same age (Augert and Joly, 1993). Working at the intra-specific level with closely located populations allowed us to exclude phylogenetic biases and latitudinal and/or altitudinal effects that could have altered the interpretation of our results (Garland et al., 2005; Yamahira and Conover, 2002). We investigated several key parameters of mitochondrial function, including oxygen consumption, cytochrome-c oxidase activity, membrane potential changes, ATP production and F₁F₀-ATP synthase activity. We clearly show that mitochondrial plasticity in the ATP production system is associated with natural differences in the growth rate and body size of this wild-dwelling ectotherm.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The common frog, *Rana temporaria* (Linnaeus, 1758), is widely distributed in Eurasia and inhabits an extensive range of habitats - from sea level to nearly 2500 m in some areas (Vences et al., 2003). Frogs were studied during the breeding period in two ponds located in Juraian Bresse between Lons-le-Saunier and Dôle (altitude 200-250 m). Frogs exhibiting a low growth rate (LGR, n=120) or a high growth rate (HGR, n=120) were collected from the Lorgevaux and Nubera sites, respectively, which are 10 km apart. Frogs were caught using bow nets set on the spawning sites. *Rana temporaria* is an explosive breeder with a spawning period of usually 7 days in March, and they were sampled in 2009. Only females were kept, weighed and measured from snout to urostyle. The second toe of the right forelimb of each animal was clipped for age determination following the skeletochronological method (Castanet and Smirina, 1990). Animals were maintained individually at 17-20 °C with a 12 h/12 h light/dark cycle and fed crickets once a week. The present investigation was carried out according to the ethical principles of the French Ministry of Agriculture, the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Scientific Purposes (Council of Europe, no. 123, Strasbourg), the French institutional animal care direction of veterinary services (DVS n°69266347) and ethic committee (approval ID: BH2010-09).

Isolation of liver mitochondria

In order to minimize potential confounding effects associated with the day of the experiment, precautions were taken to systematically experiment upon individuals from each frog population on the same day, using the same exact extraction protocol (same buffers, same protein assay and same apparatus). Animals were killed by decapitation and the liver was immediately dissected, weighed and placed in ice-cold isolation medium (250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, at 4°C). Mitochondria were isolated from two to five frogs per preparation with all steps at 4°C. The liver was cut up finely with sharp scissors and homogenized with a Potter-Elvehjem homogenizer (three passages). The

homogenate was centrifuged at 800×g for 10 minutes. The supernatant was collected, and the pellet was re-homogenized in ice-cold isolation buffer and centrifuged at 800×g for 10 minutes. Supernatants from the first and second centrifugations were pooled and centrifuged at 1,000×g for 10 minutes. The supernatant was collected, filtered through cheesecloth and centrifuged at 8,700×g for 10 minutes. The resulting mitochondrial pellet was washed three times by re-suspending in the isolation medium and was re-centrifuged at 8,700×g for 10 minutes. Finally, the pellet was stored in 100 µL of ice-cold isolation medium. The protein concentration was spectrophotometrically measured at 540 nm using the biuret method with bovine serum albumin as a standard. The frog mitochondrial preparations contained a dark pigment which absorbed at 540 nm so the absorbance of the same volume of mitochondria in water containing 0.6 % deoxycholate and 3% NaOH was subtracted.

Mitochondrial oxygen consumption and ATP synthesis rates

Oxygen consumption was measured with a Clark oxygen electrode (Rank Brother LTD) in a stirred and closed chamber with a volume of 250 µL and was thermostatically controlled at 20°C. Liver mitochondria were incubated in respiratory medium containing 120 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 20 mM glucose, 1.5 U/mL hexokinase, 0.3% of essentially free fatty acid bovine serum albumin and 3 mM HEPES adjusted to pH 7.4 at 20 °C and supplemented with 5 mM succinate and 5 µM rotenone. Mitochondrial ATP synthesis was followed by glucose-6-phosphate accumulation using an ADP-regenerating system (hexokinase plus glucose) and increasing concentrations of ADP, ranging from 5 µM to 100 µM. After recording the respiration rate for 6 minutes, four 60-µL aliquots of mitochondrial suspension were withdrawn from the chamber every two minutes and were immediately quenched in 40 µL of perchloric acid solution (10 % HClO₄ and 25 mM EDTA). After centrifugation of the denatured protein (15,000×g for 5 min), supernatants were neutralized with a KOH solution containing 0.2 M KOH and 0.3 M MOPS. The glucose-6-phosphate content of the samples was measured by spectrophotometry at 340 nm in an assay medium consisting of triethanolamine-HCl (50 mM), MgCl₂ (7.5 mM) and EDTA (3.75 mM) adjusted to pH 7.4 at room temperature, supplemented with NAD (0.5 mM) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.5 U) (Lang and Michal, 1974) .. The rate of mitochondrial ATP production was calculated from the slope of the linear accumulation of

glucose-6-phosphate over the sampling time interval (6 min). The linearity of glucose-6-phosphate accumulation allowed us to confirm that the system maintained a steady state. We ensured that the rates we measured were specific to mitochondrial ATP synthase activity by determining oxygen consumption and ATP synthesis rates in the presence of oligomycin (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Over the range of ADP concentration used, no oligomycin-insensitive ATP synthesis activity was measurable.

Mitochondrial membrane potential

Membrane potentials were measured using an electrode sensitive to the lipophilic cation tri-phenylmethylphosphonium (TPMP⁺) fitted to a 2 mL thermostatically controlled chamber (20 °C). Mitochondria (6 mg/mL) were incubated in the respiratory medium supplemented with 5 μM rotenone (see above). The TPMP⁺-sensitive electrode was calibrated with four sequential additions of 0.5 μM TPMP⁺. Succinate (5 mM) was added to start the reaction. Once mitochondria were energized, 500 μM ADP was added, followed by the addition of oligomycin (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and nigericin (60 ng/mL). Nigericin catalyzes the potassium/proton antiporter and sets the ΔpH to zero, which allows the whole proton motive force (Δp) to be expressed as electrical potential ($\Delta\psi$). This protocol allows us to calculate the ΔpH value as the difference between Δp and $\Delta\psi$ values. After each run, 5 μM FCCP was added to release TPMP⁺ for baseline correction. The kinetic response of the substrate oxidation to changes in membrane potential was further evaluated by carrying out titrations with submaximal concentrations of FCCP (from 100 to 500 nM) in the presence of 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oligomycin and 60 ng/mL nigericin (Brand, 1990). Membrane potentials were calculated as described by Brand (1995), and binding of TPMP⁺ to frog mitochondria was assumed to be 0.69 mg protein $\cdot\mu\text{L}^{-1}$, as in cane toad mitochondria (Brookes et al., 1998).

Mitochondrial F₁F₀-ATPase activity

Measuring the maximal mitochondrial rate of ATP hydrolysis into ADP provides a reliable method for determining the functional activity of the F₁F₀-ATPase and may be used as a proxy of the ATP generation capabilities of this complex. Mitochondria (0.5 mg/mL) that had been frozen and thawed were assayed for ATP hydrolysis. The assay medium contained 1 mM ATP, 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, and 2.5 mM MgCl₂ (pH 8). The ATP-regenerating

system (2 mM phosphoenol-pyruvate, 0.4 mM NADH, 20 units/mL pyruvate kinase, and 50 units/mL lactate dehydrogenase) supplemented with 10 μ M rotenone (to avoid NADH consumption by mitochondrial complex I) and 5 μ g/mL alamethicin (to release IF1 peptide) was present from the beginning (Venard et al., 2003). The NADH absorbance (340 nm) was continuously monitored in a stirred and thermostated cuvette (20 °C). After 2 minutes of incubation, the ATPase reaction was initiated by adding mitochondria into the cuvette and measured for 8 minutes.

Tissue and mitochondrial cytochrome c oxidase (COX) activities

For tissue COX activity, a small piece of frozen liver (approximately 10 mg) was homogenized with a mixer mill (60 Hz; 30 sec) (Retsch MM200; Fisher Bioblock Scientific) in a buffer containing 1 mM ATP, 50 mM HEPES, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, and 5 mM EGTA, pH 7.4. Thereafter, the same volume of buffer containing 10 mg/mL lubrol was added. Cytochrome c oxidase was determined polarographically at 20°C, with a Clark oxygen electrode (Rank Brother LTD), in 500 μ L of assay medium containing 30 μ M cytochrome c, 4 μ M rotenone, 0.5 mM 2,4-dinitrophenol, 10 mM sodium malonate, and 75 mM HEPES adjusted to pH 7.4 at 20°C. Then, 10 mM ascorbate, and 0.3 mM N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) were added to fully reduce the cytochrome c, and the maximal respiration rate associated with cytochrome c oxidase activity was recorded. Liver COX activity was expressed as μ mol O \cdot min⁻¹·g tissue⁻¹. Mitochondrial COX activity was determined polarographically *in vitro* by mitochondrial respiration rate in the presence of 10 mM antimycin, 5 mM ascorbate and 2 mM TMPD. Mitochondrial COX activity was expressed as nmol O \cdot min⁻¹·mg mitochondrial protein⁻¹.

Statistical analyses

The intra-species data were analyzed with Student's t-tests. The level of significance was $P < 0.05$. All data are presented as mean \pm SEM.

RESULTS

Animals

Three-year-old frogs from the large morph population weighed 86% more (HGR = 20.3 g \pm 0.8 and LGR = 10.9 g \pm 0.3, $P < 0.001$) and measured 17% longer (HGR = 67.4 mm \pm 0.9 and LGR = 57.8 mm \pm 0.6, $P < 0.001$) than age-matched small morph frogs.

Mitochondrial respiration and tissue oxidative capacity

Mitochondrial oxidative activities of liver mitochondria were not significantly different between the two morphs (Figure 1). The rates of basal non-phosphorylating (the lowest points to the left in Figure 1a) and maximal ADP-stimulated oxygen consumption (the highest points to the right in Figure 1a) were similar between HGR and LGR morphs. The maximal mitochondrial oxidative capacities, as measured by the oxygen consumption of cytochrome c oxidase (COX) in the presence of ascorbate and TMPD (Figure 1b), were not significantly different between frog morphs. Similarly, the two morphs exhibited equivalent liver cytochrome c oxidase activities ($7.3 \pm 0.4 \mu\text{mol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ and $6.6 \pm 0.4 \mu\text{mol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ for HGR and LGR morphs, respectively; $P=0.21$, $n = 19$ per group)..

Mitochondrial ATP synthesis and F_1F_0 -ATPase activity

To further investigate the oxidative phosphorylation process, we also assessed ATP synthesis at different steady-state rates of oxidative phosphorylation (Figure 2a). In contrast to the respiratory parameters reported above, ADP was more effective at stimulating ATP synthesis in HGR frogs compared to LGR animals (Figure 2a). Since oxidative phosphorylation depends on ATP synthase, we assessed the activity of this enzyme and found a significant difference between the two morphs; the mitochondria from HGR frogs hydrolyzed ATP 1.9 times faster than mitochondria from LGR frogs (Figure 2b; t-test $P < 0.05$).

Mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency

The mean maximal rate of ATP synthesis (the highest points to the right in Figure 2a) was 2.4-fold higher in liver mitochondria of the HGR morph than the LGR morph (t-test $P < 0.05$), whereas the mean maximal rate of oxygen consumption (the highest points to the right in Figure 1a) was not significantly different between the groups. Therefore, at maximal ATP synthesis rates, the oxidative phosphorylation efficiency, *i.e.*, the amount of ATP produced per oxygen atom consumed (ATP/O ratio), remained lower in the LGR morph compared to the HGR morph. This is further illustrated by the slope values of the linear regression between the rates of ATP synthesis and oxygen consumption shown in Figure 3, which are a measure of the efficiency (ATP/O) of mitochondrial oxidative phosphorylation. Hence, the value of the HGR morph mitochondria (0.96 ± 0.11) was significantly higher than that of the LGR morph mitochondria (0.55 ± 0.15), showing that for a given amount of oxygen consumed, the HGR morph mitochondria produced more ATP than the LGR morph mitochondria (Figure 3).

Mitochondrial membrane potential

Figure 4 reports the kinetic response of substrate oxidation activity to mitochondrial potential, which was changed by manipulating either the ATP synthesis capacity from state 3 (500 μM ADP) to resting state 4 respiration (5 $\mu\text{g/mL}$ oligomycin) (Figure 4a) or the proton leak with FCCP (Figure 4b). On the whole, the relations between oxygen consumption and membrane potential tended to be shifted down and to the left, suggesting that succinate was less efficiently oxidized by LGR mitochondria compared with HGR mitochondria (Brand, 1990). However, statistical analysis of the curves (*i.e.* the slope of the relation in Figure 4a, and the initial slope of the titration in Figure 4b) indicates that the substrate oxidation activity of LGR mitochondria was not significantly different from that of HGR mitochondria ($P = 0.69$ and $P = 0.44$, respectively). Further, in Figure 4a, the electrical component of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$, recorded in the absence of nigericin) was not significantly different between frog populations at both the phosphorylating state (state 3, ADP present) and basal non-phosphorylating state (state 4, oligomycin present). In Figure 4b, the whole proton motive force (Δp), as measured at the basal non-phosphorylating state (state 4) in the presence of nigericin (the lowest point to the right in the linear relation) was also not significantly different between mitochondrial populations. From the membrane potential values measured with and without nigericin present, we calculated $\Delta p\text{H}$ at state 4 (see “Experimental” section)

and found no difference between LGR and HGR frogs (8 ± 1 mV and 9 ± 1 mV, respectively).

DISCUSSION

The present data shows a correlative association between the size and weight of wild frogs and the performance of their mitochondria. Compared to the LGR morph, HGR frogs produced more ATP for a given amount of consumed oxygen, indicating that their mitochondria are set to powerfully produce ATP, thereby optimizing energy production for cellular processes. This bioenergetic characteristic may allow the HGR morph to produce enough ATP to enable a simultaneous investment in growth and reproduction. In contrast, the smaller morph has evolved to produce ATP less efficiently, an alternative strategy that constrains the frog to reproduce at the expense of annual growth (Augert and Joly, 1993; Joly, 1991; Sinsch et al., 2007). Together with data from the literature (Robert and Bronikowski, 2010), the present study suggests that an alteration in the mitochondrial energy transduction system may affect trade-offs between physiological functions, such as growth and reproduction, even at the intra-specific level.

From a methodological point of view, the fact that ATP/O values of liver mitochondria reported here in common frogs are lower than the calculated theoretical values of 1.6 for succinate oxidation in beef heart mitochondria (Watt et al., 2010) might raise some methodological concerns about our mitochondrial preparations. However, the reported frogs' values are similar to the ATP/O values reported in liver mitochondria from garter snakes (Robert and Bronikowski, 2010). Another concern about the present data is the apparent low protein specific respiratory rates of frog liver mitochondria compared with similar published data, i.e. liver mitochondria from amphibians' species (Emel'yanova et al., 2007; Hulbert et al., 2006). There are two main parameters that might explain the present low respiration rates. Firstly, the time of capture in the year as it has been found that the rate of liver mitochondrial respiration can be more than 2 fold greater in frog caught in spring than in summer (Emel'yanova et al., 2007). In the present study, frogs were caught in March, suggesting that our mitochondrial parameters should be in the lower range of seasonal variation. Secondly, the thermal condition of respiratory measures (20°C in the present study versus 25°C or 37°C in the above mentioned articles). In this context, if we assumed a Q10 of 2.4-2.7 to estimate the rates of mitochondrial respiration at 37°C (Chamberlin, 2004) then our data (state 3: 15-19 nmol O/min.mg of protein) become not that different from the reported values of 25-26 nmol O/min.mg of protein (Emel'yanova et al., 2007; Hulbert et al., 2006). Finally, the magnitude of the respiratory control ratio (RCR), calculated as the ratio of state 3 (i.e. in the

presence of ADP) to basal non-phosphorylating (state 4) rates of respiration (data from Figures 3 and 4a), indicates well-functioning mitochondria (mean RCR = 4.3 ± 0.5). In the present study, RCR were not significantly different between LGR (3.8 ± 0.6) and HGR (4.6 ± 0.6) morphs, and mean RCR for both morphs falls within the range of values previously published for ectothermics liver mitochondria respiring on succinate (from 3.4 to 5.8, Akhmerov, 1986; Brand et al., 1991; Hulbert et al., 2002, 2006; Robert and Bronikowski, 2010). Thus, the mitochondria used in this study compares favorably with the best prepared by other workers in similar ectotherm species.

From a biochemical point of view, we would next discuss the potential non exclusive mechanisms that might down-regulate the mitochondrial ATP efficiency in LGR frogs. Mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency can be altered: i) at the level of the oxidative chain by modifying the activity and/or the intrinsic coupling between proton and electron fluxes, i.e., slips in proton pumps; ii) by affecting the mitochondrial inner membrane proton conductance; and iii) at the level of ATP synthase by altering the activity and/or the coupling between proton flux and ATP production.

Slip reactions in the mitochondrial respiratory complexes describe the mechanisms by which electrons can pass through a proton pump in the absence of proton movement, leading to a flexible H^+/O ratio (Murphy and Brand, 1988). The occurrence of slipping processes is markedly dependent on temperature, being predominant at low temperatures, i.e. below 25°C (Canton et al., 1995), and negligible at 37°C (Brand et al., 1994; Canton et al., 1995). This characteristic suggests that slip reactions might be of physiological importance in ectothermic animals, including the presently studied common frogs. It is generally accepted that slip reactions involved in energy conversion are only evident for cytochrome c oxidase (Murphy and Brand, 1988; Papa et al., 1991). In addition, a causal relation seems to exist between the amount or activity of cytochrome c oxidase and the overall ATP synthesis yield (Groen et al., 1990; Nogueira et al., 2001). Accordingly, if the higher oxidative phosphorylation efficiency of HGR frogs resulted from slip reactions, then a decrease in cytochrome c oxidase activity should be expected (Clerc et al., 2007; Nogueira et al., 2001). In the present study, the rate of cytochrome c oxidase activity was not different between the HGR and LGR morphs. Therefore, these results rule out slip reactions, i.e., a change in efficiency at the level of the respiratory chain (H^+/O), as a causal mechanism to explain the mitochondrial ATP/O ratio plasticity in these common frog morphs. Difference in the activity of oxidative phosphorylation might also simply result from variation in the activity of substrate oxidation

pathway, including the respiratory chain, dehydrogenases and translocases. Indeed, a lower substrate oxidation rate would lead to a lower proton motive force and subsequently a decrease in the ATP production. This was tested for (see Figure 4) and a slight, but not statistically significant 15% decrease in the succinate oxidation rate was noted in LGR frogs compared with HGR animals. On the whole, it therefore appears that neither the activity of substrate oxidation nor the intrinsic coupling (H^+/e^-) of the respiratory chain were major determinants to explain the difference of mitochondrial efficiency between frogs.

Alternatively, mitochondrial inefficiency may result from a proton leak across the inner membrane, which is a phenomenon that consumes the proton motive force (Δp) at the expense of ATP synthesis, increasing mitochondrial oxygen consumption and lowering the coupling efficiency. Although scarce, there is some evidence suggesting that a high mitochondrial proton leak would cause animals to be small (Drabkin, 1950; Tissenbaum and Guarente, 2001) and grow slowly (Clapham et al., 2000; Couplan et al., 2002). The first set of evidence is the inter-specific allometric relationship between body mass and mitochondrial proton leak intensity in endotherms (Porter and Brand, 1993; Brand et al., 2003), suggesting that the heaviest endotherm would have the highest mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency by virtue of its low mitochondrial proton conductance. Such dependence of mitochondrial proton leak on body mass is however not evident in ectotherms (Hulbert et al., 2002). The second set of evidence is from transgenic mice overexpressing uncoupling proteins that exhibit a deficit in their growth rate (Clapham et al., 2000; Couplan et al., 2002). From these data, it is not difficult to envision proton leak reactions as an explanatory mechanism of phenotypic differences. At the mitochondrial level, increased inner membrane proton permeability is expected to decrease ATP synthesis rates in association with a decrease in proton motive forces and an increase in respiration rate. In addition, an increased proton conductance should have shifted the linear relation between oxygen consumption and ATP synthesis (Figure 3) to the left, with little effect on the slope and a significant increase in basal non-phosphorylating respiration (Beavis and Lehninger, 1986; Clerc et al., 2007), which is clearly not the case in the present study. However, given that proton leak increases exponentially with increasing membrane potential, the slight 5% decrease in the proton motive force of LGR mitochondria (Figure 4) could well induce a significant up to 60% increase in the mitochondrial proton conductance (Roussel et al., 2003; Johnson et al., 2006). The straightforward way to determine the activity of the proton leak is to titrate respiration rate and membrane potential with an inhibitor of the substrate oxidation pathway (Nicholls,

1974). In the absence of such data set, an indirect method to estimate the proton leakage pathway is to titrate basal non-phosphorylating respiration, i.e. in the presence of oligomycin, with an uncoupler (Groen et al., 1982). In this method, the extrapolation of the linear relation between respiration rate and uncoupler concentrations to zero respiration gives an amount of uncoupler which would be equivalent to the passive permeability of the mitochondrial membrane to protons (Groen et al., 1982). As far as our study is concerned, such uncoupler values can be retrieved from Figure 4b, where the amount of FCCP was 40% higher in LGR (283 ± 39 nM) than in HGR frogs (201 ± 32 nM), but the difference did not reach statistical significance ($P=0.13$). Hence, we can not completely rule out the possibility that mitochondrial membrane proton leakage might substantially contribute to intra-specific variability in the mitochondrial efficiency.

The third mechanism by which oxidative phosphorylation efficiency could be affected is a change in efficiency and activity at the level of ATP synthase. It has been previously shown that almitrine, a drug that can decrease the mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency (ATP/O ratio), increases the apparent H^+ /ATP ratio of ATP synthase (Rigoulet et al., 1990), an effect that ultimately inhibited the growth rate in yeast (Rigoulet et al., 1989). These experiments also pointed out that almitrine-induced intrinsic uncoupling of the ATP synthase decreased the rate of ATP synthesis without any effect on either the proton-motive force or the mitochondrial respiration rate (Rigoulet et al., 1989; 1990). In line with these expected effects, the loosely coupled mitochondria in the LGR morph exhibited lower ATP synthesis rate and F_1F_0 -ATPase activity, while oxidative capacities and inner membrane proton-motive forces remained statistically similar to those of HGR mitochondria. Additionally, at a high concentration of ADP, our data show that LGR mitochondria consume the same magnitude of the proton-motive force (41 ± 3 mV on average, Figure 4a) as HGR but produce significantly less ATP (Figure 2a). This result suggests that the lower mitochondrial efficiency in the LGR morph might result from a proton slip in their mitochondrial ATP synthase. Although this point required further experimental testing to be demonstrated, it clearly appears that functional differences in the phosphorylation system of liver mitochondria, which includes the ATP synthase, the adenine nucleotide and phosphate translocases, explained part of the intra-specific differences in the mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in common frogs observed in our study.

In conclusion, the present study shows that plasticity in mitochondrial efficiency correlates with intra-specific variation in body mass in natural populations of common frogs.

It can be inferred from the results herein that most of the phenotypic difference in the mitochondrial efficiency would be explained by functional differences in the activities of proton leak and phosphorylation systems. Whether phenotype differences in mitochondrial function result from local ecological constraints or reflect a natural genetic variability within wild populations of common frogs remains an open question. Our findings, together with previous works in wild snake (Robert and Bronikowski, 2010) and other ectothermic organisms (Copeland et al., 2009; Dillin et al., 2002), reinforce the idea that mitochondrial properties may underpin the life history of organisms, as they not only constrain growth and reproductive traits but ultimately also impact the evolution of survival and life span (Brand, 2000).

ACKNOWLEDGMENTS

We are particularly indebted to Bruno Zagrodnik, aquaculturist, for his collaboration in this work. We thank Odile Grolet for her technical assistance. We acknowledge Francis Haraux, Michel Rigoulet and Hilary Lease for their advice. K. Salin was in receipt of fellowships from the French ministry of research and education.

REFERENCES

- Akhmerov, R. N.** (1986). Qualitative difference in mitochondria of endothermic and ectothermic animals. *Febs Letters* **198**, 251-255.
- Augert, D. and Joly, P.** (1993). Plasticity of age at maturity between 2 neighboring populations of the common frog (*Rana temporaria*). *Canadian Journal of Zoology* **71**, 26-33.
- Banavar, J. R., Moses, M. E., Brown, J. H., Damuth, J., Rinaldo, A., Sibly, R. M. and Maritan, A.** (2010). A general basis for quarter power scaling in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 15816-15820.
- Beavis, A. D. and Lehninger, A. L.** (1986). The upper and lower limits of the mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation stoichiometry of oxidative phosphorylation. *European Journal of Biochemistry* **158**, 315-322.
- Bottje, W. G. and Carstens, G. E.** (2009). Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. *Journal of Animal Science* **87**, E48-E63.
- Brand, M. D.** (1990). The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1018**, 128-133.
- Brand, M. D.** (1995). Bioenergetics, A practical approach, eds. G. C. Brown and C. E. Cooper): IRL Press, Oxford.
- Brand, M. D.** (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology* **35**, 811-820.
- Brand, M. D., Chien, L. F. and Dioletz, P.** (1994). Experimental discrimination between proton leak and redox slip during mitochondrial electron transport. *Biochemical Journal* **297**, 27-29.
- Brand, M. D., Couture, P., Else, P. L., Withers, K. W. and Hulbert, A. J.** (1991). Evolution of energy metabolism proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in a mammal than in a reptile. *Biochemical Journal* **275**, 81-86.
- Brand, M. D., Turner, N., Ocloo, A., Else, P. L. and Hulbert, A. J.** (2003). Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochemical Journal* **376**, 741-748.
- Brookes, P. S., Buckingham, J. A., Tenreiro, A. M., Hulbert, A. J. and Brand, M. D.** (1998). The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: Correlations with standard

metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **119**, 325-334.

Calder, W. A. (1984). *Size, Function, and Life History*: Harvard university press.

Caldwell, P. E., Walkiewicz, M. and Stern, M. (2005). RAS activity in the *Drosophila* prothoracic gland regulates body size and developmental rate via ecdysone release. *Current Biology* **15**, 1785-1795.

Canton, M., Luvisetto, S., Schmehl, I. and Azzone, G. F. (1995). The nature of mitochondrial respiration and discrimination between membrane and pump properties. *Biochemical Journal* **310**, 477-481.

Castanet, J. and Smirina, E. (1990). Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. *Annales Des Sciences Naturelles-Zoologie Et Biologie Animale* **11**, 191-196.

Chamberlin, M.E. (2004). Top-down control analysis of the effect of temperature on ectotherm oxidative phosphorylation. *American Journal of Physiology* **287**, R794-R800.

Clapham, J. C., Arch, J. R. S., Chapman, H., Haynes, A., Lister, C., Moore, G. B. T., Piercy, V., Carter, S. A., Lehner, I., Smith, S. A. et al. (2000). Mice overexpressing human uncoupling protein 3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* **406**, 415-418.

Clerc, P., Rigoulet, M., Leverve, X. and Fontaine, E. (2007). Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **39**, 158-166.

Copeland, J. M., Cho, J., Lo, T., Hur, J. H., Bahadorani, S., Arabyan, T., Rabie, J., Soh, J. and Walker, D. W. (2009). Extension of *Drosophila* life span by rna of the mitochondrial respiratory chain. *Current Biology* **19**, 1591-1598.

Couplan, E., Gelly, C., Gubern, M., Fleury, C., Quesson, B., Silberberg, M., Thiaudiere, E., Mateo, P., Lonchamp, M., Levens, N. et al. (2002). High level of uncoupling protein 1 expression in muscle of transgenic mice selectively affects muscles at rest and decreases their IIb fiber content. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 43079-43088.

Dillin, A., Hsu, A. L., Arantes-Oliveira, N. A., Lehrer-Graiwer, J., Hsin, H., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J. and Kenyon, C. (2002). Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science* **298**, 2398-2401.

Drabkin, D. L. (1950). The distribution of the chromoproteins, hemoglobin, myoglobin, and cytochrome c, in the tissues of different species, and the relationship of the

total content of each chromoprotein to body mass. *Journal of Biological Chemistry* **182**, 317-333.

Emel'yanova, L.V., Savina, M.V., Belyaeva, E.A. and Brailovskaya, I.V. (2007). Peculiarities of functioning of liver mitochondria of the river Lamprey *Lampetra fluviatilis* and the common frog *Rana temporaria* at periods of suppression and activation of energy metabolism. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* **43**, 564-572.

Garland, T., Bennett, A. F. and Rezende, E. L. (2005). Phylogenetic approaches in comparative physiology. *Journal of Experimental Biology* **208**, 3015-3035.

Groen, A. K., Wanders, R. J. A., Westerhoff, H. V., Vandermeer, R. and Tager, J. M. (1982). Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 2754-2757.

Groen, B. H., Berden, J. A. and Vandam, K. (1990). Differentiation between leaks and slips in oxidative phosphorylation. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1019**, 121-127.

Hulbert, A. J., Else, P. L., Manolis, S. C. and Brand, M. D. (2002). Proton leak in hepatocytes and liver mitochondria from Archosaurs (crocodiles) and allometric relationships for ectotherms. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **172**, 387-397.

Hulbert, A.J., Turner, N., Hinde, J., Else, P. and Guderley, H. (2006). How might you compare mitochondria from different tissues and different species? *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **176**, 93-105.

Johnson, G., Roussel, D., Dumas, J.F., Douay, O., Malthièry, Y., Simard, G. and Ritz, P. (2006). Influence of intensity of food restriction on skeletal muscle mitochondrial energy metabolism in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **291**, E460-E467.

Joly, P. (1991). Variation in size and fecundity between neighbouring populations in the common frog, *Rana temporaria*. *Alytes* **9**, 79-88.

Kunkel, H. O., Spalding, J. F., Defranciscis, G. and Futrell, M. F. (1956). Cytochrome oxidase activity and body weight in rats and in 3 species of large animals. *American Journal of Physiology* **186**, 203-206.

Land, G. and Michal, G. (1974). D-Glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate. In *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. H.U. Bergmeyer), pp. 1238-1242. New York: Academic Press.

Murphy, M. P. and Brand, M. D. (1988). The stoichiometry of charge translocation by cytochrome oxidase and the cytochrome bc₁ complex of mitochondria at high membrane potential. *European Journal of Biochemistry* **173**, 645-651.

Nicholls, D. G. (1974). Influence of respiration and ATP hydrolysis on proton-electrochemical gradient across inner membrane of rat liver mitochondria as determined by ion distribution. *European Journal of Biochemistry* **50**, 305-315.

Nogueira, V., Rigoulet, M., Piquet, M. A., Devin, A., Fontaine, E. and Leverve, X. M. (2001). Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 46104-46110.

Papa, S., Capitanio, N., Capitanio, G., Denitto, E. and Minuto, M. (1991). The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H⁺/e⁻ stoichiometry. *Febs Letters* **288**, 183-186.

Peters, R. H. and Wassenberg, K. (1983). The effect of body size on animal abundance. *Oecologia* **60**, 89-96.

Porter, R. K. and Brand, M. D. (1993). Body mass dependence of H⁺ leak in mitochondria and its relevance to metabolic rate. *Nature* **362**, 628-630.

Rigoulet, M., Fraisse, L., Ouhabi, R., Guerin, B., Fontaine, E. and Leverve, X. (1990). Flux-dependent increase in the stoichiometry of charge translocation by mitochondrial ATPase ATP synthase induced by almitrine. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1018**, 91-97.

Rigoulet, M., Ouhabi, R., Leverve, X., Putodparamelle, F. and Guerin, B. (1989). Almitrine, a new kind of energy transduction inhibitor acting on mitochondrial ATP synthase. *Biochimica Et Biophysica Acta* **975**, 325-329.

Robert, K. A. and Bronikowski, A. M. (2010). Evolution of senescence in nature: physiological evolution in populations of garter snake with divergent life histories. *American Naturalist* **175**, E47-159.

Roussel, D., Dumas, J. F., Augeraud, A., Douay, O., Foussard, F., Malthiery, Y., Simard, G. and Ritz, P. (2003). Dexamethasone treatment specifically increases the basal proton conductance of rat liver mitochondria. *Febs Letters* **541**, 75-79.

Schreer, J. F. and Kovacs, K. M. (1997). Allometry of diving capacity in air breathing vertebrates. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **75**, 339-358.

Sinsch, U., Leskovar, C., Drobig, A., König, A. and Grosse, W. R. (2007). Life history traits in green toad (*Bufo viridis*) populations: indicators of habitat quality. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **85**, 665-673.

Tissenbaum, H. A. and Guarente, L. (2001). Increased dosage of a Sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**, 227-230.

Venard, R., Brethes, D., Giraud, M. F., Vaillier, J., Velours, J. and Haraux, F. (2003). Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase. *Biochemistry* **42**, 7626-7636.

Vences, M., Grossenbacher, K., Puente, M., Palanca, A. and Vieites, D. R. (2003). The Cambales fairy tale: elevational limits of *Rana temporaria* (Amphibia : Ranidae) and other European amphibians revisited. *Folia Zoologica* **52**, 189-202.

Watt, I. N., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Leslie, A. G. W. and Walker, J. E. (2010). Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16823-16827.

West, G. B., Savage, V. M., Gillooly, J., Enquist, B. J., Woodruff, W. H. and Brown, J. H. (2003). Why does metabolic rate scale with body size? *Nature* **421**, 713-713.

Yamahira, K. and Conover, D. O. (2002). Intra vs. interspecific latitudinal variation in growth: Adaptation to temperature or seasonality? *Ecology* **83**, 1252-1262.

FIGURE LEGENDS.**Figure 1. Respiration rate and cytochrome-c oxidase activity.**

Data are presented as means \pm SEM; $n = 11$ and $n = 8$ independent mitochondrial preparations for High growth rate (open circles, HGR) and Low growth rate frogs (black triangles, LGR), respectively. The experimental conditions are described in *Experimental*. **Panel A:** Oxygen consumption was titrated by addition of increasing concentrations of ADP (from 5 to 100 μ M). **Panel B:** Cytochrome-c oxidase activity was measured in mitochondria respiring on 4mM ascorbate/0.5mM TMPD in the presence of 3 μ M myxothiazol, 2 μ M FCCP and 5 μ g/mL oligomycin. Assays were performed at 20°C.

Figure 2. ATP synthesis rate and F₁F₀-ATPase activity.

Data are presented as means \pm SEM; $n = 11$ and $n = 8$ independent mitochondrial preparations for High growth rate (open circles, HGR) and Low growth rate (black triangles, LGR) frogs, respectively. *, significant difference from the high growth rate frogs ($P < 0.05$). The experimental conditions are described in *Experimental*. **Panel A:** ATP synthesis were titrated by addition of increasing concentrations of ADP (from 5 to 100 μ M). **Panel B:** Mitochondrial F₁F₀-ATPase activity was measured in frozen/thawed mitochondria incubated in assay medium (pH 8) supplemented with 10 μ M rotenone, 5 μ g/alamethicin and an ATP-regenerating system (2 mM phosphoenol-pyruvate, 0.4 mM NADH, 20 U/mL pyruvate kinase and 50 U/mL lactate dehydrogenase). The reaction was initiated with 1 mM ATP and measured by continuously monitoring NADH absorbance at 340 nm. Assays were performed at 20°C.

Figure 3. Oxidative phosphorylation efficiency.

Data are presented as means \pm SEM; $n = 11$ and $n = 8$ independent mitochondrial preparations for High growth rate (open circles) and Low growth rate (black triangles) frogs, respectively. The experimental conditions are described in *Experimental*. Mitochondria were incubated in respiratory medium supplemented with 5 mM succinate, 5 μ M rotenone, 20 mM glucose, 1.5 U/mL hexokinase. Oxygen consumption and ATP synthesis were measured at different concentrations of ADP, ranging from 5 to 100 μ M. Assays were performed at 20°C.

Figure 4. Kinetic response of substrate oxidation activity to membrane potential.

Oxygen consumption rate and membrane potential were measured at 20°C in liver mitochondria respiring on 5 mM succinate from high growth rate (open circle; n=7) or low growth rate (black triangles; n=6) common frogs. Substrate oxidation kinetics were completed with succinate and 500 μ M ADP in the absence or in the presence of 5 μ g/mL oligomycin (**A**) or with succinate and oligomycin and titrated with submaximal concentration of FCCP (**B**). State 3, ADP-stimulated respiration measured in the presence of 500 μ M ADP; state 4, basal non-phosphorylating respiration measured in the presence of 5 μ g/mL oligomycin.

Figure 1

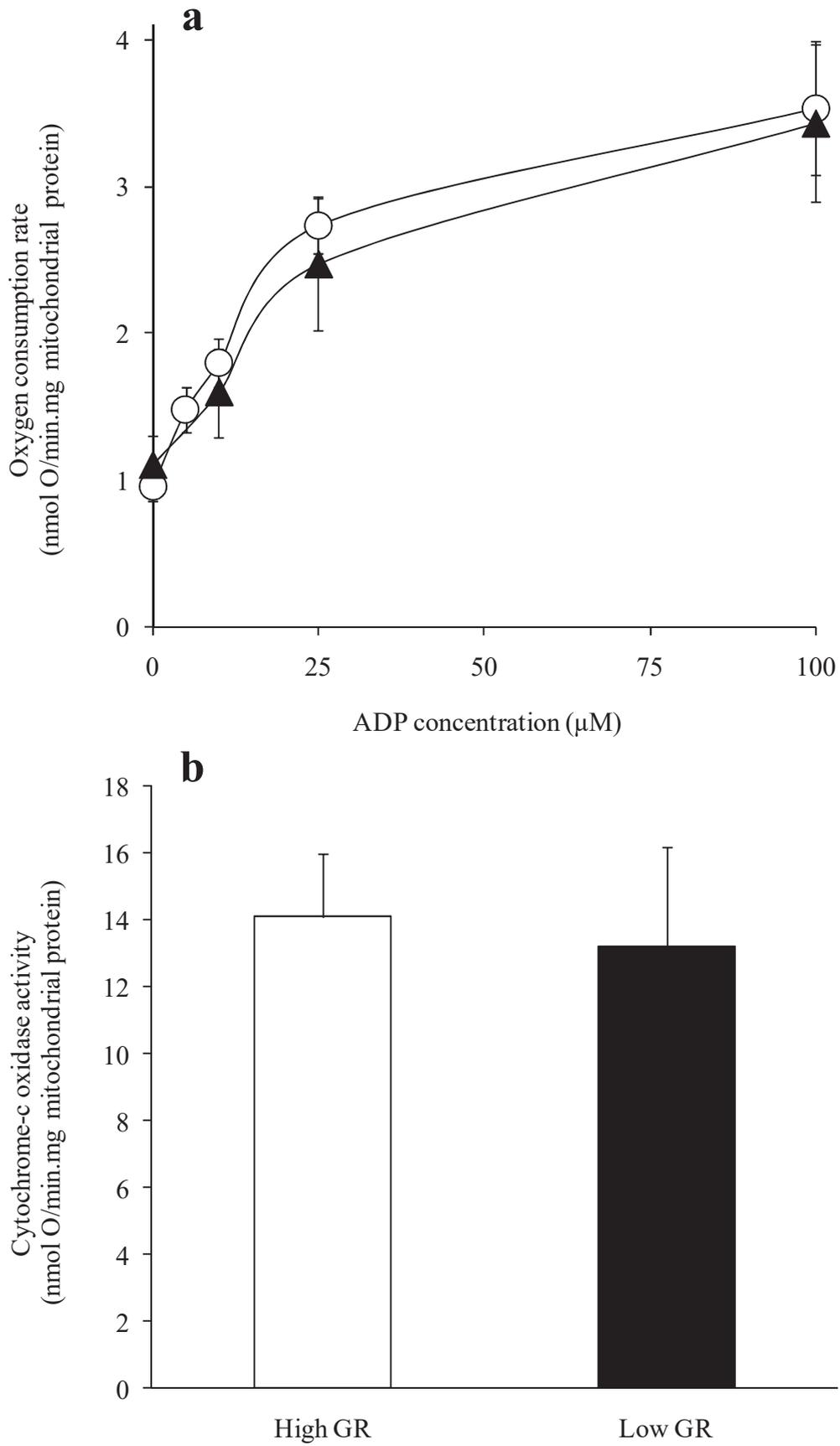


Figure 2

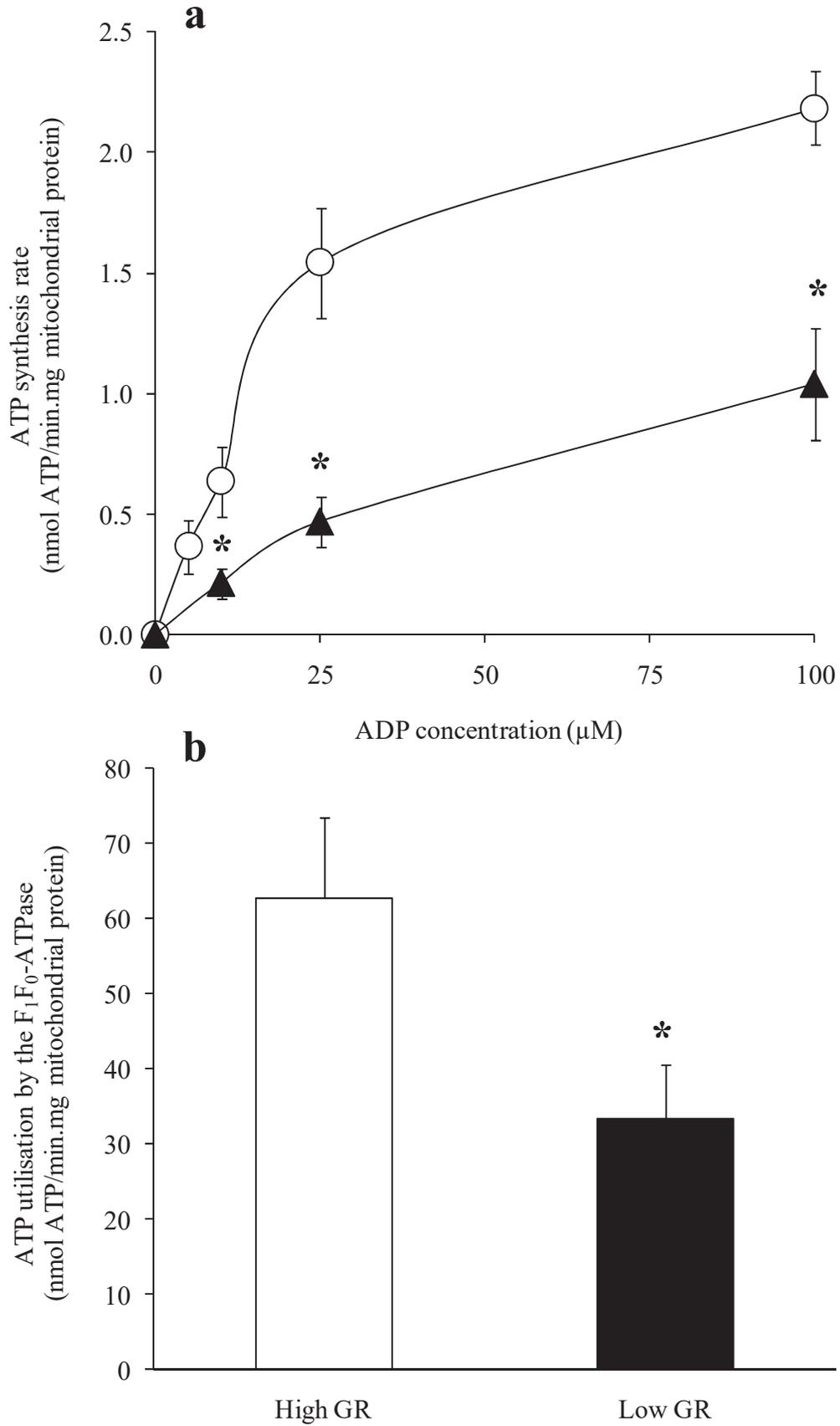


Figure 3

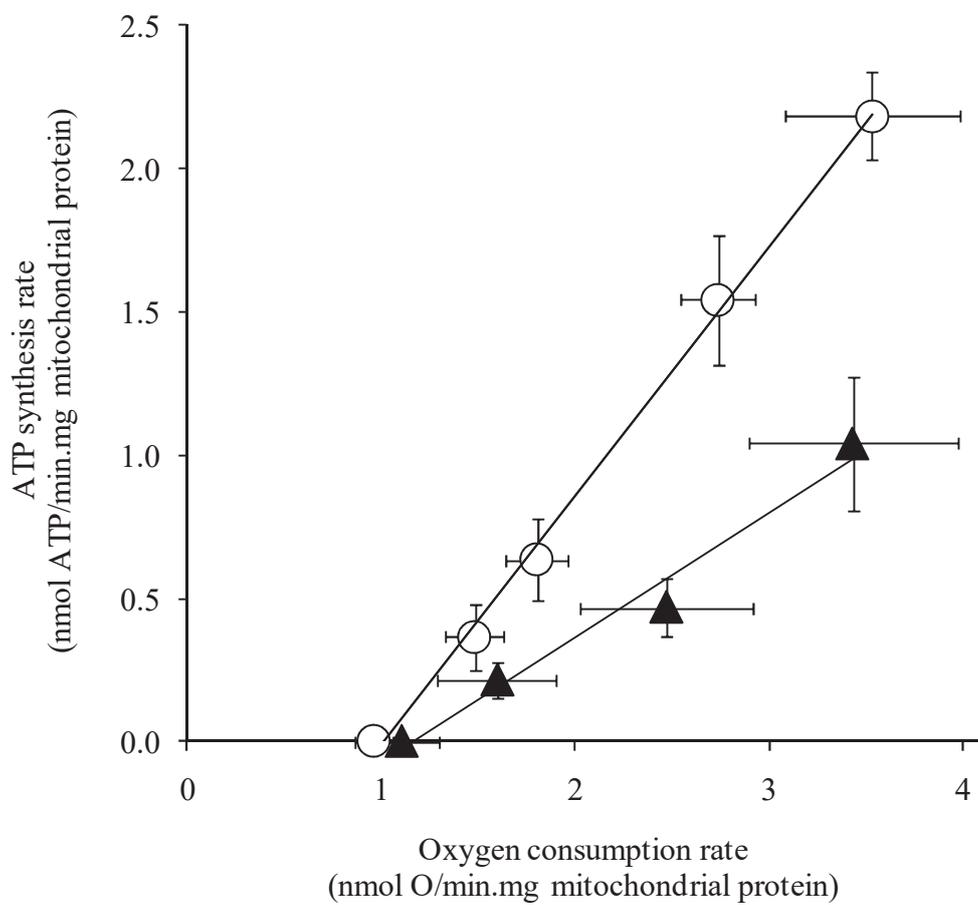
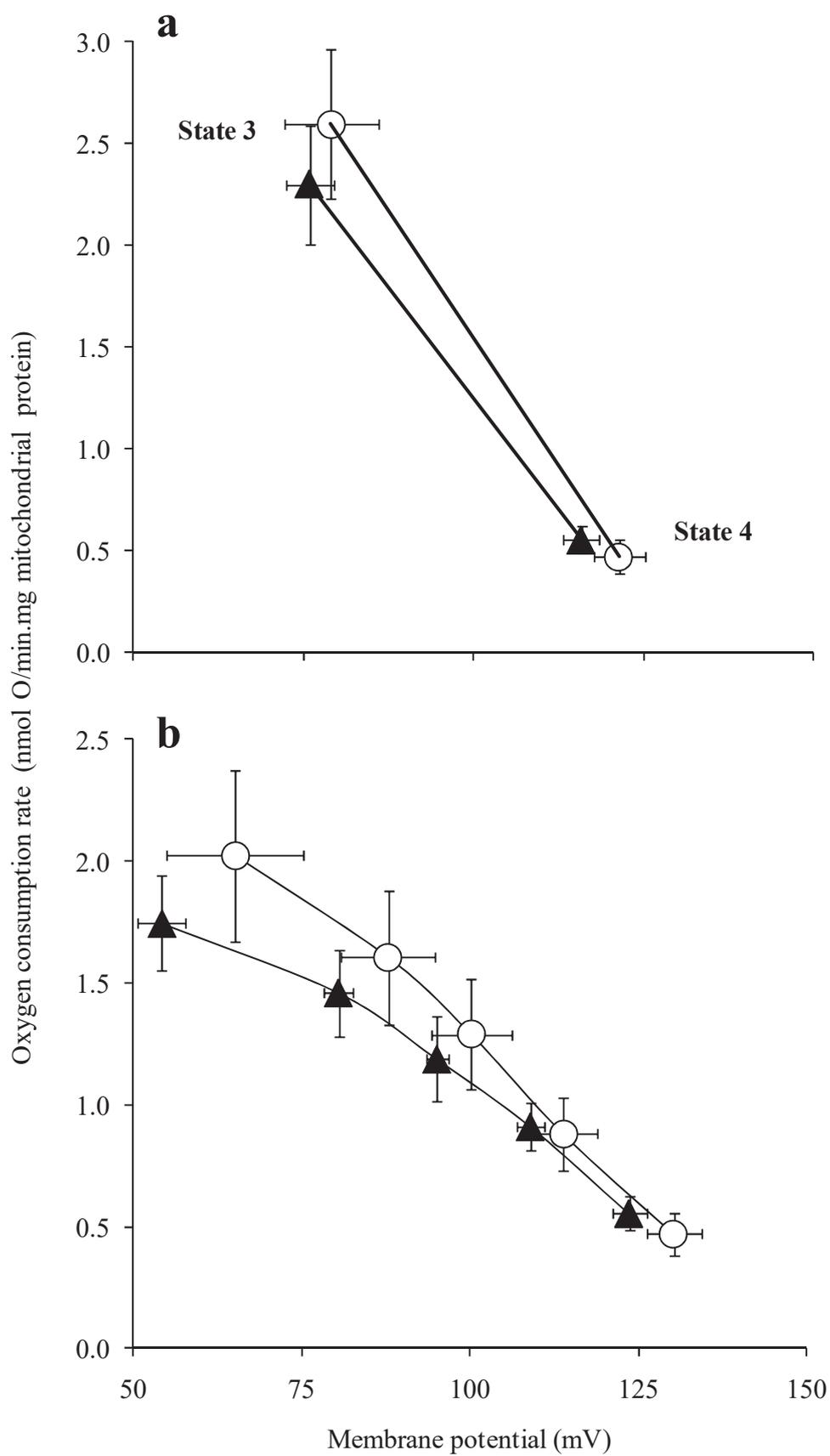


Figure 4



2 Impacts des modifications du fonctionnement mitochondrial sur la croissance et le développement larvaire des têtards de grenouilles rousses. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Le second volet de la thèse aborde la problématique par une approche expérimentale : des modifications du fonctionnement mitochondrial induisent-elles un changement dans les traits d'histoire de vie des organismes ? Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé le 2,4-dinitrophenol (2,4-dNP), molécule qui augmente la perméabilité de la membrane interne de la mitochondrie. Cet outil nous a permis de moduler le fonctionnement mitochondrial pour mieux comprendre son impact sur les performances des têtards de grenouilles rousses *Rana temporaria*.

2.1 Choix de la molécule

Nous avons utilisé le 2,4-dinitrophenol, molécule largement décrite par le département américain du service santé et humain (1995). Nous connaissons sa demie vie dans l'eau (500 jours), ses modes d'absorption sur le vivant, et son action sur l'organisme, plus particulièrement sur la mitochondrie (Wallace & Starkov, 2000 ; Nogueira et al., 2001). Les dinitrophénols sont des composés chimiques de synthèse qui ne se retrouvent pas dans la nature. Au sein de la famille des dinitrophénols, les effets sur les organismes vivants du 2,4-dNP ont été les plus décrits grâce à sa commercialisation ; en effet, le 2,4-dNP a d'abord été utilisé comme colorant alimentaire (de couleur jaune) jusqu'à ce que ses vertus amaigrissantes soient découvertes. Le 2,4-dNP a alors été largement utilisé au États-Unis dans les années 1930 pour accroître l'activité métabolique de patients obèses et générer des pertes de poids. C'est seulement plus tard que le mécanisme d'action du 2,4-dNP a été étudié : c'est un découplant qui accroît de manière sélective la perméabilité de la membrane interne aux protons, par un mécanisme de translocation des protons (Starkov, 1997 ; Wallace et Starkov, 2000 ; Harper et al., 2001). Ce type de composé est appelé protonophore et son action augmente la fuite de proton, ce qui diminue la force protomotrice, générant ainsi un découplage mitochondrial. La dissipation du potentiel de membrane induit deux effets

recherchés dans notre étude, à la fois une diminution de l'efficacité mitochondriale mais aussi une réduction de la production de radicaux libres.

Ainsi, en changeant la contrainte radicalaire et l'efficacité de la mitochondrie à produire de l'énergie de manière chronique, quelles seront les réponses mises en place par l'organisme :

- 1- au niveau de la balance oxydative ?
- 2- au niveau des flux d'énergie ?

1- La présence de dNP devrait permettre une diminution de la production de ROS (Okuda et al., 1992 ; Padalko, 2005 ; Batandier et al., 2006 ; da Silva et al., 2008). De manière chronique, la balance oxydative est régulée à un niveau basal pour maintenir l'homéostasie cellulaire (Finkel et Holbrook ; 2000 ; Balaban et al., 2005). On peut alors se demander si la diminution de production de ROS va entraîner i) une diminution de l'investissement dans les défenses anti-oxydantes et/ou ii) une diminution du taux de dégâts oxydatifs.

2- Le dNP est aussi une molécule qui va découpler les oxydations des phosphorylations. Les études *in vivo* et *in vitro* ont montré une stimulation du métabolisme au niveau des mitochondries, des cellules, des tissus et même des organismes traités au dNP (Agency for toxicology substances and diseases, 1995 ; Sibille et al., 1995 ; Harper et al., 2001 ; Barros et al., 2004 ; Padalko, 2005 ; Desquiret et al., 2006).

2.2 Choix du modèle

L'objectif de l'expérience étant d'observer des changements des valeurs des traits d'histoire de vie en réponse aux modifications mitochondriales, les choix du modèle biologique et des traits considérés sont donc primordiaux dans ce type d'étude. Dans ce contexte, les larves d'amphibiens représentent un très bon modèle d'étude. En effet, leur mode de vie aquatique implique que les têtards soient exposés de manière chronique au dNP. Cela permet de soumettre les organismes à des concentrations de dNP constantes et connues tout au long de l'expérimentation.

De plus, les têtards constituent un bon modèle biologique pour l'étude de la plasticité développementale. Par exemple, un signal chimique émis par un prédateur ou des congénères blessés induit des modifications majeures sur le développement des larves dans un large éventail de taxons d'anoures (Summey et Mathis 1998 ; Spieler et Linsenmair 1999, Eklöv et Halvarsson, 2000). Dans des conditions plus artificielles, par exemple lors d'expositions à des polluants, des modifications des performances larvaires ainsi qu'une susceptibilité accrue aux autres facteurs stressants ont été mis en évidence chez les têtards (Edwards et al., 2006 ; Mandrillon et Saglio, 2007, 2009 ; Peterson et al., 2009 ; Ortiz-Santaliestra et al., 2011). Différents traits sont affectés en condition de stress, notamment la forme du corps, les niveaux d'activité, la prise alimentaire, la croissance et la durée de vie larvaire avant la métamorphose (Hews 1988 ; Horat et Semlitsch 1994 ; Denver, 1997 ; Fraker, 2008 ; Steiner et Van Buskirk, 2009 ; Van Burskirk, 2009). Les traits phénotypiques comme la taille et la durée de métamorphose sont souvent utilisés comme indicateur de la valeur sélective pour les organismes à cycles de vie complexe (Denver, 1997 ; Altwegg et Reyer, 2003 ; Ficetola et De Bernardi, 2006 ; Van Allen et al., 2010, Walsh, 2010). Notamment, une taille corporelle plus élevée et une émergence précoce ont été corrélées avec de meilleurs taux de dispersion et de survie (Vonesk, 2005 ; Chelgren et al., 2006) et une maturité sexuelle plus rapide (Reading, 2007 ; Briggs, 2008).

Pour cette étude, nous avons donc choisi de mesurer les effets d'un découplant sur le développement post-embryonnaire des amphibiens, en suivant les conséquences à la fois sur le taux de croissance et sur la vitesse de développement des têtards.

Ce volet expérimental de ma thèse permettra de mettre en évidence les réponses de l'organisme à la fois à un niveau subcellulaire, et au niveau de l'organisme :

- Objectif 1 : Quels sont les effets du 2,4-dinitrophénol sur les mitochondries des têtards ? Les mitochondries développent-elles des processus d'acclimatation face au découplage induit par le dNP ?

- Objectif 2 : Quelles sont les conséquences du découplage sur la capacité des individus à s'alimenter, croître et réguler leur statut oxydatif ?

L'étude permettant de répondre à ces objectifs (article III) a été précédée de deux études préliminaires : une étude toxicologique permettant de connaître les effets du dNP sur le

développement larvaire, et une étude méthodologique sur l'extraction et la mesure des mitochondries de têtards.

2.3 Étude préliminaire I

2.3.1 Introduction

Le but de l'expérience a été de trouver la concentration de dNP permettant aux têtards de se développer sans une trop forte mortalité. En effet, à notre connaissance il n'existe pas d'étude *in vivo* sur les animaux aquatiques dans la bibliographie. Ainsi, nous avons exposé les animaux continuellement à des concentrations de dNP fixe, en utilisant le modèle de têtards de grenouille rousse *Rana temporaria*. Nous avons recherché la dose seuil de dNP qui modifie le développement et/ou la croissance larvaire ainsi que la dose létale.

2.3.2 Matériel et Méthode

2.3.2.1 Collecte et maintenance des animaux

Le 25 mars 2009, nous avons collecté des pontes fraîchement fécondées d'une population de grenouilles rousses *Rana temporaria* au niveau d'un site naturel à proximité de Lyon, à Montcoy (46° 47' 27" N 5° 00' 31" E). Les pontes ont été maintenues en extérieur, dans des bacs de 75 L. Lorsque les têtards ont eu la capacité de nage libre (stade 25, Table de Gosner, 1960), ils ont été prélevés aléatoirement des différentes pontes pour estomper le potentiel effet génétique sur les performances larvaires mesurées, et mis en élevage en condition de laboratoire. Jusqu'à la fin de l'expérience, les animaux ont été maintenus dans de l'eau du robinet à 17°C, continuellement oxygénée, exposés à une photopériode de 12h : 12h et nourris *ad libitum* avec des épinards hachés.

Après une période d'acclimatation préliminaire d'une semaine (environ stade 26), les têtards ont été exposés au traitement jusqu'à leur métamorphose. Chaque groupe comprenait

20 individus, réparti en 2 réplicats de 10 têtards dans 4L d'eau. Les animaux ont été répartis en cinq conditions expérimentales différentes :

- un groupe « eau »,
- un groupe « éthanol », le solvant du 2,4-dNP, ajouté à volume équivalent au dNP, soit 4 mL d'éthanol absolu (Cf = 0.1%)
- un groupe « dNP 1 », soit 4 mL de dNP 1 mM, concentration finale : dNP 1 μ M
- un groupe « dNP 10 », soit 4 mL de dNP 10mM, concentration finale : dNP 10 μ M
- un groupe « dNP 100 », soit 4 mL de dNP 100 mM, concentration finale : dNP 100 μ M.

Le traitement était renouvelé toutes les semaines à chaque changement d'eau. Le suivi de la mortalité était réalisé quotidiennement.

2.3.2.2 Performances larvaires

Toutes les semaines, du début du traitement à la métamorphose, le développement ainsi que la croissance des têtards ont été mesurées. Les mesures du développement larvaire se font à la loupe binoculaire, par une observation latérale du têtard, toujours réalisée par le même expérimentateur et sur le même côté de l'organisme. La table de Gosner (1960) est communément utilisée pour estimer le développement des anoues via des critères morphologiques (bourgeon des pattes, séparation des doigts, régression de la queue... cf. Figure 13). Puis les animaux ont été pesés (poids frais \pm 1 mg) et la longueur du corps a été mesurée (\pm 0.5 mm).

2.3.3 Résultats

2.3.3.1 Survie

L'ensemble des résultats sur la survie des têtards au cours du traitement est représenté sur la figure 20.

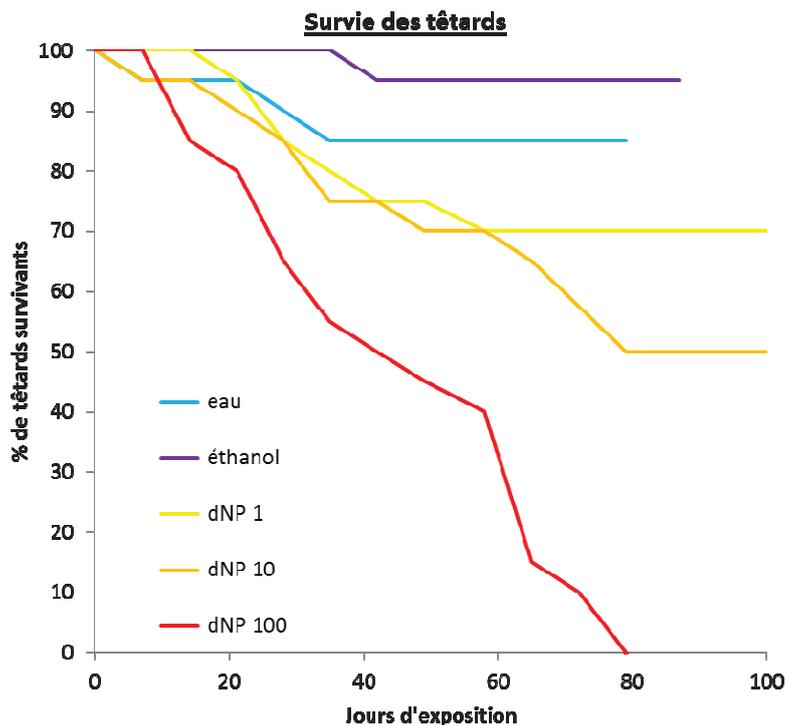


Figure 20 : Pourcentage de survie des têtards au cours de l'exposition au dinitrophenol

Le suivi quotidien a permis de mettre en évidence que 100% des têtards exposés chroniquement à 100 μ M de dNP sont morts avant d'atteindre la métamorphose. Dans tous les groupes, eau, éthanol et dNP 1, dNP 10, il y a eu de la mortalité. Cependant, on peut quand même noter une survie plus importante dans les groupes témoins, eau et éthanol (avec environ respectivement 85 et 95% de survie) que dans les groupes traités dNP 1 et dNP 10 (avec respectivement 70 et 50% de survie).

2.3.3.2 Développement et croissance

Le groupe « dNP 100 » a été exclu des analyses puisque cette dose de dNP a été létale pour 100% des individus avant qu'ils n'atteignent la métamorphose.

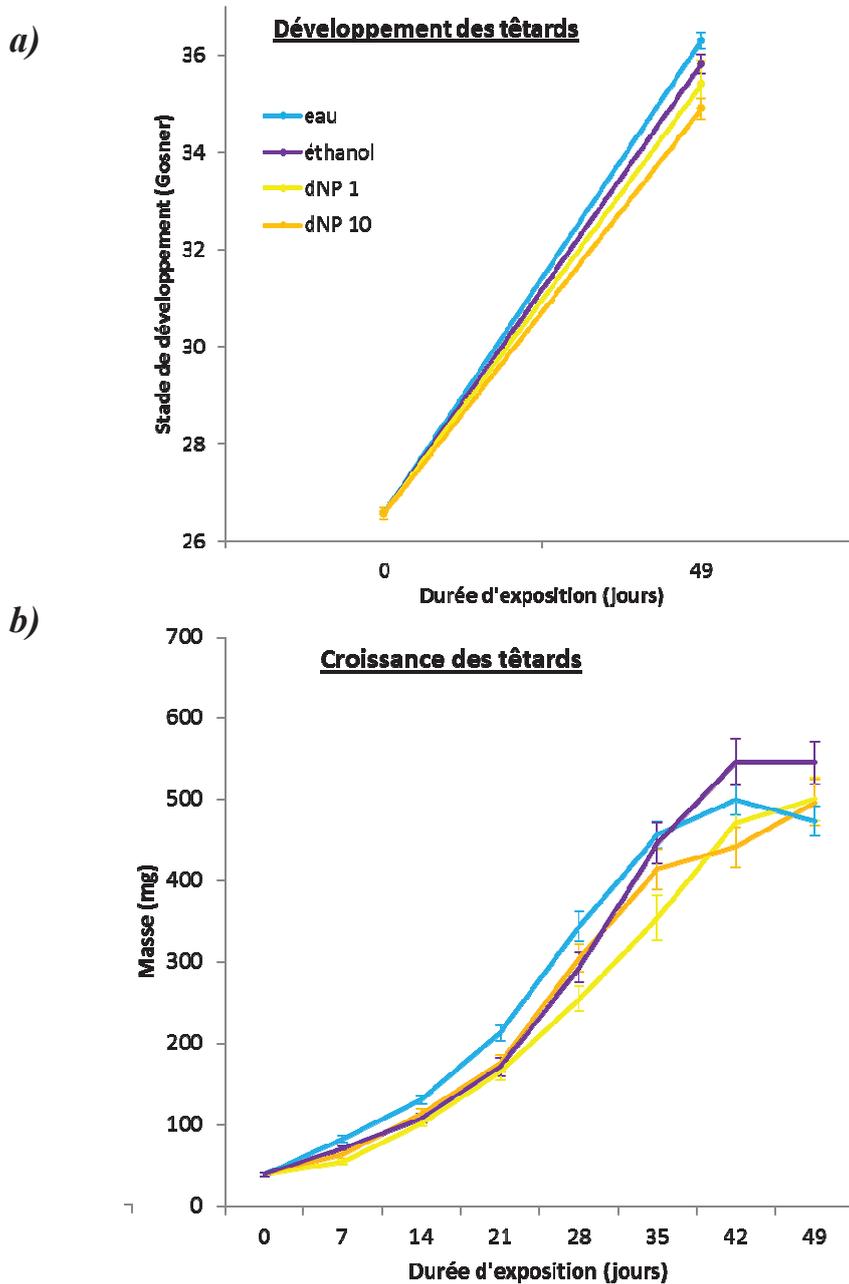


Figure 21 : Suivi du développement (a) et de la croissance (b) des têtards en fonction du nombre de jours d'exposition au dinitrophenol.

Par ailleurs, seules les données sur les stades de développement après 49 jours d'exposition ont été présentées par soucis de clarté, les points intermédiaires n'apportant pas d'informations supplémentaires.

Nos résultats montrent que le groupe dNP 1 et dNP 10 ont un développement ralenti en comparaison aux groupes témoins eau et éthanol (Figure 21-a). Par ailleurs, le ralentissement du développement semble être plus important avec la forte dose de dNP, dNP 10 μM , qu'à la plus faible dose, dNP 1 μM . Enfin le contrôle éthanol montre un développement intermédiaire entre les groupes dNP et le contrôle eau, mettant en évidence une implication du solvant dans le ralentissement de développement.

Les tendances sont tout à fait similaire entre les paramètres « longueur » et « masse ». Ainsi, graphiquement, nous ne représentons qu'une seule variable, la masse des têtards (Figure 21-b). Visuellement, il est assez compliqué d'analyser les courbes de croissance. Le groupe « eau » semble avoir une croissance supérieure aux groupes « éthanol », « dNP 1 » et « dNP 10 » jusqu'à 35 jours d'exposition. Entre le 35^{ème} et 49^{ème} jour d'exposition, le groupe éthanol à une masse corporelle supérieure aux groupes « eau », « dNP 1 » et « dNP 10 ». Au 49^{ème} jour, on observe même une masse corporelle inférieure du groupe « eau » par rapport aux autres groupes. Cela s'explique par le décalage de développement des organismes. En effet, le groupe « eau » atteint des stades avancés, durant lesquels les organismes jeûnes et perdent du poids. Il en va de même pour le groupe éthanol qui montre une masse corporelle élevée entre le 35^{ème} et 49^{ème} jour d'exposition au traitement par rapport aux groupes dNP : les têtards éthanol ont un développement plus avancé que les têtards dNP. Ainsi, les différences de masses entre les groupes de têtards s'expliquent par leur décalage de développement.

2.3.3.3 Métamorphose

La figure 22 présente le pourcentage de têtard arrivant à la métamorphose, par populations et par traitement. Dans le calcul des pourcentages sont compris les individus morts ainsi que les têtards qui n'ont pas atteint la métamorphose au cours de l'expérimentation. Ainsi, les individus traités au dinitrophenol montrent clairement un retard de métamorphose en comparaison aux groupes témoins. Comme les stades de développement,

la durée avant métamorphose est positivement corrélée à la concentration de dinitrophénol dans l'eau, c'est-à-dire que les têtards dNP 10 ont une durée avant métamorphose plus importante que les têtards dNP 1. Par ailleurs, les têtards exposés à l'éthanol présentent une durée avant métamorphose plus longue que les têtards sans aucun traitement.

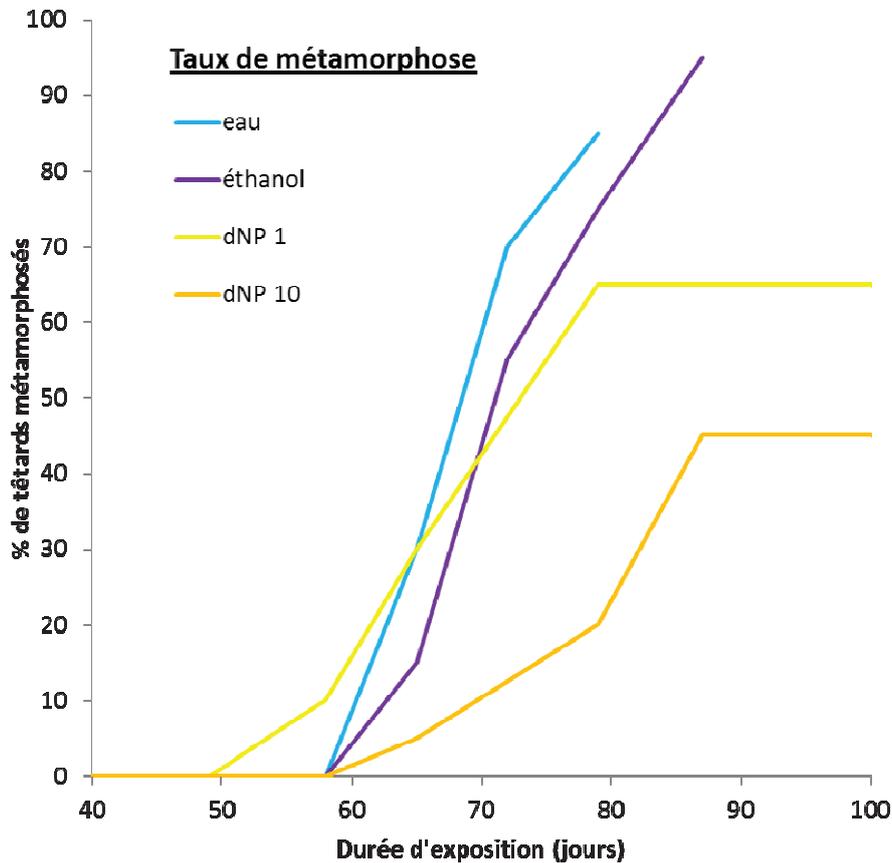


Figure 22 : Métamorphose des têtards en fonction de traitement.

2.3.4 Discussion

Des mesures de longueur / masse et stade de croissance ont été réalisées tout au long du développement du têtard dans le but de visualiser une cinétique d'action du découplant, le 2,4-dinitrophénol. D'une part, nous avons déterminé la dose létale de la molécule qui est de 100 μ M puisque les organismes présentent une mortalité accrue suite à l'exposition chronique

du dNP 100 μM , et aucun organisme n'arrive à métamorphose, contrairement aux animaux exposés à des concentrations inférieures (dNP 1 μM et dNP 10 μM). Cela nous permet donc d'exclure cette concentration des prochaines expériences.

Par ailleurs, le 2,4 dNP accentue le taux de mortalité des têtards, ralentit le développement et le taux de croissance des organismes et retarde la métamorphose en comparaison aux groupes témoins. Il est à noter que le retard de croissance est dû à un retard de développement, mais qu'à stade égal, les têtards ont la même masse / longueur. Ainsi, le dNP a pour effet de retarder le taux de croissance et de développement larvaire des têtards de grenouilles rousses *Rana temporaria*.

Notre étude a permis aussi de mettre en évidence l'implication de l'éthanol dans les effets observés : les témoins éthanol montre un patron de survie / croissance / développement / métamorphose intermédiaire entre le groupe sans éthanol (groupe « eau »), et les groupes avec éthanol plus dNP (groupes dNP 1 et dNP 10). Une partie des effets du dNP semblerait donc être due à l'éthanol. Ces résultats nous ont orientés vers des concentrations de dNP minimisant la teneur en éthanol pour les prochaines expérimentations. La concentration maximale possible à obtenir à température ambiante et stable même après arrêt de l'agitation, est le dNP 100 mM. C'est pourquoi, nous avons privilégié la concentration finale de dNP 1 μM pour les études suivantes, ce qui nous permet de diviser la concentration d'éthanol par 100 en comparaison de cette étude préliminaire.

En conclusion, cette étude nous a permis de déterminer la quantité de 2,4 dinitrophénol à laquelle les têtards seront exposés de manière chronique pendant leur développement, soit une concentration finale de 1 μM avec une teneur en éthanol absolu de 0,001%.

2.4 Étude préliminaire II

2.4.1 Introduction

La seconde mise au point réalisée pour l'étude de l'impact du fonctionnement mitochondrial dans les traits d'histoire de vie des têtards a été l'isolement et l'analyse des mitochondries. Pour des animaux aussi petits que les têtards, il n'est pas possible de travailler au niveau tissulaire, ni même au niveau individuel pour obtenir une quantité de mitochondries suffisante sur laquelle seront mesurés à la fois les capacités oxydatives, le rendement énergétique mitochondrial et la production de ROS. Il était donc nécessaire de regrouper les organismes entiers pour obtenir une quantité importante de mitochondrie. Plusieurs protocoles ont été appliqués jusqu'à obtention de mitochondries de bonne qualité. Pour cela nous avons testé deux types de tampons, un tampon à « faible osmolarité » et un tampon à « forte » osmolarité, et un protocole d'isolement par centrifugation différentielle et un protocole d'isolement par centrifugation différentielle sur gradient de Percoll.

2.4.2 Matériel et méthodes :

Les mises au point ont été réalisées sur des têtards au stade 26-27 (Gosner, 1960). Avant toute extraction mitochondriale, les têtards étaient mis à jeûner 48 à 72h. Ils étaient ensuite anesthésiés par une exposition au froid de quelques minutes, puis pottérisés dans du tampon d'extraction ; dès cette étape et jusqu'à la fin de l'expérimentation, tout se déroule à 4°C.

2.4.2.1 Tampon d'extraction et de respiration 1

Les mitochondries ont été isolées et mises en suspension dans les tampons à « faibles osmolarités » qui sont utilisés classiquement chez les mammifères (Darley-Usmar et al.,

1987). Les têtards sont donc pottérisés dans un tampon contenant 250 mM sucrose, 1mM EGTA et 20 mM Tris-HCl, neutraliser avec du KOH à pH 7,4 à 4°C, avec ou sans 2% BSA FFA (albumine sérique de boeuf délipidée ; la présence est précisée dans la partie « Résultat »). Les deux types de protocole d'extraction ont été testés avec ce tampon. Les capacités des mitochondries obtenues avec ce tampon d'extraction ont été mesurées dans un tampon respiratoire à « faible osmolarité » constitué de 120 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 20 mM glucose, 3 mM HEPES 0,3% ou 1% de BSA FFA à pH 7,4 à 20 °C.

2.4.2.2 Tampon d'extraction et de respiration 2

Les mitochondries ont été isolées et mises en suspension dans des tampons à « forte osmolarité » (environ 700 mOsm) qui sont utilisés classiquement pour les mitochondries de levures (Guérin et al., 1979). Les têtards sont donc pottérisés dans un tampon contenant 600 mM mannitol, 10 mM tris-HCl, 10 mM acide maléique, 2mM EGTA, 1mM EDTA, 0.5 mM Na₂HPO₄, 2% de BSA FFA, pH 7.4 à 4°C. Les deux types de protocole d'extraction ont été testés avec ce tampon. Les capacités des mitochondries obtenues avec ce tampon d'extraction ont été mesurées dans un tampon respiratoire à « fortes osmolarités » constitué de 20 mM Tris-base, 650 mM mannitol, 0.5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM KH₂PO₄, 1% BSA FFA (masse / volume), pH 7.4 à 20°C.

2.4.2.3 Protocole d'extraction 1

Environ 10 grammes de têtards dans le tampon d'extraction 1 ou 2 ont été homogénéisés par trois passage au Potter (Elvehjem). L'homogénat a été centrifugé à 800 g, 10 min. Le surnageant est mis de côté, le culot suspendu et centrifugé 10 min à 800 g. Les surnageants des 2 centrifugations à 800 g sont regroupés et centrifugés à 1000 g, 10 min. Le surnageant est filtré et centrifugé à 8700 g, 10 min. Le culot est suspendu dans le tampon d'extraction (1 ou 2, en fonction du protocole initial) puis centrifugé à 8700 g, 10 min. Cette

étape de lavage est répétée une seconde fois, puis le culot final est suspendu dans 200 μ L de tampon d'extraction.

2.4.2.4 Protocole d'extraction 2

Le protocole d'isolement est similaire au précédent, avec une étape de purification des mitochondries par gradient de densité au Percoll. Après la première centrifugation à 8700g, le culot est resuspendu dans du tampon contenant 15 % de Percoll et déposé sur un gradient préformé d'une couche de percoll à 23%, elle-même déposée sur une phase de percoll à 40% et centrifugé à 31000 g pendant 5 min (Sims et Anderson, 2008). La suspension à l'interface des phases 23% et 40% de percoll est pipetée et diluée par 4 dans le milieu d'isolement puis centrifugée à 16000 g pendant 10 min. Le surnageant est retiré et le culot est dilué par trois volume de milieu d'isolement et centrifugé à 8700 g, 10 min. Le culot final est suspendu dans 200 μ L de tampon d'extraction.

2.4.2.5 Respiration mitochondriale et rapport ATP/O

A l'issue des 2 types de protocole d'extraction, la teneur en protéines mitochondriales a été dosée avant de réaliser des mesures d'activité mitochondriale. La concentration protéique a été mesurée à 540 nm par la méthode du Biuret avec la BSA comme standard.

La consommation d'oxygène a été mesurée avec une électrode de Clark (Rank Brother LTD), dans une chambre en verre close, avec agitateur magnétique, dans un volume de 250 μ L, thermostatée à 20°C. La suspension mitochondriale était mise en suspension dans du milieu respiratoire à faible ou à forte osmolarité (en gardant la continuité avec le protocole d'isolement). Le substrat respiratoire utilisé était le succinate (5 mM) en présence d'un inhibiteur du complexe I, la roténone (5 μ M). La mesure des capacités oxydatives en condition phosphorylante (l'état 3 respiratoire) a été mesuré en présence d'ADP non limitant (1 mM), et les capacités oxydatives à l'état non-phosphorylant (état 4) ont été mesurées en présence d'oligomycine (2,5 μ g/mL). Le rapport contrôle respiratoire (RCR), calculé comme

le ratio entre oxygène consommé à l'état 3 divisé par l'oxygène consommé à l'état 4, est un bon indicateur de la qualité de la préparation mitochondriale. L'activité de la cytochrome c oxydase ont été réalisées par l'ajout de myxothiazol 3 mM, d'ascorbate 4 mM et de TMPD 0,5 mM.

L'efficacité des oxydations phosphorylantes a été déterminée par le ratio entre le taux de synthèse d'ATP et la consommation d'oxygène sur les mitochondries isolées des têtards en présence du substrat succinate (5 mM, avec de la roténone 5 μ M) avec un système de régénération de l'ADP contenant de l'hexokinase (1,5 U/mL) et du glucose (20 mM) avec 2 concentrations différentes d'ADP, 20 μ M et 200 μ M (adapté de Rigoulet et al., 1998; Nogueira et al., 2001; Clerc et al., 2007). La mesure de la synthèse d'ATP a été réalisée par le dosage du glucose-6-phosphate. Après un suivi du taux respiratoire de 5 minutes, 4 aliquots de suspension mitochondriale ont été prélevés de la chambre respiratoire toutes les 2 minutes et la réaction a été immédiatement stoppée par l'acide perchlorique (10 % HClO₄ et 25 mM EDTA). Après centrifugation des protéines dénaturées (15000 g, 5 min), le surnageant était neutralisé avec une solution contenant 0,2 M de KOH et 0,3 M de MOPS. Le glucose-6-phosphate contenu dans l'échantillon a été mesuré par spectrophotométrie à 340 nm dans un tampon contenant 0,5 mM de NAD⁺, 50 mM de triéthanolamine-HCl, 7,5 mM MgCl₂ et 3,75 mM d'EDTA, à pH 7,4 à température ambiante. La concentration de glucose-6-phosphate a été calculée par la différence entre le niveau de NADH avant et une heure après l'ajout de la glucose-6-phosphate déshydrogénase. La production mitochondriale d'ATP était alors calculée comme la pente de l'accumulation de glucose-6-phosphate dans l'échantillon sur l'intervalle de temps de prélèvement (soit 6 min). La linéarité de l'accumulation de glucose-6-phosphate nous permet de confirmer que le système est maintenu à un état stable. Nous avons vérifié que les teneurs en ATP mesurées soient spécifiques de l'activité de l'ATP synthétase en déterminant les taux de synthèse d'ATP en présence l'oligomycine (5 μ g.mL⁻¹).

2.4.3 Résultats et discussion

L'ensemble des résultats sont répertoriés dans le tableau en figure 23.

		Respirations mitochondriales sous différentes conditions (nmol O/min/mg prot. mitochondriale)					
		Sans substrat	Etat 2 (succinate 5mM)	Etat 3 (ADP 1 mM)	Etat 4 (Oligo 2,5 µg/mL)	RCR	
Tampon d'extraction & centrifugation différentielle	Mesures en parallèle	<i>Tp faible Osm & Ø BSA & Centri classique</i>	1,77 ± 0,47*	2,34 ± 0,28	4,60 ± 1,09	2,96 ± 0,74	1,45 ± 0,23
		<i>Tp faible Osm & Ø BSA & Centri Percoll</i>	~ 0	Ø	Ø	Ø	1,14
		<i>Tp faible Osm & + BSA & Centri Percoll</i>	~ 0	1,05	2,00	1,60	1,28
		<i>Tp faible Osm & + BSA & Centri Percoll</i>	~ 0	1,23	1,58	1,63	0,97
		<i>Tp forte Osm & + BSA & Centri Percoll</i>	~ 0	2,45	4,18	2,27	1,90

Figure 23 : Consommation d'oxygène mitochondriale sous différentes conditions respiratoires et en fonction du type d'isolement. *Tp* = tampon d'extraction ; *Osm* = osmolarité du tampon, faible ou forte ; avec (+) ou sans (Ø) BSA FFA. * une consommation d'oxygène sans substrat peut provenir d'une autre source que les mitochondries isolées.

2.4.3.1 Tampon à faible osmolarité, centrifugation différentielle simple :

La consommation d'oxygène mesurée après l'ajout des mitochondries dans le milieu respiratoire montre une respiration en absence de substrat mitochondrial. Cette respiration doit provenir d'une source non-mitochondriale. Par ailleurs, la faible stimulation / inhibition

par les substrats et composés pharmacologiques spécifiques aux mitochondries nous amène à conclure que soit il n'y a pas de mitochondries intactes dans la suspension mitochondriale, soit les mitochondries sont intactes mais leurs capacités oxydatives sont noyées dans le bruit de fond généré par une pollution non-mitochondriale. De plus, il a été observé une dégradation très rapide des mitochondries : après 1 à 2h d'isolement, les mitochondries ne répondaient plus du tout aux composés pharmacologiques.

2.4.3.2 Tampon à faible osmolarité, centrifugation différentielle avec gradient de Percoll :

L'absence de respiration en absence de substrat mitochondrial nous amène à considérer le culot de mitochondries comme non pollué par une source externe d'oxydation. En revanche, les mitochondries sont découplées. A nouveau, deux hypothèses sont possibles : soit les mitochondries sont déstructurées, c'est-à-dire que la membrane interne est altérée et aucune force protomotrice ne peut être entretenue ; soit l'isolement des mitochondries pourrait avoir généré la libération d'acide gras (mis en réserve par le têtard) dont les actions découplantes sur les mitochondries sont très bien connues. Plus précisément, au niveau de la membrane interne mitochondriale, des protéines découplantes sont activables par les acides gras. Cette dernière hypothèse découle de l'observation de couche graisseuse au cours du protocole d'isolement mitochondrial.

2.4.3.3 Tampon à faible osmolarité, centrifugation différentielle avec gradient de Percoll avec BSA FFA

Les mitochondries sont toujours très découplées et ne répondent pas aux activateurs / inhibiteurs. Les mitochondries sont donc dans un mauvais état. Un tampon d'isolement/respiratoire à forte osmolarité a alors été testé, pour éviter un potentiel éclatement des mitochondries en présence d'un tampon à trop faible osmolarité.

2.4.3.4 Tampon à faible osmolarité *versus* tampon à forte osmolarité, centrifugation différentielle avec gradient de Percoll avec BSA FFA

La suspension mitochondriale semble être de meilleure qualité avec un tampon à forte osmolarité : les mitochondries répondent aux substrats et inhibiteurs, le RCR est plus élevé en milieu à forte osmolarité que dans un milieu respiratoire à faible osmolarité. Des dosages d'ATP/O ont alors été réalisés dans un tampon à forte osmolarité, avec de la BSA FFA (albumine sérique de bœuf délipidée) en utilisant un isolement sur gradient de Percoll.

2.4.3.5 Capacités oxydatives et efficacité des oxydations phosphorylantes des mitochondries de têtard

Le tableau de la figure 24 référence les moyennes \pm SEM des capacités oxydatives mitochondriales sur un ensemble de 9 à 10 échantillons.

	État 2	État 3	État 4	RCR	Cytochrome oxydase
	<i>Roténone+</i> <i>succinate</i>	<i>ADP</i>	<i>Oligomycine</i>	<i>État 3/État 4</i>	<i>Ascorbate+</i> <i>TMPD</i>
Consommation d'oxygène (nmol O/min.mg protéine mitochondriale)	5,53 \pm 1,58	8,33 \pm 2,51	4,49 \pm 0,99	1,78 \pm 0,12	12,21 \pm 2,49

Figure 24 : mesure des consommations d'oxygène des mitochondries de têtards.

L'ensemble de ces données mettent en évidence que l'ADP stimule bien les capacités oxydatives de mitochondries et que l'oligomycine inhibe l'activité de la chaîne respiratoire associée au fonctionnement de l'ATP synthétase. Par ailleurs, les valeurs de RCR semblent faibles en comparaison de la littérature sur les respirations mitochondriales des amphibiens (Rogers et al. 2007 ; Emel'Yanova et al. 2007 ; Kayes et al., 2009). Cependant, outre le calcul du RCR, la mesure de la synthèse d'ATP nous permet d'apprécier réellement la capacité de la mitochondrie à entretenir une force protomotrice et produire de l'ATP, et donc informe sur son bon fonctionnement.

Ceci est illustré par la pente entre le taux de synthèse d'ATP et la consommation d'oxygène mitochondriale du graphique en figure 25, qui est une mesure de l'efficacité des oxydations phosphorylantes des mitochondries.

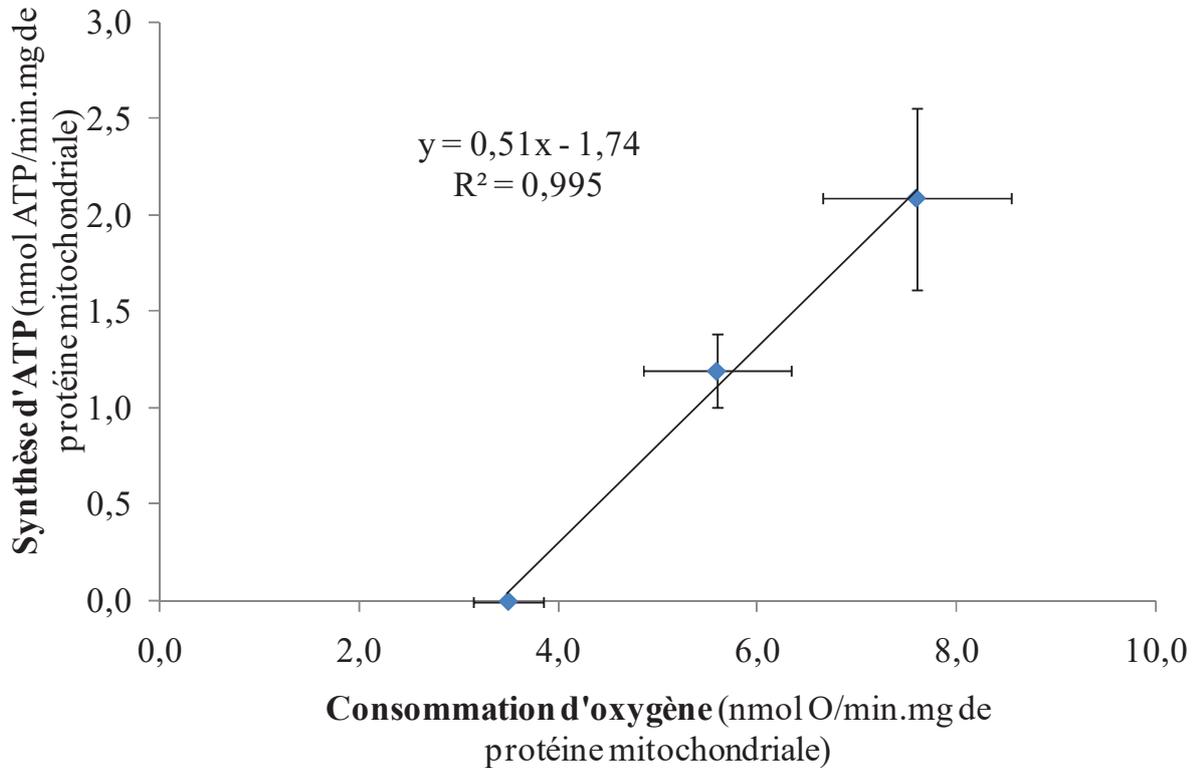


Figure 25 : Graphique du rapport entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP des mitochondries de têtards.

Ce graphique montre que le ratio ATP/O est mesurable dans nos conditions expérimentales. Ainsi, les mitochondries contenues dans notre suspension répondent aux activateurs et aux inhibiteurs spécifiques aux mitochondries, et montrent une intégrité suffisante pour synthétiser de l'ATP.

En conclusion, nous maintiendrons les conditions expérimentales suivantes pour nos mesures d'activité mitochondriale de têtards :

-un tampon d'extraction et de respiration avec de l'albumine sérique de bœuf délipidée, avec des osmolarités avoisinant les 700 mOsm.

-un protocole d'isolement par centrifugation différentielle ainsi qu'une étape de purification mitochondriale sur gradient de Percoll.

2.5 Le changement d'efficacité mitochondriale affecte la balance oxydative, le développement et la croissance des têtards de grenouilles rousses – Article 3, en révision dans *Journal of Experimental Biology*

Afin de déterminer l'impact du fonctionnement mitochondrial dans les stratégies d'histoire de vie des organismes, nous avons induit des changements dans la physiologie mitochondriale de têtards de grenouilles rousses *Rana temporaria*.

Ces expériences ont consisté à mettre en place 3 lots de têtards : 2 lots témoins, « eau » et « éthanol » 0.001% et un lot traité au 2,4-dinitrophenol 1 μM .

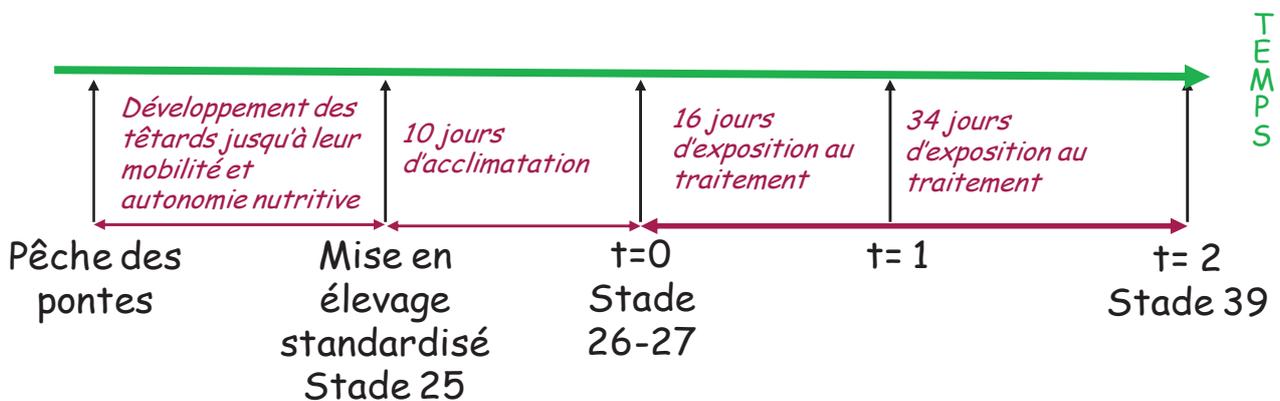


Figure 26 : Protocole d'élevage des têtards et de leur exposition au traitement.

Ainsi, les effets du traitement sur les mitochondries ont été appréciés par la mesure de l'efficacité mitochondriale (rapport ATP/O), des capacités oxydatives et phosphorylantes ainsi que de la production de ROS à $t = 2$ (figure 26)

Au niveau de la balance oxydative, à $t = 2$, l'investissement dans les défenses anti-oxydantes a été estimé par les capacités anti-oxydantes totales des têtards, et la résultante de la balance oxydative, l'accumulation des dégâts oxydatifs, a été évaluée par le dosage d'acide thiobarbiturique, un marqueur de la peroxydation lipidique.

Ces mesures ont été complétées par l'évaluation des entrées du flux énergétique, soit les apports énergétiques via la quantité d'aliments ingérés ($t = 1$ et $t = 2$) et la consommation d'oxygène en métabolisme basal ($t = 0$; $t = 1$; $t = 2$).

Lors de l'exposition au traitement ($t=0$, $t=1$, $t=2$), l'évolution de la masse corporelle et du stade de développement ont permis de mettre en évidence l'impact des modifications du fonctionnement mitochondriale sur les traits d'histoire de vie des organismes.

Alteration of mitochondrial efficiency affects oxidative balance, development and growth in frog (*Rana temporaria*) tadpoles.

By

Salin Karine^{1*}, Luquet Emilien¹, Rey Benjamin², Roussel Damien¹ and Voituron Yann¹

1. Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (U.M.R. CNRS 5023), Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 43 Bvd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

2. Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (U.M.R. CNRS 5558), Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 43 Bvd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

RUNNING TITLE: Mitochondria and life-history traits

* To whom correspondence should be addressed: karine.salin@univ-lyon1.fr; Tel: +33 4 72 43 15 20; Fax: +33 4 72 43 11 41.

ABSTRACT

Mitochondria are known to play a central role in life-history processes, being the main source of reactive oxygen species (ROS), which promote oxidative constraints. Surprisingly, although the main role of the mitochondria is to produce ATP, plasticity of mitochondrial ATP generation received little attention in life history studies. Yet mitochondrial energy transduction represents the physiological link between environmental resources and energy allocated into animal performances. By studying the both facets of the mitochondrial functioning (ATP and ROS productions), we could provide better understanding on the proximate mechanisms underlying life-history. We have experimentally modulated the mitochondria capacity to generate ROS and ATP during larval development of *Rana temporaria* tadpoles, via chronic exposure (34 days) to a mitochondrial uncoupler (2,4-dinitrophenol, dNP). The purpose was then to better understanding the mitochondrial uncoupling impact on both responses regarding oxidative balance, energy input (oxygen and feeding consumption) and output (growth and development tadpole). Exposure to 2,4-dNP reduced mitochondrial ROS generation, total antioxidant defenses and oxidative damages in treated-tadpoles compared to control. Despite the beneficial effect of dNP on oxidative status, development and growth rates of treated-tadpoles were lower than those in control group. Treatment of tadpoles with 2,4-dNP promoted a mild mitochondrial uncoupling and enhanced metabolic rate. Mild uncoupled tadpoles did not increase their food consumption, and thus failed to compensate from the energy loss elicited by the decrease in the efficiency of ATP production process. These data suggest that the cost of ATP production, rather the oxidative balance, is a parameter able to constrain growth/development of tadpoles, highlighting the central role of energy transduction into larval performances.

KEYWORDS: ATP/O ratio, energy balance, life-history traits, oxidative constraint, amphibian.

INTRODUCTION

Organism's life-history is shaped by physical constraints and ecological pressures. Since the early 1960's, pillar of life-history theory relies on the assumption that the differential allocation of a limited resources to various aspects of maintenance, growth and reproduction must be optimized to maximize individual fitness (Cody 1966, Stearns, 1992). Unraveling the underlying mechanisms of life-history trade-off could improve the understanding of the proximal causes driving evolutionary forces. During the past years, physiological aspects of trade-off have been largely explored focusing on energy resource allocation and its genetic and endocrine control (Zera and Harshman, 2001). However, the precise physiological mechanisms that determine the variability in life-history traits are still poorly understood. (Ackermann et al, 2001; Zera and Harshman, 2001; Alonso-Alvarez et al., 2006).

Although a great number of relevant studies focused on energy resource acquisition and energy allocation, surprisingly none has yet considered energy flow regulation and conversion at the mitochondrial level. Indeed, energy deriving from diet becomes usable only after being converted into high-energy phosphate bonds in adenosine triphosphate (ATP) molecules. The main site of the energy conversion is mitochondria (90% of cellular ATP, Lehninger et al., 1993) that extract energy through oxidative reactions during aerobic respiration. Since the amount of ATP could limit many vital cellular processes (protein synthesis, cell division and signaling, muscle contractile activities...), the plasticity of this organelle functioning would play a central role in the amount of energy that an organism could allocate to its life-history traits.

Mitochondrial ATP synthesis is well known to present variable degree of coupling to oxygen consumption (ATP/O ratio). In this sense, a plasticity of the mitochondrial energy transduction efficiency strongly vary in a phylogenetic manner and in response to environmental factors, such as season, diet, temperature (Heise et al., 2003; Sokolova, 2004; Sommer and Portner, 2004; Brand, 2005; Emel'Yanova et al., 2007; Robert and Bronikowski, 2010). However, according to the above mentioned theory of limited resources, evolutionary force should have optimized the ATP/O ratio toward a better mitochondrial energy transduction system efficiency in order to maximized organism's fitness. Therefore, the persistence of low ATP/O yield, despite the action of natural selection thus suggests that a

low efficiency could provide some evolutionary advantages according to environmental circumstance (Brand, 2000).

One possible explanation is that mitochondria are also an important source of reactive oxygen species (ROS). Indeed, ROS formation is an unavoidable by-product of aerobic metabolism that greatly depends upon the mitochondrial inner membrane potential, as the ATP/O ratio does (Korshunov et al., 1997; Brand, 2005, Jezek and Hlavata 2005). These highly reactive molecules will exert oxidative stress on cellular macromolecules. If ROS production is unchecked thanks to anti-oxidant systems, cumulative oxidative damage to lipids, proteins and nucleic acids will accelerate organism senescence processes (Harman, 1956; Balaban et al., 2005; Barja, 2007). To date, ROS production have been considered as a proximate cost of growth or reproduction investment, supporting the notion that energy allocation mediated trade off may be associated with oxidative stress (Dowling and Simmons, 2009; Metcalfe and Alonzo-Alvarez, 2010), but not necessarily with energetic resources or more widely to the energy transduction system. In order to provide new advances for functional studies of trade-offs, we investigated the mitochondrial functioning as the keystone between optimization of energetic availability for maintenance, reproduction and growth and the ROS production cost.

The aim of the present study was to investigate whether global mitochondrial functioning (both ATP and ROS production) may be associated with life-history variations. To test this hypothesis, we chronically exposed frog *Rana temporaria* tadpoles to the mitochondrial protonophore 2,4-dinitrophenol (2,4-dNP) during their larval development. This drug increased the proton leak across the inner mitochondrial membrane, reducing the efficiency of mitochondrial energy transduction and the rate of ROS production (Brand, 2000; Balaban et al., 2005; Speakman, 2005; Hulbert et al., 2007). Chronic 2,4-dNP exposure at low dose is expected to inducing mild mitochondrial uncoupling and promote beneficial effect on oxidative stress (Wallace and Starkov, 2000, da Silva et al., 2008). We then measured different parameters to better understand both responses regarding oxidative balance, energy input (basal metabolic rate and food intake) and the energy output in tadpole performances (growth and development rates).

MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental design

Spawn clumps of common frog *Rana temporaria* were collected from natural ponds located near Lyon (France, 46° 50' 32" N 5° 33' 10" E). Each spawn clump was maintained outdoor in 75 L tank. When tadpoles reach Gosner stage 25 (free-swimming, Gosner 1960, approximately 26 days), tadpoles derived from the spawn clumps were randomized per group of 50 individuals in 20 L aquaria. From this step and until the end of experiment, tadpoles were reared indoor in continuously aerated tap water aquaria, with a controlled temperature of $20 \pm 3^\circ\text{C}$, 12:12h light-dark cycle and fed *ad libitum* with spinach.

Tadpoles were reared 10 days in laboratory conditions (Gosner stage 29) before the 2,4-dinitrophenol treatment. Animals were continuously exposed to 2,4-dNP. Skin absorption is a well established route of the uncoupler 2,4-dNP exposure in terrestrial and aquatic animals (Agency for Toxic Substances, 1995). From a previous pilot study we initially determined that 100 μM of 2,4-DNP was lethal after few weeks of chronic exposure whereas a concentration of 1 μM 2,4-dNP was without any effect on survival (personal observation). Hence, 2,4-dNP was introduced at a final concentration of 1 μM into the treated tanks.

Lyophilized powder of 2,4-dNP (D7004 - Sigma-Aldrich) was first dissolved in absolute ethanol (at a stock concentration of 100 mM) and 200 μL was added into each of the 20 L aquaria reaching a final concentration of 1 μM 2,4-dNP and 0.001% ethanol. As 2,4-dNP was made in ethanol solution, we used an experimental control condition, in which tadpoles were grown in water tank supplemented with ethanol (0.001%). In the experiment, we also study whether ethanol alone affected larval performances, by comparing ethanol-treated tadpoles with tadpoles maintained in water. As summary in Appendix 1 and 2, ethanol treatment (at a final concentration of 0.001%) had no effect on larval performances.

Tadpoles were grown for 34 days in water tank containing 1 μM 2,4-dNP (experimental group) or in water tank supplemented with 0.001% ethanol (control group). This treatment was repeated every water change.

Larval performances

After 10 days of acclimatization in indoor pools, body weight was measured and larval stage of tadpoles determined according to Gosner (1960) before the 2,4-dNP treatment begins, at 16 days and 34 days of chronic exposure of 2,4-dNP.

Feeding trial

The ingestion capacity was measured in 2,4-dNP and control groups. For the experiment, tadpoles were fasting for 48 hours followed by a 180-min feeding trial by using a color mixture composed of fluorescent particles (RADGLO® PC25-Red, average particle size: 3µm) and herbivore fish granule (Tetra PlecoMin®). The mixture preparation was blend to a ratio of 1 fluorescent particle to 2 granules (mass/mass) and provided *ad libitum* during experiment. The tadpoles ingested the mixture of colored particles and food, which resulted in a distinctive color mark in the gut (Eklöv and Halvarsson, 2000). After 3 hours of feeding, tadpoles were sacrificed by an overdose of the anesthetic phenoxyethanol and dissected. The amount of ingested food was quantified as the ratio between the mouth-to-colored mark distance and the total length of gut.

Basal metabolic rate

The basal metabolic rate was estimated by the rate of whole body oxygen consumption, measured at 20°C in darkness. Prior to the experiment, tadpoles were starved for two days to ensure that the digestive metabolism did not affect the results. Oxygen content was monitored with an oxymeter (HQ40 HACH™, Dusseldorf, Germany), accuracy ± 0.01 mg O₂/L, before to close the 125 mL chamber of normoxic water, and 5 to 10 h after the chamber was closed, depending on the tadpole size. The period of 5 to 10 h has been tested to ensure that animals were never in hypoxic water (oxygen content < 3 mg O₂/L).

Isolation of mitochondria.

Animals were rinsed with water and anesthetized few minutes in an ice-cold isolation medium (10 mM tris-HCl, 10 mM maleic acid, 600 mM mannitol, 2mM EGTA, 1mM EDTA, 0.5 mM Na₂HPO₄, 2% free fatty acid bovin serum albumin, pH 7.4 at 4°C). Mitochondria were isolated by differential centrifugation using a percoll density gradient from pooled tadpoles (up to 10 g of tadpoles per preparation), with all steps being carried out at 4°C. Tadpoles were homogenized with a Potter–Elvehjem homogenizer (three passages). Following centrifugation (800×g, 10 min) the pellet was resuspended and recentrifuged (800×g, 10 min). The two supernatants were pooled, and spun at 1,000×g for 10 min. The supernatant was filtered through cheesecloth and centrifuged at 8,700×g for 10 min. The pellet was resuspended in 15% Percoll made up in isolation medium, layered onto a preformed gradient of 23% and 40% Percoll as described by Sims and Anderson (2008), and centrifuged at 31,000×g for 5 min. The material at the interface of the 23% and 40% percoll layers was removed by pipette, diluted 1:4 with isolation medium and centrifuged at 16,000×g for 10 min. Supernatant was removed without disturbing the resultant fluffy pellet, the pellet was diluted 3-fold with isolation medium and centrifuged at 8,700×g for 10 min. Finally, the pellet was stored in 200 µL of ice-cold isolation medium. Protein concentration was measured at 540 nm using the Biuret method with bovine serum albumin as a standard. The tadpole mitochondrial preparations contained a dark pigment which absorbed at 540 nm, therefore the absorbance of the same volume of mitochondria in water containing 0.6% deoxycholate and 3% NaOH was subtracted.).

Mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation efficiency.

Mitochondrial oxygen consumption was measured with a Clark oxygen electrode (Rank Brother LTD), in a closed and stirred glass cell of 250µL volume, thermostatically controlled at 20°C. Tadpoles mitochondria (3 mg protein/mL) were incubated in a respiratory medium containing 20 mM Tris-Base, 650 mM Mannitol, 0.5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 5

mM KH_2PO_4 , 1% free fatty acid bovine serum albumin (w/v), pH 7.4 at 20°C. Succinate (5 mM) was used as respiratory substrate in the presence of 5 μM rotenone. The active state of respiration (state 3) was initiated by the addition of 1 mM ADP. The basal non-phosphorylating respiration rate (state 4) was obtained by the addition of 2.5 $\mu\text{g/mL}$ of oligomycin. A second set of experiments was conducted with 0.5 mM N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) and 4 mM ascorbate as substrate in order to measure the maximal respiration rate associated with isolated cytochrome-c oxidase activity. The respiratory control ratio (RCR) refers to the ratio of oxygen consumed after adding ADP to that consumed in the presence of oligomycin.

The mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency was determined from the rate of ATP synthesis and oxygen consumption of isolated tadpole mitochondria (3 mg/mL) respiring on succinate (5 mM plus 5 μM rotenone) in the respiratory medium supplemented with an ADP-regenerating system consisting of 1.5 U/mL hexokinase, 20 mM glucose and two different concentrations of ADP (20 μM or 200 μM) as previously described (Rigoulet et al., 1998; Nogueira et al., 2001; Clerc et al., 2007; Salin *et al.*, 2010; Teulier *et al.*, 2010).

Oxidative balance

The peroxide anion (O_2^-) is the radical oxygen species generated by mitochondria and its dismutation produces hydrogen peroxide (H_2O_2), the molecule that is usually assayed to measure ROS mitochondrial production. The respiratory medium (200 μl) was supplemented with 1 U horseradish peroxidase, 10 μM Amplex red reagent and 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ mitochondrial protein was given at the start of the detection (Zhou *et al.*, 1997). Succinate (5 mM) was used as respiratory substrate. Fluorescence was measured at 20°C using a fluorescence spectrophotometer (Xenius, SAFAS Monaco) at excitation and emission wavelengths of 563 and 587 nm, respectively. The fluorescent signal was calibrated by standard curve prepared with H_2O_2 (20 to 400 nM) at each measurement.

The total antioxidant capacities of tadpoles were determined by using commercially available kits (706001 Antioxidant Assay Kit, Cayman Chemical). Frozen tadpoles were homogenized with a mixer mill (30 Hz; 120 sec) (Retsch MM200; Fisher Bioblock Scientific) in a buffer containing 5 mM potassium phosphate, 0.9% sodium chloride, 0.1% glucose (pH 7.4). All procedures were in conformity to the manufacturer's instructions. The capacities of

the antioxidants in the sample were expressed as unit equivalent trolox concentration per milligram of fresh mass.

Thiobarbituric acid reactive substances are an index of lipid peroxidation and oxidative stress. Frozen tadpoles were homogenized with a mixer mill (30 Hz; 120 sec) (Retsch MM200; Fisher Bioblock Scientific) in a buffer containing 100 mM KH_2PO_4 , 0.05% BSA, 10 mM EDTA, 0.13 mM butylated hydroxytoluene and 0.13 mM deferoxamine (pH 7.4). Tadpole lipid peroxides content was assessed spectrophotometrically at 540 nm, measuring the malondialdehyde (MDA) as an index of thiobarbituric acid-reactive products (TBARs) following the method described by Ohkawa *et al.* (1979). Results are expressed in nmol MDA/mg fresh mass of tadpoles.

Statistical Analysis

The effects of treatment, exposition duration (16 days and 34 days of exposure) and their interaction on larval performances and basal metabolism were analyzed using linear models of analyses of variances. Because we measured others variables (biochemical variables) only at 34 days, the treatment effect has been analyzed using Student *t* test. Statistical analyses were performed with JMP software (version 7.0.1).

RESULTS

Larval performances

As compared to controls, exposure to 2,4-dNP reduced the tadpoles developmental rate in a time duration manner, the longer the exposure to 2,4-dNP the higher negative effect on development was observed ($F_{1, 76}=17.27$, $P < 0.001$, Fig. 1A). After 16 days of treatment, the 2,4-dNP group showed a lower body mass than control group, whereas at 34 days of treatment, the trend was inverted ($F_{1, 76} = 27.65$, $P < 0.001$, Fig. 1B). These differences in body masses were explained by differences in the developmental rate of tadpoles, no statistical significant effect of the treatment upon the body weight corrected for developmental stage was found ($F_{1, 73} = 1.74$, $P = 0.19$). In other words, the development rate is reduced by 2,4-dNP exposure but for the same larval state, body weights were equivalent in both groups. Hence, the observed differences in body weight of 2,4-dNP-treated tadpoles were due to a delay in the rate of development.

Tadpoles energy input

Food consumption was not affected by 2,4-dNP treatment ($n = 17 - 20$; 16-days treated: control = $1.47\% \pm 0.37$; 2,4-dNP = $1.47\% \pm 0.35$ of colored length of gut; 34-days treated: control = $1.69\% \pm 0.38$; 2,4-dNP = $1.68\% \pm 0.39$ of colored length of gut; ; $F_{1,70} = 0.00$; $P = 0.97$). 2,4-dNP-treated tadpoles displayed a higher rate of oxygen consumption than control ones ($F_{1,75} = 45.97$; $P < 0.001$, , Fig. 1C), irrespective of the duration of exposure ($F_{1,75} = 0.07$; $P = 0.80$).

Mitochondrial oxidative phosphorylation activity and efficiency

Table 1 reports respiratory characteristics of tadpole mitochondria. Rates of oxygen consumption during maximal ADP-stimulated (state 3) and resting (state 4 in the presence of oligomycin) states were on average 1.8-fold higher in 2,4-dNP-treated than in control (state 3

: $t_{18} = -2.56$, $P < 0.05$ and state 4, $t_{17} = -2.70$, $P < 0.05$). The activity of the mitochondrial cytochrome-c oxidase was almost doubled in 2,4-dNP treated as compared with control group ($t_{18} = -2.86$, $P < 0.05$; Table 1). The respiratory control ratio, i.e. the state 3-to-state 4 ratio, was not significantly different between experimental groups ($n = 9$; control = 3.6 ± 0.6 and 2,4-dNP-treated = 3.9 ± 0.6 , $t_{16} = -0.37$; $P = 0.72$).

Figure 2 shows the linear relations between the rates of ATP synthesis and oxygen consumption in tadpole mitochondria working at different steady-state rates of ATP production. After 34 days of 2,4-dNP treatment, the linear relation concerning the 2,4-dNP-treated group was shifted to the right compared to control. This means that mitochondria from 2,4-dNP-treated group had to consume a higher quantity of oxygen for any given amount of ATP synthesized, the yield of oxidative phosphorylation was therefore clearly decreased in 2,4-dNP-treated tadpoles. Nevertheless, the slopes values of the linear relations shown in Fig. 2 were slightly but not significantly different between 2,4-dNP-treated ($\text{ATP/O} = 1.17 \pm 0.06$) and control tadpoles ($\text{ATP/O} = 1.37 \pm 0.07$; $t_{18} = 0.79$, $P = 0.44$, Fig. 2). Additionally and in accordance with the respiratory parameters reported above, maximal rates of oxygen consumption and ATP synthesis, the highest points to the right of the linear relation, tended to be increased by 2,4-dNP treatment (+63% and +38%, respectively) when compared with corresponding control values ($t_{18} = -2.04$, $P = 0.06$ and $t_{18} = -1.70$, $P = 0.11$, respectively). In the presence of oligomycin, the non-phosphorylating respiration rate, the lowest point to the left of the linear relation, was significantly higher in 2,4-dNP tadpole than in control mitochondria (+88%, $t_{18} = -2.50$; $P < 0.05$, Fig. 2). Again, respiration control ratios (RCR) were not significantly different between groups (3.9 ± 0.5 in control and 3.4 ± 0.4 in 2,4-dNP group respectively, $t_{18} = 0.79$; $P = 0.44$).

Oxidative balance

Table 2 shows the overall results of the physiological parameters describing the tadpole oxidative balance, including the mitochondrial production of free oxygen radicals (H_2O_2), the total antioxidant capacities, and the damage related to oxidative stress (lipid peroxides). The endogenous H_2O_2 generation was lower in 2,4-dNP mitochondria than in control ones ($t_{18} = 2.39$; $P < 0.05$). Tadpoles total antioxidant capacities showed a clear tendency to decrease at 34 days of 2,4-dNP exposure in comparison to control group

($t_{34}=1.82$, $P = 0.08$). Finally, lipid oxidative damage estimated by the malondialdehydes content was 47% lower in 2,4-dNP than in control tadpoles ($t_{27} = 3.92$, $P < 0.001$).

DISCUSSION:

In the present work, we aimed at providing better understanding on the proximate mechanisms that might underlie life-history traits. We experimentally modulated *in vivo* the rate of mitochondrial ROS generation and ATP synthesis of tadpoles. Our data show that the chronic treatment with 2,4-dNP negatively impacted larval development and growth of tadpoles and this despite an increase in metabolic rate and mitochondrial activity, and a reduction in both ROS generation, antioxidants mechanism and oxidative. From these results, we suggest that the mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency would be an important proximate factor able to constrain life-history trajectories.

Most studies on proximal factors of life-history trade offs suggest that the ROS production is related to the different components of animal life-history like (i) the cost of sustained growth (Metcalfé and Monaghan, 2003; Alonso-Alvarez et al. 2007, De Block and Stoks, 2008; Costantini et al. 2010; Kim et al. 2011) and (ii) the proximate cost of reproduction (Alonzo-Alvarez et al. 2004; Metcalfé and Alonzo-Alvarez, 2010). Thus, ROS could constitute a primary and universal constraint in life-history evolution (Dowling and Simmons, 2009; Monaghan et al. 2009; McGraw et al. 2010). During oxidative phosphorylation processes, rate of mitochondrial ROS generation is strongly sustained by a reduced state of the electron transport chain and a high inner membrane potential (Boveris et al., 1976; Korshunov et al., 1997; Barja, 2007). Hence, an increased proton flux across the inner membrane via the F₀F₁-ATP synthase (state 3 respiration) or other proton leak pathways such as uncoupling proteins or mitochondrial uncouplers, including the protonophore 2,4-dNP, would attenuates ROS production by lowering the membrane potential (Korshunov et al., 1997; Brand, 2005; Rey et al., 2010). The decreased ROS generation found in 2,4-dNP treated tadpoles are thus in accordance with previously reported data in isolated mitochondria, organ or whole animal (Okuda et al., 1992; Batandier et al., 2006; da Silva et al., 2008). Interestingly, chronically treated tadpoles exhibited a better oxidative status, i.e. lower generation of ROS and lipid oxidative damage, together with a reduced investment in antioxidant defenses. Despite, this “positive antioxidant effect” of 2,4-dNP treatment, the development of tadpoles was slower than those in control group, suggesting that the proximate cost of oxidative balance *per se* was not strong enough to constrain this life-history trait, at least in the present mild uncoupled tadpoles.

Another aspect of 2,4-dNP-induced mild mitochondrial uncoupling is the increased cost of mitochondrial ATP production that could ultimately decrease the cellular availability of ATP (Sibille et al., 1995; Geelen et al., 2008). Thus a decrease in energy availability could well explain the lower rate of growth and development found in 2,4-dNP-treated tadpoles. Nevertheless, the decreased oxidative phosphorylation efficiency of mitochondria from 2,4-dNP tadpoles was balanced by an increase in the rate of oxygen consumption and in mitochondrial cytochrome c oxidase activity. This increased oxidative activity was associated with a trend towards increasing the rate of ATP synthesis, showing that the activity of the whole oxidative phosphorylation processes was improved by 34 days of 2,4-dNP treatment. As previously reported in cell systems or transgenic animals (Li et al., 1999; Rossmeisl et al., 2002; Desquiret et al., 2006; Rohas et al., 2007), it clearly appears here that chronic mild mitochondrial uncoupling has driven metabolic adjustment of tadpoles towards increased oxidative metabolism.

Although such response would enhance the ability of mitochondria to produce ATP and so to fulfill cells with useable energy, it failed to counteract the slow pace of development of 2,4-dNP-treated tadpoles. Hence, the cost of ATP production rather than the rate of ATP synthesis appears to constrain the development of tadpoles in the present study. It is clear that exposure to 2,4-dNP decreased the mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency, implying that for any given amount of ATP produced, mitochondria have to consume a higher amount of oxygen (Fig. 2). At the level of tadpoles, all of the cellular energy-demanding processes would therefore require an increased energy input (energetic substrates, oxygen consumption) in the presence of 2,4-dNP, increasing the overall energetic cost of living. This is clearly illustrated by the higher basal metabolic rate of animals chronically exposed to 2,4-dNP during 16-days or 34-days (Fig. 1C), demonstrating that the energetic cost of living was indeed increased. In this context, as in 2,4-dNP-treated mice (da Silva et al., 2008), mild uncoupled tadpoles did not increase their food consumption, and thus failed to compensate from the energy loss elicited by the decrease in the efficiency of ATP production process.

Overall, our results indicate that treatment with low doses of 2,4-dNP promoted beneficial effects on animal oxidative balance and mitochondrial maximal oxidative phosphorylation activity. Yet, the decreased efficiency of mitochondrial energy conversion leads to increase the energy cost of living, resulting in negative impact in development and growth. Contrary to expectations of numerous studies, oxidative stress, by itself, does not appear to be a physiological constraint to the growth rate. The present study therefore

suggests that the efficiency of mitochondrial energy transduction was an important parameter that had constrained growth and development of tadpoles. In conclusion, acceding the mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency appears as promising way to deeply understand the proximate factors that may shape the pattern of life history traits. Furthermore, traits such as size and duration of metamorphosis are often used as indicators of the effects of the larval period on the future fitness for organisms with complex life cycles (Altwegg and Reyer, 2003; Ficetola and De Bernardi, 2006; Van Allen et al., 2010). Future studies are need to clarify whether alteration of mitochondrial efficiency in the adult stage affect the different component of individual fitness, by measuring size and age at first breeding, fecundity, number and size of eggs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present investigation was carried out according to the ethical principles of the French Ministry of agriculture and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Scientific Purposes (Council of Europe, n°. 123, Strasbourg). This work was supported by the Center National de la Recherche Scientifique and the University of Lyon.

REFERENCES

- Ackermann, M., Bijlsma, R., James, A. C., Partridge, L., Zwaan, B. J. and Stearns, S. C.** (2001). Effects of assay conditions in life history experiments with *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 199-209.
- Agency for Toxic Substances and Disease** (1995). Toxicological Profile for Dinitrophenols. United States Department of Health and Human Services, Division of Toxicology/Toxicology Information Branch, Atlanta, United States, 1-233.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Chastel, O. and Sorci, G.** (2006). An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. *Evolution* **60**, 1913-1924.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B. and Sorci, G.** (2004). Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters* **7**, 363-368.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Faivre, B. and Sorci, G.** (2007). Increased susceptibility to oxidative damage as a cost of accelerated somatic growth in zebra finches. *Functional Ecology* **21**, 873-879.
- Altwegg, R. and Reyer, H. U.** (2003). Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution* **57**, 872-882.
- Balaban, R. S., Nemoto, S. and Finkel, T.** (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-495.
- Barja, G.** (2007). Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: Implications for aging studies. *Rejuvenation Research* **10**, 215-223.
- Batandier, C., Guigas, B., Detaille, D., El-Mir, M. Y., Fontaine, E., Rigoulet, M. and Leverve, X. M.** (2006). The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **38**, 33-42.
- Boveris, A., Cadenas, E. and Stoppani, A. O. M.** (1976). Role of Ubiquinone in Mitochondrial Generation of Hydrogen-Peroxide. *Biochemical Journal* **156**, 435-444.
- Brand, M. D.** (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology* **35**, 811-820.

Brand, M. D. (2005). The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochemical Society Transactions* **33**, 897-904.

Clerc, P., Rigoulet, M., Leverve, X. and Fontaine, E. (2007). Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **39**, 158-166.

Cody, M. L. (1966). A General Theory of Clutch Size. *Evolution* **20**, 174-184.

Costantini, D., Carello, L. and Fanfani, A. (2010). Relationships among oxidative status, breeding conditions and life-history traits in free-living Great Tits *Parus major* and Common Starlings *Sturnus vulgaris*. *Ibis* **152**, 793-802.

da Silva, C. C. C., Cerqueira, F. M., Barbosa, L. F., Medeiros, M. H. G. and Kowaltowski, A. J. (2008). Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell* **7**, 552-560.

De Block, M. and Stoks, R. (2008). Compensatory growth and oxidative stress in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **275**, 781-785.

Desquiret, V., Loiseau, D., Jacques, C., Douay, O., Malthiery, Y., Ritz, P. and Roussel, D. (2006). Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1757**, 21-30.

Dowling, D. K. and Simmons, L. W. (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **276**, 1737-1745.

Eklöv, P. and Halvarsson, C. (2000). The trade-off between foraging activity and predation risk for *Rana temporaria* in different food environments. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **78**, 734-739.

Emel'yanova, L. V., Savina, M. V., Belyaeva, E. A. and Brailovskaya, I. V. (2007). Peculiarities of functioning of liver mitochondria of the river lamprey *Lampetra fluviatilis* and the common frog *Rana temporaria* at periods of suppression and activation of energy metabolism. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* **43**, 564-572.

Ficetola, G. F. and De Bernardi, F. (2006). Trade-off between larval development rate and post-metamorphic traits in the frog *Rana latastei*. *Evolutionary Ecology* **20**, 143-158.

Geelen, M. J. H., Harris, R. A. and Van den Bergh, S. G. (2008). Enigmatic effect of cellular ATP on fatty acid biosynthesis Stimulation by moderate decrease and inhibition by increase of cellular ATP. *FEBS Letters* **582**, 2242-2246.

Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification, vol. 16, pp. 183-190: JSTOR.

Harman, D. (1956). Aging - a Theory Based on Free-Radical and Radiation-Chemistry. *Journals of Gerontology* **11**, 298-300.

Heise, K., Puntarulo, S., Portner, H. O. and Abele, D. (2003). Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **134**, 79-90.

Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R. and Buttemer, W. A. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals, vol. 87, pp. 1175: Am Physiological Soc.

Jezek, P. and Hlavata, L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **37**, 2478-2503.

Kim, S. Y., Noguera, J. C., Morales, J. and Velando, A. (2011). Quantitative genetic evidence for trade-off between growth and resistance to oxidative stress in a wild bird. *Evolutionary Ecology* **25**, 461-472.

Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. and Starkov, A. A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters* **416**, 15-18.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cosx, M. M. (1993). Principles of Biochemistry, (ed. N. Y. 2nd ed., NY.): Worrth Publishers.

Li, B., Holloszy, J. O. and Semenkovich, C. F. (1999). Respiratory uncoupling induces delta-aminolevulinate synthase expression through a nuclear respiratory factor-1-dependent mechanism in HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 17534-17540.

McGraw, K. J., Cohen, A. A., Costantini, D. and Horak, P. (2010). The ecological significance of antioxidants and oxidative stress: a marriage between mechanistic and functional perspectives. *Functional Ecology* **24**, 947-949.

Metcalf, N. B. and Alonso-Alvarez, C. (2010). Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Functional Ecology* **24**, 984-996.

Metcalf, N. B. and Monaghan, P. (2003). Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology. *Experimental Gerontology* **38**, 935-940.

Monaghan, P., Metcalfe, N. B. and Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* **12**, 75-92.

Nogueira, V., Piquet, M. A., Devin, A., Fiore, C., Fontaine, E., Brandolin, G., Rigoulet, M. and Leverve, X. M. (2001). Mitochondrial adaptation to in vivo polyunsaturated fatty acid deficiency: Increase in phosphorylation efficiency. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **33**, 53-61.

Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979). Assay for Lipid Peroxides in Animal-Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry* **95**, 351-358.

Okuda, M., Lee, H. C., Kumar, C. and Chance, B. (1992). Comparison of the Effect of a Mitochondrial Uncoupler, 2,4-Dinitrophenol and Adrenaline on Oxygen Radical Production in the Isolated Perfused-Rat-Liver. *Acta Physiologica Scandinavica* **145**, 159-168.

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 Physiology* **10** :5.

Rigoulet, M., Leverve, X., Fontaine, E., Ouhabi, R. and Guerin, B. (1998). Quantitative analysis of some mechanisms affecting the yield of oxidative phosphorylation: Dependence upon both fluxes and forces. *Molecular and Cellular Biochemistry* **184**, 35-52.

Robert, K. A. and Bronikowski, A. M. (2010). Evolution of Senescence in Nature: Physiological Evolution in Populations of Garter Snake with Divergent Life Histories. *American Naturalist* **175**, E47-159.

Rohas, L. M., St-Pierre, J., Uldry, M., Jager, S., Handschin, C. and Spiegelman, B. M. (2007). A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 7933-7938.

Rossmeisl, M., Barbatelli, G., Flachs, P., Brauner, P., Zingaretti, M. C., Marelli, M., Janovska, P., Horakova, M., Syrový, I., Cinti, S. et al. (2002). Expression of the uncoupling protein 1 from the aP2 gene promoter stimulates mitochondrial biogenesis in unilocular adipocytes in vivo. *European Journal of Biochemistry* **269**, 19-28.

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

Sibille, B., Keriél, C., Fontaine, E., Catelloni, F., Rigoulet, M. and Leverve, X. M. (1995). Octanoate Affects 2,4-Dinitrophenol Uncoupling in Intact Isolated Rat Hepatocytes. *European Journal of Biochemistry* **231**, 498-502.

Sims, N. R. and Anderson, M. F. (2008). Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nature Protocols* **3**, 1228-1239.

Sokolova, I. M. (2004). Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia : Ostreidae). *Journal of Experimental Biology* **207**, 2639-2648.

Sommer, A. M. and Portner, H. O. (2004). Mitochondrial function in seasonal acclimatization versus latitudinal adaptation to cold in the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Physiological and Biochemical Zoology* **77**, 174-186.

Speakman, J. R. (2005). Body size, energy metabolism and lifespan. *Journal of Experimental Biology* **208**, 1717-1730.

Stearns, S. C. (1992). The evolution of life histories: Oxford university press.

Teulier, L., Rouanet, J. L., Letexier, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rey, B., Duchamp, C. and Roussel, D. (2010). Cold-acclimation-induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency. *Journal of Experimental Biology* **213**, 2476-2482.

Van Allen, B. G., Briggs, V. S., McCoy, M. W. and Vonesh, J. R. (2010). Carry-over effects of the larval environment on post-metamorphic performance in two hyliid frogs. *Oecologia* **164**, 891-898.

Wallace, K. B. and Starkov, A. A. (2000). Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **40**, 353-388.

Zera, A. J. and Harshman, L. G. (2001). The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**, 95-126.

Zhou, M. J., Diwu, Z. J., PanchukVoloshina, N. and Haugland, R. P. (1997). A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochemistry* **253**, 162-168.

FIGURE LEGENDS

Table 1: Effects of 2,4-dinitrophenol treatment on mitochondrial oxygen consumption rate for control and 2,4-dNP-treated tadpoles under different conditions: maximal phosphorylating respiration, state 3, basal non-phosphorylating respiration, state 4, and the maximal mitochondrial oxidative capacities, the oxygen consumption of isolated cytochrome c oxidase. The experimental conditions are described in *matériel and methods*. Results are means \pm S.E.M. (n=9-10). * indicates significant differences between tadpole groups for $P < 0.05$.

Table 2: Effects of 2,4-dinitrophenol treatment on oxidative balance parameters: mitochondrial pro-oxidant molecule generation, the ability of total antioxidants molecules to prevent from the oxidation of ROS and an index of oxidative injuries, malondialdehyde content, measured in tadpoles. Results are means \pm S.E.M. (n=10-18). * indicates significant differences between tadpole groups for $P < 0.05$.

Figure 1: Effect of 2,4-dinitrophenol treatment on developmental stages (**A**) according to Gosner (1960), body masses (**B**) and basal metabolic rates at 20°C (**C**) in tadpoles before treatment (0 days of exposure), and after 16 and 34 days of treatment. Results are means \pm S.E.M. (n=19-20). * indicates significant differences between tadpole groups for $P < 0.05$ at equivalent time.

Figure 2: Oxidative phosphorylation efficiency for 2,4-dinitrophenol treated tadpoles (black circles) and control group (open circles). Oxygen consumption and ATP synthesis were measured at different concentrations of ADP: 20 μ M, 200 μ M, and 200 μ M in presence of 2.5 μ g/mL oligomycin. The experimental conditions are described in *matériel and methods*. Results are means \pm S.E.M. (n=9-10).

Table 1

Mitochondrial oxygen consumption (nmol O.min ⁻¹ .mg ⁻¹ mitochondrial protein)	ol	Contr	2,4-dinitrophenol- treated
ADP-stimulated respiration (State 3)	3.1	16.4 ±	32.0 ± 5.2 *
Oligomycin insensitive respiration (State 4)	0.9	4.4 ±	8.5 ± 1.2 *
Cytochrome-c oxidase activity	±4.8	24.5	48.0 ± 6.7 *

Table 2

Oxidative balance	Control	2,4-dinitrophenol-treated
Mitochondrial H ₂ O ₂ production (pmol/min.mg protein)	25.2 ± 2.3	18.7 ± 1.5 *
Total antioxidant activity (mM trolox/g BW)	79.7 ± 13.5	53.3 ± 5.3
Malondialdehyde content (nmol MDA/g BW)	4.4 ± 0.5	2.3 ± 0.2 *

Figure 1

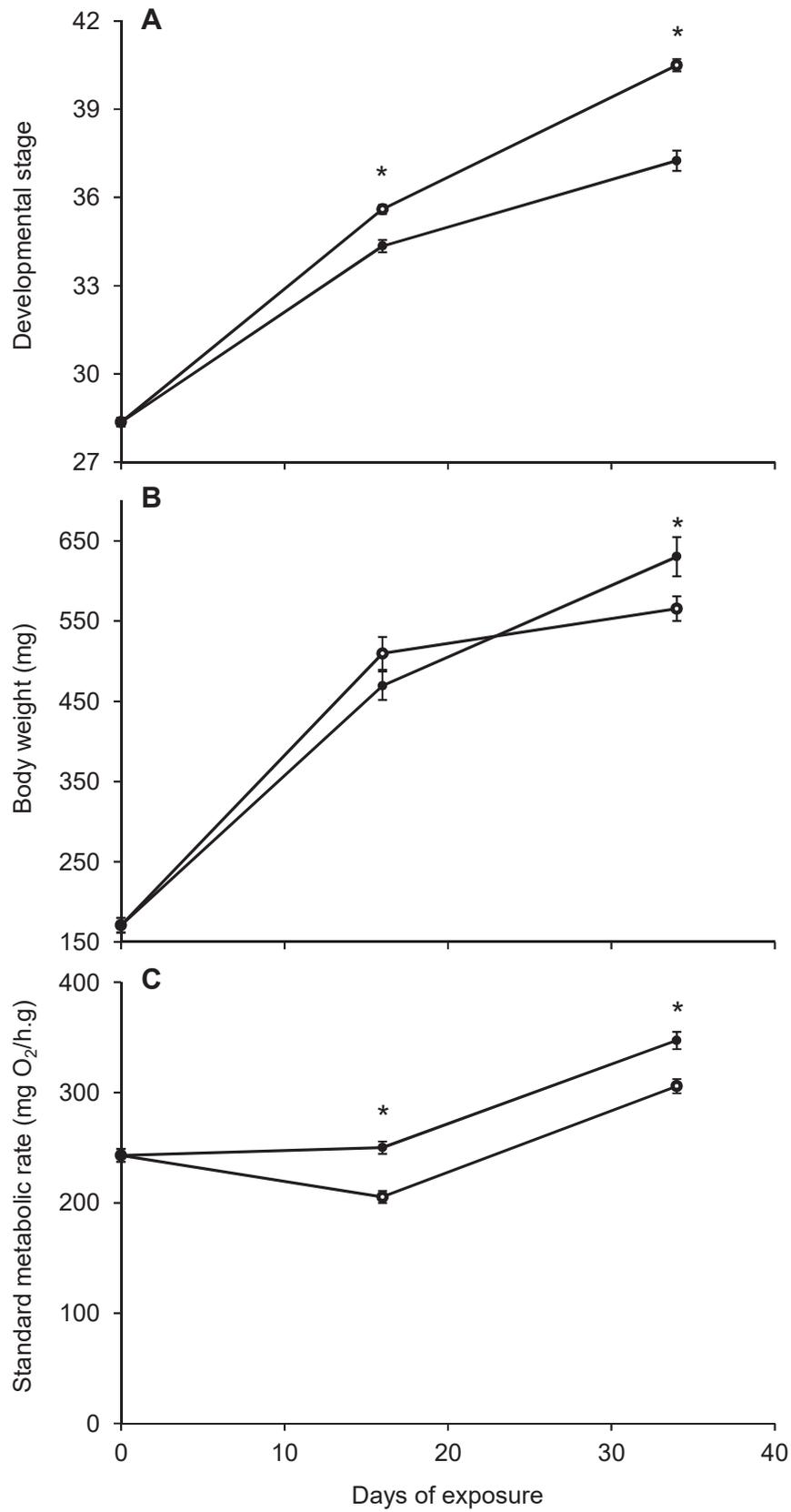
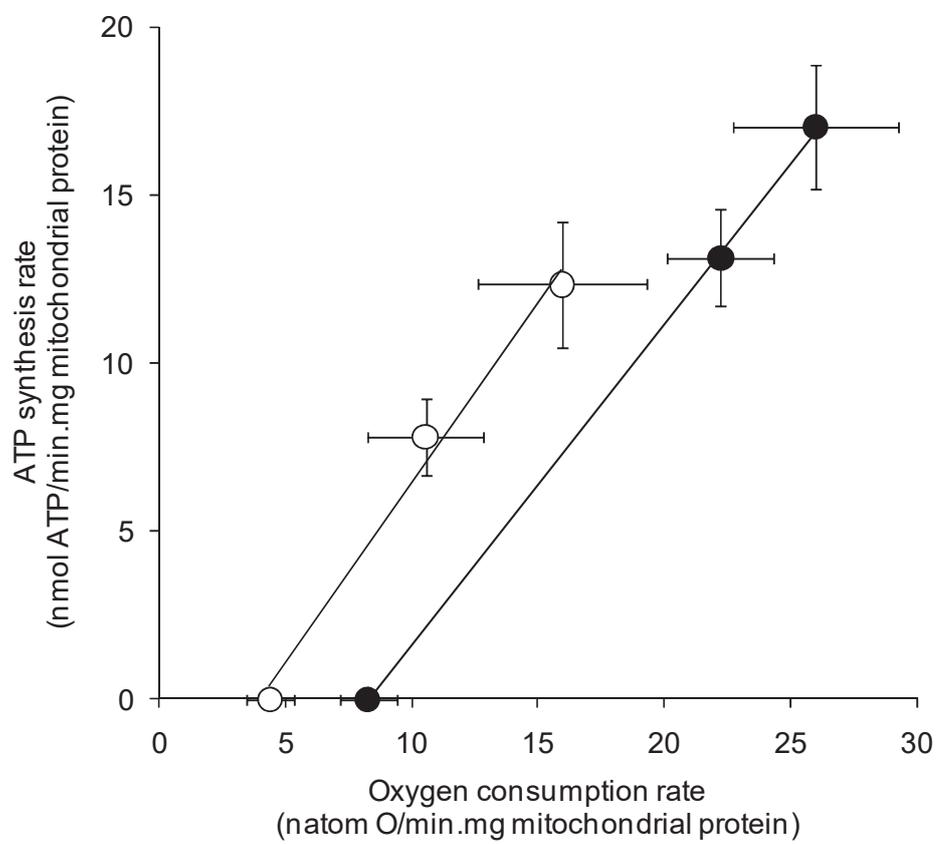


Figure 2



Appendix 1: Analyses of covariance of effect period (after 16 and 34 days of exposure), treatments (water and ethanol) and their interaction on larval development stage, body weight and metabolic rate.

<i>Factors</i>	Stage	VO₂	Masse
<i>Period</i>	F _{1,74} =514.506 P<0.001	F _{1,73} =200.008 P<0.001	F _{1,73} =8.288 P=0.005
<i>Treatment</i>	F _{1,74} =0.755 P=0.387	F _{1,73} =0.194 P=0.661	F _{1,73} =0.0001 P=0.992
<i>Periode * Treatment</i>	F _{1,74} =0.590 P=0.448	F _{1,73} =2.022 P=0.159	F _{1,73} =0.0187 P=0.890

Appendix 2: Statistical analyses of effect on ethanol treatment on tadpole parameters. Variables have been measured only at 34 of exposure; the treatment effect has been analyzed using Student t test.

<i>Factors</i>	df	t	P
<i>Mitochondrial oxygen consumption at state 3</i>	16	0.55	0.59
<i>Mitochondrial oxygen consumption at state 4</i>	16	0.00	0.95
<i>Mitochondrial cytochrome c oxidative activity</i>	16	1.44	0.17
<i>Respiratory Control Ratio</i>	16	1.14	0.27
<i>Slope of the linear relation ATP/O</i>	16	1.52	0.14
<i>Mitochondrial oxygen consumption at state 3 (in presence of glucose/hexokinase)</i>	16	0.62	0.54
<i>Mitochondrial oxygen consumption at state 4 (in presence of glucose/hexokinase)</i>	16	0.52	0.61
<i>Mitochondrial ATP synthesis at state 3</i>	16	0.10	0.93
<i>Mitochondrial ROS generation</i>	16	0.72	0.48
<i>Lipid oxidative damage</i>	24	0.56	0.58
<i>Total antioxidant capacities</i>	29	0.55	0.59

Discussion et Perspectives

Le concept de compromis évolutif est central à la compréhension de l'évolution des histoires de vie. Les compromis sont le plus souvent considérés en termes d'allocation en situation de ressources limitantes. Ainsi, l'allocation de ressources pour un trait a des conséquences négatives pour d'autres traits nécessitant la même ressource. Néanmoins, les compromis peuvent également se réaliser comme une conséquence de l'activité en faveur d'une performance générant des impacts négatifs sur les autres traits (De block et Stock, 2008 ; Isaksson et al., 2011). Le mécanisme candidat qui pourrait être la base du second type de compromis, et pour lequel l'écologie évolutive manifeste depuis peu un grand attrait, est le stress oxydatif.

L'objectif de la thèse a donc été de mettre en évidence les mécanismes physiologiques à la base des compromis entre les traits d'histoire de vie. Pour cela, nous nous sommes concentrés sur l'implication des mitochondries, centrales énergétiques de la cellule et sources de stress oxydatif, comme clé de voûte possible dans le contrôle des histoires de vie. Les paramètres mitochondriaux ont alors été réintégrés dans un schéma plus large, incluant le flux énergétique et la balance oxydative.

Ainsi, les processus physiologiques sous jacents aux taux de croissance ont été abordés par deux approches complémentaires. Le volet descriptif a permis une exploration des caractéristiques physiologiques entre populations sauvages de grenouilles rousses *Rana temporaria* présentant naturellement des patrons d'histoire de vie différents chez des populations extrêmement proches géographiquement. Nous avons ainsi pu mettre en corrélation des variables à la fois énergétiques et oxydatives et le taux de croissance chez des animaux provenant de milieu naturel. Tandis que l'approche expérimentale a consisté à affecter les caractéristiques mitochondriales de têtards de *Rana temporaria* par l'exposition chronique de dinitrophénol (un protonophore), permettant ainsi d'éclaircir l'impact du fonctionnement mitochondrial sur le développement et la croissance larvaire.

1 Synthèse et discussion des résultats

1.1 Variation dans la croissance

Le taux de croissance constitue une caractéristique fondamentale de la valeur sélective des organismes, et tout particulièrement chez les amphibiens. En effet, que ce soit aux stades embryonnaire, post-embryonnaire, juvénile ou adulte, la vitesse de croissance et la taille corporelle sont des paramètres très importants pour la survie de l'organisme mais également pour son succès reproducteur. Chez les adultes, une femelle de taille élevée aura une meilleure fécondité et / ou des œufs de qualité supérieure (Arendt, 1997). Par ailleurs, chez de nombreuses espèces, la maturité sexuelle n'est permise qu'à partir d'une certaine taille. Dans notre étude, les individus des deux populations atteignent la maturité sexuelle au même âge ; la croissance ralentie n'affecte donc pas leur maturité sexuelle. Il est important de noter que chez les amphibiens, les facteurs taille et développement sont souvent associés, et leur interaction a été largement étudiée au stade têtard. En effet, de nombreuses études portant sur la plasticité développementale des larves d'amphibiens ont mis en évidence un compromis entre développement et croissance jusqu'à la métamorphose (Denver, 1997 ; Altwegg et Reyer, 2003). En condition stressante, comme par exemple en présence de prédateurs ou lors d'une diminution du niveau d'eau (synonyme d'assèchement du point d'eau), les têtards présentent un développement accéléré au détriment de la croissance (Conover et Schultz, 1995 ; Steiner et Van Buskirk, 2009). Ce compromis permet aux animaux de fuir le stress du milieu aquatique rapidement au détriment d'une taille inférieure au stade « grenouillette » (Conover et Schultz, 1995 ; Steiner et Van Buskirk, 2009). Dans notre étude sur le 2,4-dinitrophenol, les animaux traités présentent une croissance et un développement ralentis en comparaison des animaux témoins, comme il a déjà été observé chez des souris traitées au dNP tout au long de leur vie (da Silva et al., 2008). Cependant pour un même stade de développement, les animaux ont la même masse. Cela signifie qu'un compromis développement *versus* croissance ne semble donc pas avoir été induit par notre traitement. Au vu de l'absence d'interaction entre ces deux paramètres dans notre étude, le terme « croissance » sera donc utilisé ici pour croissance & développement.

1.2 Balance oxydative et croissance

1.2.1 Production de ROS et croissance

La théorie du stress oxydatif en écologie est fondée sur le fait qu'investir dans une performance requiert un apport énergétique. Cela signifie qu'une augmentation du métabolisme nécessaire pour alimenter la croissance élevée pourrait générer des pro-oxydant de manière accrue (Metcalfé et Monaghan, 2003). Pourtant, au vu de nos résultats, les grenouilles rousses à croissance élevée présentent des consommations d'oxygène au niveau de l'organisme et au niveau des mitochondries identiques aux grenouilles rousses à croissance lente. Cela s'accompagne d'une production de radicaux libres et d'un potentiel de membrane similaires. Ces résultats mettent en évidence l'absence de relation de cause à effet entre métabolisme de l'organisme et taux de croissance, de même qu'une absence de relation entre génération de ROS et investissement dans la croissance. En revanche, les têtards traités au 2,4-dinitrophénol présentent un ralentissement de croissance associé à une plus faible production de ROS en comparaison aux têtards témoins. Paradoxalement, les têtards à croissance lente montrent une augmentation de leur consommation d'oxygène, qui est donc inversement proportionnelle à la production de ROS. Cette relation est due à l'action découplante du dNP qui induit une augmentation de la perméabilité membranaire (Wallace et Starkov, 2000). Dans ces conditions, la dissipation de la force protonmotrice stimule l'activité oxydative de la chaîne respiratoire et induit une diminution de la production de ROS (Brand, 2000).

→ Dans les populations sauvages, la croissance ne semble donc pas être associée à une production accrue de radicaux libres. Au niveau expérimental, une diminution induite de la génération de pro-oxydants chez les têtards traités au dNP n'améliore pas leur taux de croissance. Ces deux études montrent qu'il n'existe pas de liens forts entre production de radicaux libres et croissance. Par ailleurs, l'étude avec les têtards met également en évidence le fait qu'une augmentation de consommation d'oxygène au niveau de l'organisme entier et des mitochondries n'est pas toujours associée à une augmentation de la production de ROS (Korshunov et al., 1997 ; Brand, 2000).

1.2.2 Défenses anti-oxydantes et croissance

Concernant les défenses anti-oxydantes, dans l'étude décrivant les populations de grenouilles à croissance variable, l'activité de la SOD et de la GPx donnent des résultats contradictoires. Alors que la GPx présente une activité équivalente entre les deux populations de grenouilles, la SOD a une activité plus faible chez les grenouilles de grande taille. Contrairement à l'étude comparative, l'étude expérimentale montre que les capacités de défenses anti-oxydantes totales (enzymatiques et non enzymatiques) des organismes à croissance ralentie étaient moins fortes. Considérant que le dNP réduit la production de ROS mitochondriale, ces résultats suggèrent un ajustement de la balance oxydative en réponse à un faible niveau de production de pro-oxydants.

→ Dans le cas de la comparaison d'animaux disposant naturellement de taux de croissance différents, nous pourrions interpréter qu'une faible capacité de défenses anti-oxydantes, associée à une croissance élevée, pourrait résulter d'un compromis d'allocation des ressources dans la croissance plutôt que dans les défenses (Alonso-Alvarez et al. 2007 ; Isaksson et al., 2011 ; Kim et al., 2011). Dans ce cas de figure, le coût d'une croissance rapide impliquerait des dégâts oxydatifs, comme cela a été observé dans des populations sauvages de moutons par Nussey (2009). Au contraire, la diminution du taux de croissance induite chez les têtards ne semble pas être associée à une augmentation de l'investissement des ressources dans les défenses.

1.2.3 Dégâts oxydatifs et croissance

La mesure des dégâts oxydatifs dans le cadre des populations naturelles de grenouilles soulèvent de nombreuses questions. En effet, deux paramètres ont été pris en compte, sur deux tissus différents, amenant des conclusions divergentes. Les biomarqueurs de génotoxicité des globules rouges révèlent que les taux de dégâts de l'ADN sont identiques entre les deux populations de grenouilles. Le dosage de teneur hépatique en lipides peroxydés montre qu'il y a plus de dégâts oxydatifs chez les grenouilles à croissance lente que chez les

grenouilles à croissance rapide, et ce, indépendamment de l'âge des individus. Ces divergences pourraient s'expliquer par des statuts oxydatifs tissu-spécifiques comme il a déjà été observé dans d'autres études (Andersen et al., 2009). Il serait alors nécessaire de mesurer les autres paramètres de la balance oxydative des hématies (production de ROS et/ou les enzymes anti-oxydantes) pour arriver à des conclusions sur le lien croissance – stress oxydant. Contrairement à l'hypothèse émise ci-dessus, la diminution des défenses oxydatives chez les individus à croissance élevée ne s'accompagne pas d'une augmentation du taux de dégâts oxydatifs, alors que la production de pro-oxydant était équivalente entre les deux populations. Concernant les têtards, les animaux présentant une croissance ralentie montrent un niveau de peroxydation lipidique plus faible, en accord avec une production de pro-oxydants moins forte. En résumé, estimer un taux de dégâts oxydatif en milieu naturel nécessite probablement le dosage de multiples variables des dommages. En effet, l'ampleur des dégâts oxydatifs portés à l'ADN, aux protéines ou aux lipides, n'est pas équivalente puisque cela dépend du tissu considéré mais aussi de l'efficacité des systèmes de réparations pour chaque type de macromolécules.

1.2.4 Bilan interaction balance oxydative et croissance

L'image générale qui émerge de notre jeu de donnée apparaît complexe. Nos résultats montrent deux niveaux de contraintes qui peuvent altérer l'estimation de la balance oxydative, en fonction :

- 1- du nombre de variables mesurées au sein des paramètres de la balance oxydative ;
- 2- du nombre de paramètres estimés.

Dans cette partie de la discussion, les pro-oxydants, anti-oxydants et dégâts oxydatifs seront considérées comme des *paramètres* de la balance oxydatives, chacun d'entre eux étant estimés par le dosage de macromolécules et d'enzymes (SOD, GPx, lipides peroxydés, H₂O₂,...), constituant les *variables* de la balance oxydative.

1.2.4.1 Nombre de variables mesurées

Comme dans notre travail, Robert et Bronikowski (2010) ont étudié l'ensemble des paramètres de la balance oxydative chez des populations sauvages de serpents jarretières *Thamnophis elegans* présentant des patrons d'histoire de vie différents. Les données montrent que les nouveau-nés issus de populations de petits serpents, à durée de vie longue, ont une croissance plus faible, consomment la même quantité d'oxygène et présentent le même taux de dégâts au niveau de l'ADN pour un système de réparation plus efficace et une production de ROS équivalente aux nouveau-nés issus de populations de serpents à durée de vie courte. Dans cette étude, les auteurs concluent qu'une croissance rapide chez les nouveaux nés induit un stress oxydatif à l'origine de la sénescence des organismes en milieu naturel. Cependant, cette étude ne considère qu'une seule variable pour chaque paramètre de la balance oxydative (contenu en H₂O₂, dégâts de l'ADN par la technique des comètes, et l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN suite à un stress UV mesurés sur des hématies). Notre étude, en revanche, montre que les différences observées entre deux populations sauvages pour chaque paramètre de la balance oxydative dépendent du tissu et de la variable considérés. Par exemple, comme Robert et Bronikowski, nous ne trouvons pas de différences de dégâts de l'ADN érythrocytaire alors que le foie présente une teneur en lipides peroxydés variable en fonction des taux de croissance des grenouilles rousses. Même au sein d'un tissu, nos résultats montrent également une discordance des variables pour un paramètre : dans le foie des grenouilles rousses, les activités enzymatiques de la SOD sont différentes alors que celles de la GPx sont équivalentes. L'ambiguïté de nos résultats permet de mettre en évidence que le fait de ne considérer qu'une seule variable d'un paramètre n'est pas suffisant pour émettre une conclusion sur l'état de ce paramètre.

1.2.4.2 Nombre de paramètres estimés

Nos résultats confortent notre choix *a priori* d'estimer la complexité de la balance oxydative en tenant compte de tous les paramètres de cette balance (défenses anti-oxydantes, production de pro-oxydants et dégâts oxydatifs). Dans notre étude descriptive, les grenouilles à croissance lente avaient au niveau hépatique, pour une même production de ROS, plus de dégâts oxydatifs en dépit d'une activité SOD (défense anti-oxydante) plus élevée. Ainsi l'analyse du triptyque pro-oxydants / défenses anti-oxydantes / dégâts oxydatifs dans le foie, nous montre que la considération d'un seul paramètre ne fournit aucune information sur la

tendance des autres paramètres. Si on avait considéré un seul ou même deux des trois paramètres nous serions parvenus à des conclusions radicalement opposées. Par exemple avec une même production de pro-oxydants, une augmentation des dégâts oxydatifs conduit à l'hypothèse d'une diminution des défenses anti-oxydantes. A l'inverse, avec une même production de pro-oxydant, une augmentation des défenses (SOD) conduit à l'hypothèse d'un moindre niveau de dégât. Il apparaît très clairement, que la considération d'un seul paramètre de la balance oxydative ne permet pas de conclure sur les autres paramètres et encore moins sur l'impact du stress oxydatif sur l'organisme.

De plus nos résultats montrent très clairement que pour comprendre la relation entre les variables des différents paramètres, il faut replacer les variables dans leur rôle physiologique. Pour expliquer pourquoi les « petites » grenouilles accumulent des dégâts oxydatifs alors que l'activité de la SOD augmente, il faut comprendre que les enzymes anti-oxydantes fonctionnent de manières coordonnées (Finkel et Holbrook, 2000 ; Dröge, 2002 ; Balaban, 2005). Au niveau de la mitochondrie, la détoxification du superoxyde produit par la chaîne respiratoire dépend des activités coordonnées de la SOD et de la GPx (Figure 27 a). Dans notre étude descriptive, les activités des deux enzymes semblent dissociées (augmentation de la SOD sans changement de l'activité GPx) ce qui conduirait à réorienter une partie de la production de H₂O₂ vers une attaque des macromolécules de la mitochondrie, et finalement à une accumulation plus importante de dégâts oxydatifs (Figure 27 b). La validation de cette hypothèse nécessiterait des mesures de la réaction de Fenton, qui permet la production du radical hydroxyle à partir de peroxyde d'hydrogène, en présence de Fer.

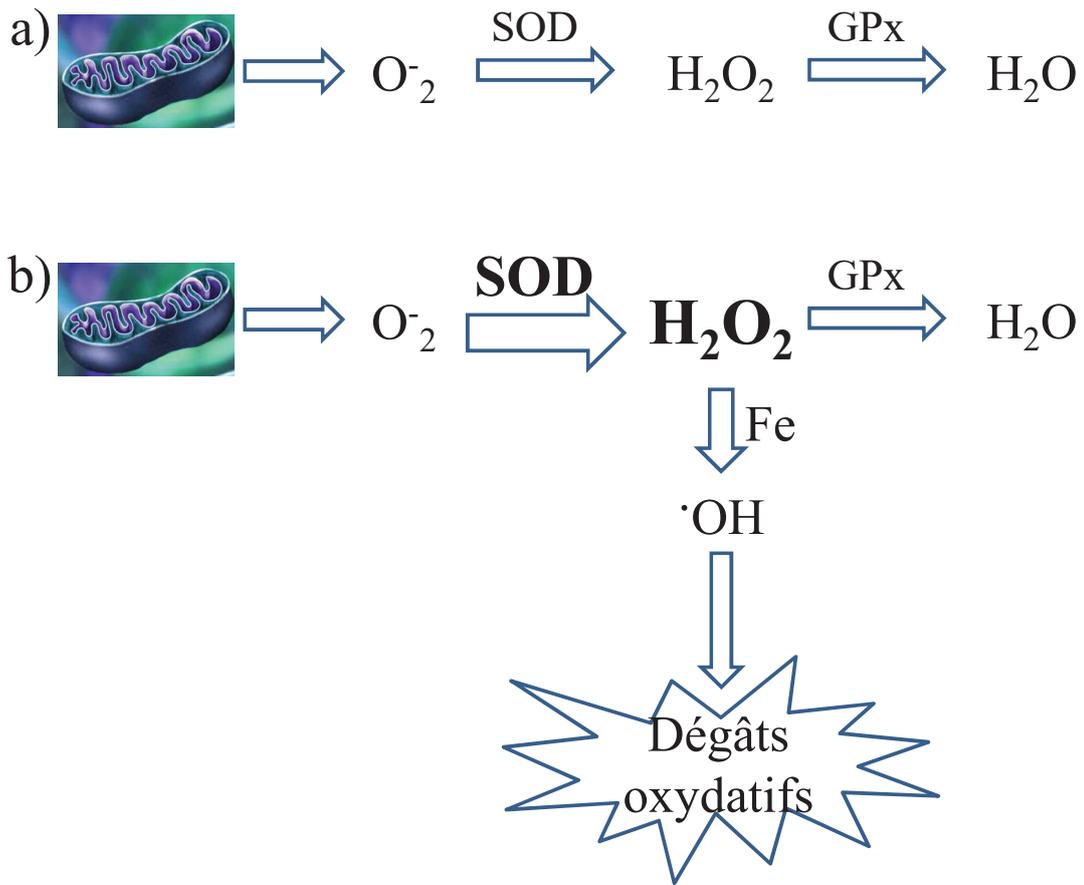


Figure 27 : Voies de détoxification des ROS, pouvant aboutir à des dégâts oxydatifs via la réaction de Fenton (production du radical hydroxyle à partir de peroxyde d'hydrogène, en présence de Fer).

Finalement, analyser la globalité de la balance oxydative apparaît assez complexe. La meilleure solution serait d'analyser l'ensemble des variables impliquées dans les paramètres (pro-oxydants, les anti-oxydants et les dégâts oxydatifs) de la balance oxydative. Cependant, l'importance relative de chaque variable entre elles est aussi une question non négligeable et pourtant jamais abordée.

En conclusion, si notre étude descriptive ne nous permet pas d'interpréter de façon définitive l'impact de la balance oxydative sur la croissance dans notre modèle adulte, l'étude expérimentale montre que le stress oxydatif diminué chez les têtards à croissance lente n'est

pas une contrainte suffisamment forte pour affecter la croissance des organismes ; d'autres facteurs sont à prendre en compte.

1.3 Flux énergétiques et croissance

Intégrer les flux énergétiques pour mieux comprendre les phénomènes d'allocation d'énergie dans les stratégies d'histoire de vie signifie qu'il faut tenir compte (i) des apports du flux énergétique, c'est à dire la quantité de nourriture ingérée (seulement pour l'étude sur les têtards) et la consommation d'oxygène et (ii) de l'efficacité de la mitochondrie à convertir les substrats énergétiques en ATP. Ces deux niveaux d'approche du flux énergétique sont à étudier comme les différentes composantes d'une équation dont les effets sont cumulatifs, et non pas comme deux phénomènes en parallèle.

Les grenouilles à croissance élevée présentent des capacités oxydatives identiques, que ce soit au niveau de l'organisme ou encore au niveau mitochondrial. En revanche, le rendement de conversion énergétique, l'ATP/O est trois fois plus élevé chez les grosses grenouilles que chez les petites grenouilles. Cela signifie que les grenouilles de grande taille ont des flux entrant équivalents mais disposent de trois fois plus d'ATP que les grenouilles de petite taille. Cette énergie peut alors être utilisée pour les performances de l'organisme, dans notre cas, les animaux semblent avoir investi dans la croissance, en réalisant un compromis dans les défenses anti-oxydantes.

Par ailleurs les têtards traités au dNP présentent des consommations d'oxygène aux niveaux de l'animal et mitochondrial plus élevées, comme il a déjà été montré dans des études de traitement au dNP (Padalko, 2005 ; da Silva et al. 2008), ainsi qu'une diminution du rendement énergétique mitochondriale. L'abaissement du rendement a pour conséquence une plus faible production d'ATP pour une même quantité d'oxygène et d'équivalents réduits consommés. Toutefois, cette diminution d'efficacité est accompagnée d'une augmentation des capacités oxydatives et phosphorylantes maximales des mitochondries. Est-ce que cela aurait suffi à contrebalancer les effets du découplage en termes d'apport en ATP ? La mesure de l'ingéré montre que les animaux ne mangent pas plus malgré le traitement avec la molécule découplante. Cela nous laisse supposer qu'*in vivo*, l'apport en substrats énergétiques au niveau de la mitochondrie, c'est à dire en équivalents réduits, est limitant. Ainsi, les effets du

découplage ne seraient pas compensés par l'augmentation des capacités enzymatiques, ce qui résulterait en une restriction des apports en ATP. Ce déficit relatif à l'apport énergétique permettrait d'expliquer le ralentissement de croissance des têtards traités au dNP.

En résumé, l'efficacité de la conversion énergétique (ATP/O) est un paramètre important pour estimer la disponibilité en ATP ($ATP = VO_2 * ATP/O$) pour la cellule, et par conséquent l'énergie disponible pour les traits de l'organisme. Nos résultats montrent que l'ATP/O est un paramètre du flux énergétique capable de contraindre les traits d'histoire de vie comme la croissance des grenouilles et des têtards..

1.4 Mécanisme(s) sous-jacent au compromis évolutifs : balance oxydative et/ou allocation d'énergie ?

Nos expérimentations menées sur un modèle amphibien, adulte ou larvaire, apportent une conclusion claire quant à l'estimation du métabolisme. La mesure de la consommation d'oxygène, indicateur du flux énergétique entrant, n'est pas suffisante pour estimer l'énergie nette (ATP) disponible pour les traits d'histoire de vie des organismes. La capacité de conversion énergétique de la mitochondrie est un paramètre indispensable à appliquer à la consommation d'oxygène de l'organisme pour apprécier entièrement la disponibilité énergétique. A la lumière de ces nouvelles données, il faudrait donc reconsidérer la notion d'allocation d'énergie en termes de production mitochondriale d'ATP et non plus seulement en termes de consommation d'oxygène de l'organisme. L'ensemble de nos résultats serait alors en faveur d'une corrélation positive entre taux de croissance et production d'ATP.

En revanche, quelle est la base mécanistique du compromis ? Existe-il un compromis interne à la mitochondrie entre production d'ATP au détriment d'une production de ROS ? Ou bien y a-t-il un compromis dans l'allocation d'énergie entre croissance et défenses anti-oxydantes ? En milieu naturel, la variabilité de croissance présente entre les populations nous amène à penser qu'il y a une contrainte radicalaire due à la diminution de l'allocation d'énergie dans les défenses. La base mécanistique de ce compromis serait alors en termes d'allocation de ressources. Le coût serait alors un stress oxydatif plus élevé bien que cela n'ait pas été révélé par nos mesures. En revanche, les effets du découplage induit expérimentalement aux têtards ne nous permettent pas de nous prononcer sur l'existence d'un

compromis entre croissance et défenses anti-oxydantes puisque nous sommes en présence d'un modèle où les apports en énergie (ATP) seraient diminués ; la distribution relative est alors difficile à estimer.

2 Perspectives en continuité avec la thèse

Divers points émergent des résultats présentés dans ce travail de thèse et s'avèrent intéressants pour compléter notre compréhension de l'implication du stress oxydatif et du métabolisme énergétique dans les compromis des traits d'histoire de vie. Les perspectives présentées sont pour certaines en cours de réalisation.

2.1 Dissociation compromis mitochondrial (ATP versus ROS) compromis d'allocation d'énergie (croissance versus défenses anti-oxydantes)

La complexité de nos résultats ne permet pas de définir à quel(s) niveau(x) se situe(nt) la base mécanistique sous-jacente aux compromis évolutifs. Si la croissance de l'organisme et le taux de synthèse d'ATP mitochondrial semblaient corrélés positivement, l'étude du stress oxydatif implique des conclusions moins franches. L'implication du stress oxydatif n'est pourtant plus à remettre en cause au regard des nombreuses études sur la susceptibilité au stress oxydatif comme coût proximal à la croissance et la reproduction (Alonso-Alvarez et al., 2004, 2006, 2007 ; Kim et al., 2011). Toutes ces études utilisent une technique similaire pour estimer le stress oxydatif consistant à mesurer le temps nécessaire à l'hémolyse de 50% des globules rouges suite à l'exposition contrôlée des cellules à du H₂O₂. Cette technique s'est largement répandue car elle est peu invasive, ne nécessite qu'un faible volume de prélèvement sanguin et permet de faire des suivis individuels au cours du temps. Ce test est un très bon indicateur du statut oxydatif car les mesures englobent à la fois des capacités anti-oxydantes du sang et le niveau de dommages oxydatifs de l'organisme. Le temps d'hémolyse obtenu par ce dosage représente la résultante entre les différents paramètres de la balance oxydative : le

niveau de dégâts oxydatifs des cellules au début de l'expérience mais aussi l'efficacité des systèmes de détoxification / réparation au cours de l'expérimentation.. Ce dosage a permis de mettre en évidence la susceptibilité au stress oxydatif dans plusieurs études sur le coût de la croissance (Alonso-Alvarez et al., 2007 ; Kim et al., 2011) et de la reproduction (Alonso-Alvarez et al., 2004, 2006). Toutefois, ce qui nous a intéressé au cours de ce travail était de définir précisément quel paramètre de la balance oxydative est en cause dans les changements de susceptibilité de stress oxydatif : les pro-oxydants ? Les anti-oxydants ? Et dans quelle mesure les flux énergétiques sont-ils impliqués ?

Afin de mettre en évidence la base mécanistique du processus, l'idéal serait de modifier expérimentalement un seul élément à la fois : (i) la production de ROS, (ii) le niveau de défenses anti-oxydantes, (iii) le niveau de la synthèse d'ATP. Concrètement, modifier la production de ROS peut être réalisé de multiples façons mais il faut être conscient que cela reste une manipulation qui induirait des modifications sur de nombreux paramètres mitochondriaux étant donné les nombreuses interactions fonctionnelles de cet organite (Cf. introduction, paragraphe 3.3.2). En effet, la production de ROS étant dépendante de la pression partielle en oxygène, de l'activité de la chaîne respiratoire, du potentiel de membrane..., tous ces paramètres ont aussi un impact sur la synthèse d'ATP. De fait, agir sur un mécanisme affectant la production de ROS sans modifier la production d'énergie ne semble pas envisageable. Par exemple, l'approche expérimentale que nous avons employée en traitant les têtards au 2,4-dinitrophenol a impacté la production de ROS mais aussi la synthèse d'ATP, le tout ayant des répercussions indirectes dans les paramètres du flux énergétique (capacités oxydatives de l'organisme entier et mitochondriale). De façon générale, moduler la production de pro-oxydant *in vivo* peut être réalisé par des modifications de la composition et de la quantité du régime alimentaire, de la température ambiante, ou encore des traitements hormonaux (Cannon et Nedergaard, 2004, Barja, 2007) mais a des conséquences multiparamétriques directes et indirectes et dont l'interprétation est complexe.

En revanche, le système de protections des attaques radicalaires est plus simple à appréhender ; différentes approches ont déjà été utilisées dans la littérature. Des lignées transgéniques de souris, drosophiles ou encore de fourmis ont été créées pour une surexpression d'une enzyme anti-oxydante, la SOD (Finkel et Holbrook, 2000 ; Parker et al., 2004). Ces études étaient centrées sur la longévité des organismes, et non sur les compromis évolutifs. Il serait alors intéressant d'observer les conséquences d'une mutation des enzymes

anti-oxydantes sur les coûts de la croissance et la reproduction. De même, des expériences de suppléments en vitamines, des anti-oxydants non enzymatiques, ont déjà été réalisées (de Ayala et al., 2006 ; Bertrand et al., 2006 ; Costantini, 2007 ; Isaksson et Andersson, 2008 ; Baeta et Faivre, 2008 ; Hall et al., 2010 ; McGraw et al., 2011). Ces études ont permis de mettre en évidence expérimentalement des compromis entre investissements dans la croissance / reproduction et investissements dans la maintenance. Dans ce type d'approche, définir la globalité de la balance oxydative et du flux énergétique permettrait de mettre en évidence les mécanismes énergétiques et / ou oxydatifs impliqués dans ces compromis.

Par ailleurs, le compromis d'allocation d'énergie n'est pas incompatible avec un compromis entre générations d'ATP et de ROS au niveau de la mitochondrie. Dissocier la production de ces deux molécules semble être un état que l'on puisse atteindre artificiellement grâce à l'almitrine (Leverve et al., 1998 ; Rigoulet et al., 1998). Ce composé induit une diminution de l'efficacité de synthèse d'ATP en augmentant la stœchiométrie H^+/ATP au niveau de l'ATP synthétase (Rigoulet et al., 1990 ; Leverve et al., 1998 ; Rigoulet et al., 1998). Cette molécule permettrait de diminuer le rendement énergétique mitochondrial mais sans affecter l'activité de la chaîne respiratoire ni le potentiel de membrane (Leverve et al., 1998). A priori, la diminution de production d'ATP ne devrait pas être accompagnée de changement de génération de ROS. Cette molécule permettrait expérimentalement de dissocier ATP et ROS, cependant, bien que son action sur les mitochondries *in vitro* soit bien définie, les conséquences de l'almitrine en exposition chronique sur un organisme reste à tester. De la même manière que nous avons exposé les têtards au dNP, une étude avec l'almitrine pourrait être réalisée. Si l'exposition chronique de l'almitrine diminue le ratio H^+/ATP de l'ATP synthétase des organismes traités, alors nous pourrions mettre en évidence expérimentalement l'impact de la disponibilité en ATP dans les trajectoires d'histoire de vie d'un organisme.

Pour explorer le rôle de l'efficacité mitochondriale dans les processus de croissance, une autre approche serait d'affecter la fonction mitochondriale, soit en créant des organismes mutants, soit par des ARN interférents. Une étude sur *Caenorhabditis elegans* a permis de mettre en évidence que diminuer l'activité de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthétase avec des ARN interférents, entraîne une réduction de taille corporelle et une augmentation de la durée de vie des animaux traités (Dillin et al., 2002). Ainsi, par l'action d'ARN interférents, il pourrait être possible d'affecter les structures impliquées dans la stœchiométrie de l'ATP

synthétase, et de diminuer la production d'ATP des organismes traités, sans affecter la production de ROS.

2.2 Performances post-métamorphiques des têtards traités au dNP

Les têtards traités au dNP présentent un ralentissement de croissance et de développement. Bien que cela n'ait été mesuré qu'au cours d'expériences préliminaires, les organismes traités présentent un retard de métamorphose. Cependant leur taille à métamorphose est identique. Les traits d'histoire de vie comme la taille et la durée de métamorphose sont souvent utilisés comme indicateur de la valeur sélective pour les organismes à cycles de vie complexe (Denver, 1997 ; Altwegg et Reyer, 2003 ; Ficetola et De Bernardi, 2006 ; Van Allen et al., 2010, Walsh, 2010). Notamment, une taille corporelle plus élevée et une émergence précoce ont été corrélées avec de meilleurs taux de dispersion et de survie (Vonesk, 2005 ; Chelgren et al., 2006) et une maturité sexuelle plus rapide (Reading, 2007 ; Briggs, 2008).

Ainsi, dans notre étude, il serait intéressant de suivre les organismes traités au cours de leur vie. Les têtards, lorsqu'ils sont traités au dNP présentent des modifications du fonctionnement mitochondrial. Une étude montre que les modifications sur la mitochondrie induites aux stades précoces chez *Caenorhabditis elegans* se maintiennent au stade adulte (Dillin et al., 2002). Nous pouvons émettre l'hypothèse que les têtards traités au dNP maintiennent les modifications du fonctionnement mitochondrial (faible découplage et moindre production de ROS) jusqu'au stade adulte, associées à une taille inférieure et un meilleur statut oxydatif. Bien qu'un meilleur statut oxydatif favorise un retardement de la sénescence, une durée de vie supérieure n'est pas certaine. En milieu naturel, il faut considérer les risques de mortalité des organismes comme la résultante des risques intrinsèques et extrinsèques. Alors que les modifications du fonctionnement mitochondrial induites par le dNP semblent diminuer les risques de mortalités intrinsèques (meilleur statut oxydatif), le retard de croissance / développement chez les têtards traités pourrait au contraire accroître les risques de mortalité extrinsèque. En effet, comme il a été expliqué précédemment, les organismes de petites tailles présentent des risques de prédateurs plus

élevées. De plus, dans notre modèle d'étude, un retard de développement engendre une diminution de la période de croissance et de mise en réserve de l'énergie, deux paramètres importants pour survivre au cours de l'hiver (Alwegg and Reyer, 2003). Ainsi, à cause de leur retard de croissance, les grenouillettes traitées au dNP pourraient présenter une diminution de leur taux de survie post-métamorphose (Maldonado and Young, 1999 ; Phillips, 2004 ; Vonesh, 2005 ; Chelgren et al., 2006). En perspective, il serait donc judicieux de suivre le développement des têtards traités au dNP, en conditions naturelles, pour mieux comprendre l'impact du fonctionnement mitochondriale au stade larvaire sur la survie future des grenouillettes et des grenouilles.

2.3 Bases mécanistiques du rendement énergétique mitochondrial des grenouilles rousses.

L'étude de la bioénergétique mitochondriale hépatique des populations de grenouilles rousses nous a permis de mettre en évidence que les grenouilles de taille et croissance élevées présentent un fort taux de synthèse d'ATP et une meilleure efficacité des phosphorylations oxydatives en comparaison aux grenouilles de petites tailles. L'ensemble de nos résultats nous amène à penser que les différences de rendement énergétique mitochondrial entre les deux populations de grenouilles rousses ne sont pas causées par les capacités oxydatives de la chaîne respiratoire. Le potentiel de membrane est sensiblement similaire entre les mitochondries des deux populations de grenouilles. Cependant, il est reconnu qu'une petite variation de potentiel transmembranaire peut être associée à une grande différence de fuite de proton de la membrane interne (Roussel et al., 2003 ; Johnson et al., 2006). De manière à vérifier l'implication de la perméabilité de la membrane interne mitochondriale, il serait donc intéressant de compléter notre étude par des mesures de fuites de protons. L'autre mécanisme pouvant affecter le rendement énergétique mitochondrial serait lié à des modifications au niveau de l'ATP synthétase. Il a été montré que les capacités de phosphorylation et d'hydrolyse du complexe V des grenouilles de grande taille étaient supérieures à celles des grenouilles de petite taille. En perspective, nous pourrions chercher à comprendre si ces modifications sont dues à la structure des protéines, à leur nombre ou encore à leur fonctionnement. Cependant, ce résultat reste original en soi puisque dans la littérature, la chaîne respiratoire et/ou la perméabilité membranaire sont connues comme pouvant modifier

le rapport ATP/O, alors que l'implication du complexe V dans la modification du rendement n'a jamais été mise en évidence chez les animaux (Brand, 2005).

2.4 *Comment la synthèse d'ATP hépatique favorise la croissance ?*

Le lien entre production d'ATP mitochondriale et croissance de l'organisme impliquerait de suivre les transformations chimiques permise par l'ATP jusqu'à leur implication au niveau de la cellule, du tissu et de l'organisme. Dans les cellules, il existe différents modes d'utilisation de l'ATP : l'ATP phosphoryle des molécules par transfert du groupement phosphoryle ou l'ATP active la condensation de deux substrats par transfert d'un groupement issu de l'ATP (pyrophosphoryle ; adényle, adénosyle) ou par simple transfert de l'énergie issue de l'hydrolyse. Les molécules utilisant l'ATP sont alors des enzymes ou des substrats d'autres réactions. La disponibilité en substrats, en enzyme et en énergie est en faveur d'une stimulation du métabolisme hépatocytaire. En plus d'être le viscère le plus volumineux chez les Vertébrés (2 à 5% de la masse corporelle), le foie est le siège d'une activité métabolique intense et spécifique jouant un rôle dominant dans l'homéostasie nutritionnelle (Silbernagl et Despopoulos, 2008). Cet organe permet le stockage du glucose sous forme de glycogène, produit les protéines plasmatiques et les lipoprotéines. Ses capacités enzymatiques lui permettent aussi d'activer le catabolisme des graisses et du glycogène. Le foie est déterminant dans la régulation du devenir métabolique des lipides. Ainsi, il serait intéressant d'estimer le lien entre une plus forte production hépatocytaire d'ATP, le métabolisme du foie et le statut énergétique de l'organisme (réserves énergétiques et substrats circulants) favorisant sa croissance.

2.5 *Comparaisons interpopulationnelles : bases génétiques et environnementales*

Le système utilisé pour décrire le lien entre efficacité mitochondriale et taille corporelle *in natura* permet d'émettre des hypothèses sur la relation entre production d'ATP et taux de croissance. Afin de conforter ces hypothèses, il serait judicieux dans un premier temps d'élargir notre étude à de plus nombreuses populations de grenouilles rousses. Il serait

intéressant de choisir des populations de grenouilles voisines et de définir les caractéristiques environnementales de l'habitat. En effet, les étangs (sites de reproduction) présentent des différences pouvant considérablement impacter le développement des animaux, principalement au stade larvaire (Conover et Schultz, 1995 ; Denver, 1997). Par exemple, certains étangs se situent dans une zone forestière, d'autres au milieu de champs (Joly, 1991 ; Augert et Joly, 1993). Des facteurs abiotiques sont donc susceptibles de varier entre ces deux types de milieux : la température, la disponibilité en nourriture ou en minéraux, l'exposition aux polluants. Expérimentalement, l'induction d'un phénotype mitochondrial (par des ARN interférents) au stade précoce de développement semble être un phénomène irréversible. En effet, les mitochondries au stade adulte maintiennent le phénotype induit au stade larvaire, bien que le traitement aux ARN interférents ait été interrompu (Dillin et al., 2002). Ainsi, les caractéristiques environnementales susceptibles d'impacter les mitochondries des larves pourraient avoir des effets sur la bioénergétique mitochondriale tout au long de la vie de l'organisme.

En plus de facteurs environnementaux capables d'affecter les paramètres physiologiques de nos modèles, une base génétique pourrait expliquer nos résultats (Stearns, 1992 ; Conover et Schultz, 1995 ; Zera et Harshman, 2001). Nos deux populations de grenouilles rousses sont distantes de 40 km. Les déplacements chez cette espèce n'excédant pas quelques kilomètres (Duguet et Melki, 2003), un brassage génétique naturel entre les deux populations étudiées est peu envisageable. En revanche, les sites d'échantillonnages sont des étangs piscicoles. Les populations sont donc soumises à des périodes de pêches au cours des frayères. Les animaux sont stabulés jusqu'à la fin de l'amplexus puis les œufs des différentes populations sont mélangés avant d'être redistribués aléatoirement dans les étangs exploités. Ce brassage génétique artificiel permettrait de maintenir une certaine proximité génétique entre les populations. Cependant, nous ne savons pas quelle proportion de têtards est relarguée dans les étangs chaque année, ce qui ne nous permet pas d'exclure une base génétique aux différences phénotypiques observées entre les populations de grenouilles. Ainsi, nous projetons d'étudier la distance génétique de nos populations de grenouilles rousses.

2.6 Comparaison inter-espèces

Comprendre les mécanismes proximaux des variations inter-individuelles, inter-populationnelles et interspécifiques nous apportera des éléments de réponses quant à la nature adaptative des traits et les contraintes qui en ont limité l'évolution (Rose and Bradley 1998). Ainsi, une comparaison interspécifique de grenouilles présentant des taux de croissance différents a d'ores et déjà été réalisée. De manière à limiter les biais phylogénétiques dans une approche comparative (Garland et al., 2005), trois espèces de la famille des Ranidés présentant une large gamme de taille, ont été utilisées : *Lithobates catesbeianus*, *Pelophylax ridibunda*, *Rana temporaria*, permettant ainsi de mieux identifier les modifications du fonctionnement mitochondrial sur une large gamme de taux de croissance. Les premiers résultats de cette étude sont assez originaux montrant que la croissance est proportionnelle à l'efficacité de transduction énergétique des mitochondries hépatiques, mais montrent de façon surprenante que la production de ROS est inversement corrélée à la croissance. Il y a donc une relation inversement proportionnelle entre synthèse d'ATP et synthèse de ROS. Les mesures du statut oxydatif des organismes est en cours de réalisation.

Par ailleurs, il serait intéressant d'élargir les comparaisons des mécanismes physiologiques à la base des variations de croissance à l'échelle d'autres taxons.

3 Perspectives en ouverture

3.1 Approche écophysiologique des mécanismes impliqués dans la réponse à la prédation chez le têtard de *Rana temporaria*. En collaboration avec Emilien Luquet et Sandrine Plénet.

Comprendre comment les organismes répondent à des variations environnementales reste un challenge majeur de l'écologie évolutive. Plusieurs approches selon le niveau d'atteinte biologique peuvent être envisagées pour estimer la réponse des organismes face à

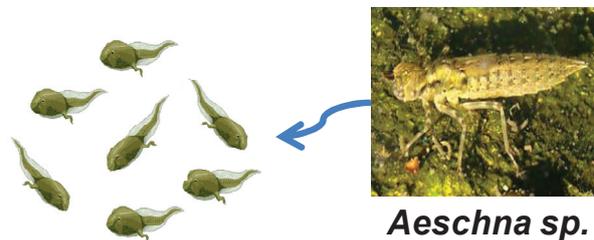
des évènements stressants. La plus classique, est une approche quantitative basée sur l'analyse de la variation de certains traits (survie, croissance). Elle permet d'appréhender l'impact de la variation environnementale et d'estimer indirectement un coût énergétique de la réponse et en conséquence une réduction de la valeur sélective des individus.

Plus intégrative et originale, l'étude des mécanismes endocrines et physiologiques est une nouvelle voie pour comprendre les processus sous-jacents aux compromis évolutifs. Chez les vertébrés, se focaliser sur les hormones glucocorticostéroïdes est judicieux pour examiner la relation entre stress environnemental, réponses biologiques et survie. Ces hormones sont d'importants médiateurs de l'allostase et des réponses aux stress tout au long de la vie. La mitochondrie, centrale énergétique cellulaire, est une cible importante des hormones de stress. Dans cet organite, il existe un compromis entre efficacité de synthèse d'énergie favorisant la croissance, la reproduction et le maintien, et production de radicaux libres au détriment de ces performances. Ce compromis apparaît comme l'élément clé entre effet d'un stress environnemental, conséquences hormonales, impact sur le rendement énergétique, dérèglement de la balance oxydative, et conséquences sur les compromis évolutifs entre les traits d'histoire de vie.

Les amphibiens répondent de manière flexible et adaptative aux changements de l'environnement en modifiant leurs traits d'histoire de vie, leur morphologie ou leur physiologie au cours de leur développement, et constituent ainsi de bons modèles. Ces modifications survenant pendant la phase larvaire peuvent sanctionner la qualité de la métamorphose puis la valeur sélective des phases juvéniles ou adultes. Nous avons utilisé chez la grenouille rousse (*Rana temporaria*)

un facteur environnemental fortement variable en milieu aquatique, la présence de prédateurs. Il est reconnu qu'en présence de prédateurs, les larves développent des défenses induites. La mise en place de ce

phénotype adaptatif est cependant coûteuse ; les têtards induits présentent alors une croissance réduite et un développement ralenti associés à une consommation d'oxygène diminuée (Steiner, 2007). Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'expression des défenses induites et les compromis qu'elles imposent, nous avons exploré les réponses physiologiques impliquées dans cette réponse adaptative. Un stress environnemental



***Aeschna* sp.**

entraînerait des modifications du métabolisme via des changements dans le fonctionnement mitochondrial impactant à la fois sur la balance oxydative mais également sur l'énergie cellulaire disponible.

***3.2 Stress oxydatif et efficacité mitochondriale comme médiateur des trajectoires d'histoire de vie chez les organismes sociaux – modèle de fourmis Lasius Niger.
En collaboration avec Jérôme Gippet et Bernard Kaufmann***

Un des problèmes majeurs associés aux études comparatives des stratégies d'histoire de vie sont les distances génétiques entre les groupes comparés, ce qui peut participer de manière plus ou moins importante à expliquer des différences entre les individus. Par conséquent, les organismes génétiquement proches qui présentent des trajectoires d'histoire de vie différentes pourraient être beaucoup plus en adéquation avec l'étude des mécanismes physiologiques sous jacents aux histoires de vie. Le seul groupe d'organismes qui puisse naturellement répondre à ce critère sont les insectes sociaux. Jusqu'à présent, les insectes sociaux ont été considérés comme de bons organismes modèles pour étudier les mécanismes du vieillissement puisque les variations de longévité sont observées entre des organismes génétiquement identiques, les reines et les ouvrières (Keller et Genoud, 1997 ; Keller et Jemielity, 2006). En effet, les insectes sociaux sont caractérisés par l'extraordinaire longévité de leurs femelles reproductrices, qui peut être des dizaines ou des centaines de fois plus élevée que celle des insectes non sociaux à taille corporelle équivalente, ou encore surpasse largement la longévité de leurs conspécifiques non reproductrices, qui sont environ dix fois plus petites (Hölldobler et Wilson, 1990 ; Jemielity et al., 2005). Les théories évolutionnistes du vieillissement expliquent ce phénomène par la faible mortalité extrinsèque des reines (due à la prédation, aux pathogènes...), une fois qu'elles ont réussi à établir leur colonie. Cependant, les différences de mortalités extrinsèques ne suffisent pas à expliquer l'ensemble des variations de stratégies d'histoire de vie (Parker et al., 2004 ; Remolina et al., 2007, 2008 ; Aamodt, 2009).

Plusieurs études récentes, portées principalement sur 2 espèces sociales, l'abeille *Apis mellifera* et la fourmi *Lasius niger*, montrent qu'il existe aussi des bases mécanistiques impliquées dans les processus de sénescence (Parker et al., 2004 ; Corona et al., 2005 ; Keller

et Jelielity, 2006 ; Seehuus et al., 2006 ; Haddad et al., 2007 ; Remolina et al., 2007 ; Remolina et Hughes, 2008 ; Aamodt, 2009 ; Schneider et al., 2011). Selon la manière dont ils sont nourris, les œufs femelles deviennent soit ouvrières soit reines, et alors que les ouvrières des abeilles *Apis mellifera* ont une durée de vie maximale d'un mois, les reines peuvent vivre pendant des années (Winston, 1987). Les fourmis *Lasius niger*, bien qu'ayant été beaucoup moins étudiées, constituent aussi un modèle biologique pertinent puisque les reines peuvent atteindre une extrême longévité (jusqu'à 28 ans) alors que les ouvrières vivent seulement 1 à 2 ans (Hölldobler et Wilson, 1990).

Bien que la vitellogénine soit probablement impliquée dans les différences de longévité entre les ouvrières grâce à ses propriétés anti-oxydantes, cette molécule ne semble pas expliquer totalement la longévité élevée des reines par rapport aux ouvrières chez les abeilles (Remolina et Hughes, 2008 ; Seehuus et al., 2006 ; Haddad et al., 2007). L'explication des variabilités des stratégies de vie entre abeille *Apis mellifera* reines et ouvrières n'est encore pas satisfaisante et mérite davantage d'attention, principalement sur les bases mécanistiques (Remolina et al., 2007). Chez les abeilles, il a été suggéré que l'activité de vol et de recherche alimentaire pourrait être responsable de la courte durée de vie des ouvrières, mais cela ne semble pas être une explication suffisante puisque des variations de longévité sont maintenues même lorsqu'expérimentalement les ouvrières sont nourries et donc n'ont plus d'activité de recherche alimentaire (Haddad et al., 2007). De plus en plus d'études amènent à considérer le stress oxydatif comme responsable des différences de longévité, que ce soit chez les abeilles (Haddad et al., 2007 ; Remolina et al., 2007 ; Aamodt, 2009) ou les fourmis (Parker et al., 2004 ; Seehuus et al., 2006).

Chez la fourmi *Lasius niger*, Parker et al., (2004) ont testé si l'expression du gène de la superoxyde dismutase cytoplasmique pourrait jouer un rôle dans l'extrême longévité des reines. Ce gène a été reconnu comme important dans un contexte de la théorie radicalaire du vieillissement chez des organismes modèles. Les enzymes SOD sont des défenses importantes contre les ROS générés au niveau de la mitochondrie. Des niveaux de SOD accrus ont été retrouvés dans plusieurs lignées de drosophiles sélectionnées par leur durée de vie élevée (synthèse dans Aigaki et al., 2002). Ainsi, si la SOD joue un rôle dans ces différences de longévité chez les fourmis *L. niger*, les reines devraient avoir un niveau cytoplasmique de SOD plus élevé que les ouvrières. Pourtant, au regard des niveaux d'expression de la SOD cytoplasmique et des dosages de l'activité protéiques, les reines ont toujours des expressions

et activités de la SOD plus faibles que les ouvrières (Parker et al., 2004). Par ailleurs, l'expression de gènes antioxydants (Abeille, Corona et al., 2005) de même que l'activité des enzymes anti-oxydantes (Fourmis, Parker et al., 2004) sont globalement identiques entre les ouvrières et les reines, ce qui a remis en cause l'implication du stress oxydatif dans les processus de sénescences de ces organismes.

Toutes ces études montrent que la théorie radicalaire du vieillissement est actuellement la théorie privilégiée dans l'étude des mécanismes du vieillissement de ces espèces, bien que les résultats semblent invalider cette théorie. Pour rappel, cette théorie propose que l'activité métabolique normale résulte en une production inévitable des espèces radicalaires de l'oxygène qui, si elles ne sont pas inactivées par les défenses anti-oxydantes, entraînent des dommages importants sur les acides nucléiques, les protéines et les lipides (Harman, 1956). Ces dégâts s'accumulent au fil du temps ; plusieurs études montrent que ces dégâts contribuent au vieillissement de l'organisme, et par conséquent, à la détermination de la vie maximale (Beckman et Ames, 1998 ; Finkel et Holbrook, 2000). Il a été montré par exemple que la production de ROS est inversement corrélée à la durée de vie chez plusieurs espèces de mammifères (Ku et al., 1993). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que les dégâts oxydatifs s'accumulent des organismes au cours du temps. Enfin, plusieurs études ont montré que les drosophiles transgéniques chez qui les enzymes anti-oxydantes étaient surexprimées ont une durée de vie prolongée de 50% (Aigaki et al., 2002).

Ainsi, il est difficile d'estimer l'implication du stress oxydatif chez les animaux si on ne prend pas en compte l'ensemble des paramètres de la balance oxydative. L'idéal serait de mesurer tous les paramètres de la balance oxydative : les pro-oxydants, les anti-oxydants, et les dégâts oxydatifs. Concrètement, il sera plus simple dans un premier temps de mesurer 1- l'activité des défenses anti-oxydantes, et 2- le taux de dégâts oxydatifs, chez les reines et chez les ouvrières, et ceux à différentes phases de leur vie. Profitant du modèle de fourmi *Lasius niger*, nous voulons tester un certain nombre d'hypothèses en continuité avec la littérature et mes travaux de thèse :

-La théorie radicalaire du vieillissement permet-elle d'expliquer les différences de longévité entre les reines et les ouvrières ? Pour cela nous nous proposons de vérifier si une augmentation de longévité peut être réalisée par une production de ROS plus faible, une augmentation des défenses anti-oxydantes, ou la combinaison des deux. Nous proposons aussi de mesurer la résultante de la balance oxydative, le stress oxydatif, en estimant

différents paramètres des dégâts oxydatifs qui curieusement n'ont jamais été dosés chez les insectes sociaux.

-D'un point de vue énergétique, comment les reines parviennent-elles à la fois à allouer beaucoup d'énergie à la croissance, à la reproduction et à la maintenance ? Nous proposons de tester l'implication de l'efficacité mitochondriale à transférer de l'énergie (ATP/O) dans les flux énergétiques des reines qui tendent vers des dépenses très élevées dans les performances en comparaison aux ouvrières.

Bibliographie

Aamodt, R. M. (2009) 'Age-and caste-dependent decrease in expression of genes maintaining DNA and RNA quality and mitochondrial integrity in the honeybee wing muscle', *Experimental Gerontology* 44(9): 586-93.

Abele, D., Heise, K., Portner, H. O. and Puntarulo, S. (2002) 'Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*', *Journal of Experimental Biology* 205(13): 1831-41.

Aigaki, T., Seong, K. H. and Matsuo, T. (2002) 'Longevity determination genes in *Drosophila melanogaster*', *Mechanisms of Ageing and Development* 123(12): 1531-41.

Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Chastel, O. and Sorci, G. (2006) 'An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress', *Evolution* 60(9): 1913-24.

Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B. and Sorci, G. (2004) 'Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction', *Ecology Letters* 7(5): 363-8.

Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Faivre, B. and Sorci, G. (2007) 'Increased susceptibility to oxidative damage as a cost of accelerated somatic growth in zebra finches', *Functional Ecology* 21(5): 873-9.

Altwegg, R. and Reyer, H. U. (2003) 'Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs', *Evolution* 57(4): 872-82.

Andersen, M. L., Ribeiro, D. A., Bergamaschi, C. T., Alvarenga, T. A., Silva, A., Zager, A., Campos, R. R. and Tufik, S. (2009) 'Distinct effects of acute and chronic sleep loss on DNA damage in rats', *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 33(3): 562-7.

Angilletta, M. J. and Sears, M. W. (2000) 'The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard', *Functional Ecology* 14(1): 39-45.

Arendt, J. D. (1997) 'Adaptive intrinsic growth rates: An integration across taxa', *Quarterly Review of Biology* 72(2): 149-77.

Augert, D. and Joly, P. (1993) 'Plasticity of age at maturity between two neighboring populations of the common frog (*Rana temporaria*)', *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 71(1): 26-33.

Baeta, R., Faivre, B., Motreuil, S., Gaillard, M. and Moreau, J. (2008) 'Carotenoid trade-off between parasitic resistance and sexual display: an experimental study in the blackbird (*Turdus merula*)', *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 275(1633): 427-34.

Balaban, R. S., Nemoto, S. and Finkel, T. (2005) 'Mitochondria, oxidants, and aging', *Cell* 120(4): 483-95.

Barbault, R. (1981) 'Ecologie des populations et des peuplements: 1-200': Masson, Paris.

Barja, G. (2004) 'Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism?' *Biological Reviews* 79(2): 235-51.

Barja, G. (2007) 'Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: Implications for aging studies', *Rejuvenation Research* 10(2): 215-23.

Barja, G., Cadenas, S., Rojas, C., Perezcampo, R. and Lopeztorres, M. (1994) 'Low Mitochondrial Free-Radical Production Per Unit O₂ Consumption Can Explain the Simultaneous Presence of High Longevity and High Aerobic Metabolic-Rate in Birds', *Free Radical Research* 21(5): 317-27.

Barros, M. H., Bandy, B., Tahara, E. B. and Kowaltowski, A. J. (2004) 'Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry* 279(48): 49883-8.

Batandier, C., Guigas, B., Detaille, D., El-Mir, M. Y., Fontaine, E., Rigoulet, M. and Leverve, X. M. (2006) 'The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-

chain complex 1 is hampered by metformin', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 38(1): 33-42.

Beavis, A. D. and Lehninger, A. L. (1986) 'The upper and lower limits of the mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation stoichiometry of oxidative phosphorylation', *European Journal of Biochemistry* 158(2): 315-22.

Beckman, K. B. and Ames, B. N. (1998) 'The free radical theory of aging matures', *Physiological Reviews* 78(2): 547-81.

Benard, G. and Karbowski, M. (2009) 'Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability', *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20(3): 365-74.

Bert, P. (1878) *La pression barométrique: recherches de physiologie expérimentale*: G. Masson.

Bertrand, S., Faivre, B. and Sorci, G. (2006) 'Do carotenoid-based sexual traits signal the availability of non-pigmentary antioxidants?' *Journal of Experimental Biology* 209(22): 4414-9.

Boveris, A. and Chance, B. (1973) 'Mitochondrial Generation of Hydrogen-Peroxide - General Properties and Effect of Hyperbaric-Oxygen', *Biochemical Journal* 134(3): 707-16.

Boveris, A., Chance, B. and Oshino, N. (1972) 'Cellular Production of Hydrogen-Peroxide', *Biochemical Journal* 128(3): 617-&.

Brand, M. D. (1990) 'The Proton Leak across the Mitochondrial Inner Membrane', *Biochimica Et Biophysica Acta* 1018(2-3): 128-33.

Brand, M. D. (2000) 'Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing', *Experimental Gerontology* 35(6-7): 811-20.

Brand, M. D. (2005) 'The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction', *Biochemical Society Transactions* 33: 897-904.

Brand, M. D., Chien, L. F. and Dirolez, P. (1994) 'Experimental discrimination between proton leak and redox slip during mitochondrial electron-transport', *Biochemical Journal* 297: 27-9.

Briggs, V. S. (2008) 'Mating patterns of red-eyed treefrogs, *Agalychnis callidryas* and *A-moreletii*', *Ethology* 114(5): 489-98.

Brown-Borg, H. M. and Rakoczy, S. G. (2003) 'Growth hormone administration to long-living dwarf mice alters multiple components of the antioxidative defense system', *Mechanisms of Ageing and Development* 124(10-12): 1013-24.

Buttemer, W. A., Abele, D. and Costantini, D. (2010) 'From bivalves to birds: oxidative stress and longevity', *Functional Ecology* 24(5): 971-83.

Calow, P. (1979) 'The cost of reproduction—a physiological approach': Wiley Online Library, pp. 23-40.

Cannon, B. and Nedergaard, J. (2004) 'Brown adipose tissue: Function and physiological significance', *Physiological Reviews* 84(1): 277-359.

Castanet, J., Meunier, F. J. and De Ricqlès, A. (1977) 'L'enregistrement de la croissance cyclique par le tissu osseux chez les vertébrés poïkilothermes: données comparatives et essai de synthèse', pp. 183-202.

Chelgren, N. D., Rosenberg, D. K., Heppell, S. S. and Gitelman, A. I. (2006) 'Carryover aquatic effects on survival of metamorphic frogs during pond emigration', *Ecological Applications* 16(1): 250-61.

Clerc, P., Rigoulet, M., Leverve, X. and Fontaine, E. (2007) 'Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39(2): 158-66.

Cody, M. L. (1966) 'A General Theory of Clutch Size', *Evolution* 20(2): 174-84.

Cole, L. C. (1954) 'The Population Consequences of Life History Phenomena', *Quarterly Review of Biology* 29(2): 103-37.

Collins, A. R. (2004) 'The comet assay for DNA damage and repair - Principles, applications, and limitations', *Molecular Biotechnology* 26(3): 249-61.

Conover, D. O. and Schultz, E. T. (1995) 'Phenotypic Similarity and the Evolutionary Significance of Countergradient Variation', *Trends in Ecology & Evolution* 10(6): 248-52.

Corona, M., Hughes, K. A., Weaver, D. B. and Robinson, G. E. (2005) 'Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity', *Mechanisms of Ageing and Development* 126(11): 1230-8.

Costantini, D. (2008) 'Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies', *Ecology Letters* 11(11): 1238-51.

Costantini, D., Coluzza, C., Fanfani, A. and Dell'Omo, G. (2007) 'Effects of carotenoid supplementation on colour expression, oxidative stress and body mass in rehabilitated captive adult kestrels (*Falco tinnunculus*)', *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 177(7): 723-31.

Costantini, D., Rowe, M., Butler, M. W. and McGraw, K. J. (2010) 'From molecules to living systems: historical and contemporary issues in oxidative stress and antioxidant ecology', *Functional Ecology* 24(5): 950-9.

Coulson, J. C. and Fairweather, J. A. (2001) 'Reduced reproductive performance prior to death in the Black-legged Kittiwake: senescence or terminal illness?' *Journal of Avian Biology* 32(2): 146-52.

da Silva, C. C. C., Cerqueira, F. M., Barbosa, L. F., Medeiros, M. H. G. and Kowaltowski, A. J. (2008) 'Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity', *Aging Cell* 7(4): 552-60.

Darley-USmar, V. M., Rickwood, D. and Wilson, M. T. (1987) *Mitochondria: a practical approach*: IRL press.

de Ayala, R. M., Martinelli, R. and Saino, N. (2006) 'Vitamin E supplementation enhances growth and condition of nestling barn swallows (*Hirundo rustica*)', *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60(5): 619-30.

De Block, M. and Stoks, R. (2008) 'Compensatory growth and oxidative stress in a damselfly', *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 275(1636): 781-5.

Denver, R. J. (1997) 'Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis', *American Zoologist* 37(2): 172-84.

Desquiret, V., Loiseau, D., Jacques, C., Douay, O., Malthiery, Y., Ritz, P. and Roussel, D. (2006) 'Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells', *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1757(1): 21-30.

Dillin, A., Hsu, A. L., Arantes-Oliveira, N. A., Lehrer-Graiwer, J., Hsin, H., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J. and Kenyon, C. (2002) 'Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development', *Science* 298(5602): 2398-401.

Dmitriew, C. M. (2011) 'The evolution of growth trajectories: what limits growth rate?' *Biological Reviews* 86(1): 97-116.

Dowling, D. K. and Simmons, L. W. (2009) 'Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution', *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 276(1663): 1737-45.

Droge, W. (2002) 'Free radicals in the physiological control of cell function', *Physiological Reviews* 82(1): 47-95.

Duguet, R. and Melki, F. (2003) *Les amphibiens de France, Belgique et Luxembourg: Biotope*.

Edwards, T. M., McCoy, K. A., Barbeau, T., McCoy, M. W., Thro, J. M. and Guillette, L. J. (2006) 'Environmental context determines nitrate toxicity in Southern toad (*Bufo terrestris*) tadpoles', *Aquatic Toxicology* 78(1): 50-8.

Eklov, P. and Halvarsson, C. (2000) 'The trade-off between foraging activity and predation risk for *Rana temporaria* in different food environments', *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 78(5): 734-9.

Emel'yanova, L. V., Savina, M. V., Belyaeva, E. A. and Brailovskaya, I. V. (2007) 'Peculiarities of functioning of liver mitochondria of the river lamprey *Lampetra fluviatilis* and the common frog *Rana temporaria* at periods of suppression and activation of energy metabolism', *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 43(6): 564-72.

Falnes, P. O., Klungland, A. and Alseth, I. (2007) 'Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation', *Neuroscience* 145(4): 1222-32.

Farrell, A. P., Bennett, W. and Devlin, R. H. (1997) 'Growth-enhanced transgenic salmon can be inferior swimmers', *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 75(2): 335-7.

Feniouk, B. A., Mulkidjanian, A. Y. and Junge, W. (2005) 'Proton slip in the ATP synthase of *Rhodobacter capsulatus*: induction, proton conduction, and nucleotide dependence', *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1706(1-2): 184-94.

Fenton, H. J. H. (1894) 'LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron': The Royal Society of Chemistry, pp. 899-910.

Ficetola, G. F. and De Bernardi, F. (2006) 'Trade-off between larval development rate and post-metamorphic traits in the frog *Rana latastei*', *Evolutionary Ecology* 20(2): 143-58.

Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000) 'Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing', *Nature* 408(6809): 239-47.

Fisher, R. A. (1930) 'The genetical theory of natural selection': Oxford: Clarendon Press.

Fraker, M. E. (2008) 'The effect of hunger on the strength and duration of the antipredator behavioral response of green frog (*Rana clamitans*) tadpoles', *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62(7): 1201-5.

Garland, T., Bennett, A. F. and Rezende, E. L. (2005) 'Phylogenetic approaches in comparative physiology', *Journal of Experimental Biology* 208(16): 3015-35.

Gosner, K. L. (1960) 'A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification': JSTOR, pp. 183-90.

Gredilla, R., Sanz, A., Lopez-Torres, M. and Barja, G. (2001) 'Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart', *Faseb Journal* 15(7): 1589-+.

Guérin, B., Labbe, P. and Somlo, M. (1979) 'Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios': Elsevier, pp. 149-59.

Haber, F. and Weiss, J. (1932) 'On the catalysis of hydroperoxide', *Naturwissenschaften* 20: 948-50.

Haddad, L. S., Kelbert, L. and Hulbert, A. J. (2007) 'Extended longevity of queen honey bees compared to workers is associated with peroxidation-resistant membranes', *Experimental Gerontology* 42(7): 601-9.

Hall, M. E., Blount, J. D., Forbes, S. and Royle, N. J. (2010) 'Does oxidative stress mediate the trade-off between growth and self-maintenance in structured families?' *Functional Ecology* 24(2): 365-73.

Hansford, R. G., Hogue, B. A. and Mildaziene, V. (1997) 'Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 29(1): 89-95.

Harman, D. (1956) 'Aging - a Theory Based on Free-Radical and Radiation-Chemistry', *Journals of Gerontology* 11(3): 298-300.

Harman, D. (1972) 'Biologic Clock - Mitochondria', *Journal of the American Geriatrics Society* 20(4): 145-&.

Harper, J. A., Dickinson, K. and Brand, M. D. (2001) 'Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity', *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2(4): 255-65.

Heise, K., Puntarulo, S., Portner, H. O. and Abele, D. (2003) 'Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress', *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 134(1): 79-90.

Herrero, A. and Barja, G. (1997) 'Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon', *Mechanisms of Ageing and Development* 98(2): 95-111.

Hews, D. K. (1988) 'Alarm Response in Larval Western Toads, *Bufo-Boreas* - Release of Larval Chemicals by a Natural Predator and Its Effect on Predator Capture Efficiency', *Animal Behaviour* 36: 125-33.

Hinkle, P. C. (2005) 'P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation', *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1706(1-2): 1-11.

Hölldobler, B. and Wilson, E. O. (1990) *The ants*: Belknap Press.

Horak, P. and Cohen, A. (2010) 'How to measure oxidative stress in an ecological context: methodological and statistical issues', *Functional Ecology* 24(5): 960-70.

Horat, P. and Semlitsch, R. D. (1994) 'Effects of Predation Risk and Hunger on the Behavior of 2 Species of Tadpoles', *Behavioral Ecology and Sociobiology* 34(6): 393-401.

Houlahan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H. and Kuzmin, S. L. (2000) 'Quantitative evidence for global amphibian population declines', *Nature* 404(6779): 752-5.

Hulbert, A. J. and Else, P. L. (2000) 'Mechanisms underlying the cost of living in animals', *Annual Review of Physiology* 62: 207-35.

Hulbert, A. J., Else, P. L., Manolis, S. C. and Brand, M. D. (2002) 'Proton leak in hepatocytes and liver mitochondria from archosaurs (crocodiles) and allometric relationships for ectotherms', *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 172(5): 387-97.

Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R. and Buttemer, W. A. (2007) 'Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals', *Physiol Rev* 87(4): 1175-213.

Isaksson, C. and Andersson, S. (2008) 'Oxidative stress does not influence carotenoid mobilization and plumage pigmentation', *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 275(1632): 309-14.

Isaksson, C., Sheldon, B. and Uller, T. (2011) 'The Challenges of Integrating Oxidative Stress into Life-history Biology', *Bioscience* 61(3): 194-202.

Jemielity, S., Chapuisat, M., Parker, J. D. and Keller, L. (2005) 'Long live the queen: studying aging in social insects', *Age* 27(3): 241-8.

Jennings, B. J., Ozanne, S. E., Dorling, M. W. and Hales, C. N. (1999) 'Early growth determines longevity in male rats and may be related to telomere shortening in the kidney', *Febs Letters* 448(1): 4-8.

Johnson, G., Roussel, D., Dumas, J. F. O., Douay, O., Malthiery, Y., Simard, G. and Ritz, P. (2006) 'Influence of intensity of food restriction on skeletal muscle mitochondrial energy metabolism in rats', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 291(3): E460-E7.

Joly, P. (1991) 'Variation in size and fecundity between neighbouring populations in the common frog, *Rana temporaria*', *Alytes* 9: 79-88.

Kadenbach, B. (2003) 'Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation', *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1604(2): 77-94.

Kayes, S. M., Cramp, R. L., Hudson, N. J. and Franklin, C. E. (2009) 'Surviving the drought: burrowing frogs save energy by increasing mitochondrial coupling', *Journal of Experimental Biology* 212(14): 2248-53.

Keller, L. and Genoud, M. (1997) 'Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing', *Nature* 389(6654): 958-60.

Keller, L. and Jemielity, S. (2006) 'Social insects as a model to study the molecular basis of ageing', *Experimental Gerontology* 41(6): 553-6.

Keller, M., Sommer, A. M., Portner, H. O. and Abele, D. (2004) 'Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes', *Journal of Experimental Biology* 207(14): 2529-38.

Kim, S. Y., Noguera, J. C., Morales, J. and Velando, A. (2011) 'Quantitative genetic evidence for trade-off between growth and resistance to oxidative stress in a wild bird', *Evolutionary Ecology* 25(2): 461-72.

Kirkwood, T. B. L. and Austad, S. N. (2000) 'Why do we age?' *Nature* 408(6809): 233-8.

Kirkwood, T. B. L. and Rose, M. R. (1991) 'Evolution of Senescence - Late Survival Sacrificed for Reproduction', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 332(1262): 15-24.

Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. and Starkov, A. A. (1997) 'High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria', *Febs Letters* 416(1): 15-8.

Kraus, C., Thomson, D. L., Kunkele, J. and Trillmich, F. (2005) 'Living slow and dying young? Life-history strategy and age-specific survival rates in a precocial small mammal', *Journal of Animal Ecology* 74(1): 171-80.

Ku, H. H., Brunk, U. T. and Sohal, R. S. (1993) 'Relationship between Mitochondrial Superoxide and Hydrogen-Peroxide Production and Longevity of Mammalian-Species', *Free Radical Biology and Medicine* 15(6): 621-7.

Lambeth, J. D. (2004) 'Nox enzymes and the biology of reactive oxygen', *Nature Reviews Immunology* 4(3): 181-9.

Law, R. (1979) 'Optimal Life Histories under Age-Specific Predation', *American Naturalist* 114(3): 399-417.

Leverve, X., Sibille, B., Devin, A., Piquet, M. A., Espie, P. and Rigoulet, M. (1998) 'Oxidative phosphorylation in intact hepatocytes: Quantitative characterization of the mechanisms of change in efficiency and cellular consequences', *Molecular and Cellular Biochemistry* 184(1-2): 53-65.

Ludwig, B., Bender, E., Arnold, S., Huttemann, M., Lee, I. and Kadenbach, B. (2001) 'Cytochrome c oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation', *Chembiochem* 2(6): 392-403.

Maldonado, M. and Young, C. M. (1999) 'Effects of the duration of larval life on postlarval stages of the demosponge *Sigmadocia caerulea*', *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 232(1): 9-21.

Mandrillon, A. L. and Saglio, P. (2009) 'Effects of Single and Combined Embryonic Exposures to Herbicide and Conspecific Chemical Alarm Cues on Hatching and Larval Traits

in the Common Frog (*Rana temporaria*)', *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 56(3): 566-76.

Mandrillon, A.-L. and Saglio, P. (2007) 'Waterborne amitrole affects the predator-prey relationship between common frog tadpoles (*Rana temporaria*) and larval spotted salamander (*Salamandra salamandra*)', *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53(2): 233-40.

Mangel, M. and Stamps, J. (2001) 'Trade-offs between growth and mortality and the maintenance of individual variation in growth', *Evolutionary Ecology Research* 3(5): 583-93.

Martin, L. B., Hawley, D. M., Ardia, D. R. (2011) 'An introduction to ecological immunology', *Functional Ecology* 25(1): 1-4.

McGraw, K. J., Cohen, A. A., Costantini, D. and Horak, P. (2010) 'The ecological significance of antioxidants and oxidative stress: a marriage between mechanistic and functional perspectives', *Functional Ecology* 24(5): 947-9.

McGraw, K. J., Nolan, P. M. and Crino, O. L. (2011) 'Carotenoids bolster immunity during moult in a wild songbird with sexually selected plumage coloration', *Biological Journal of the Linnean Society* 102(3): 560-72.

Metcalf, N. B. and Alonso-Alvarez, C. (2010) 'Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death', *Functional Ecology* 24(5): 984-96.

Metcalf, N. B. and Monaghan, P. (2001) 'Compensation for a bad start: grow now, pay later?' *Trends in Ecology & Evolution* 16(5): 254-60.

Metcalf, N. B. and Monaghan, P. (2003) 'Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology', *Experimental Gerontology* 38(9): 935-40.

Miller, R. A., Chrisp, C. and Atchley, W. (2000) 'Differential longevity in mouse stocks selected for early life growth trajectory', *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences* 55(9): B455-B61.

Miwa, S. and Brand, M. D. (2003) 'Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling', *Biochemical Society Transactions* 31: 1300-1.

Moller, A. P., Biard, C., Blount, J. D., Houston, D. C., Ninni, P., Saino, N. and Surai, P. F. (2000) 'Carotenoid-dependent signals: Indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability?' *Avian and Poultry Biology Reviews* 11(3): 137-59.

Monaghan, P., Charmantier, A., Nussey, D. H. and Ricklefs, R. E. (2008) 'The evolutionary ecology of senescence', *Functional Ecology* 22(3): 371-8.

Monaghan, P., Metcalfe, N. B. and Torres, R. (2009) 'Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation', *Ecology Letters* 12(1): 75-92.

Morgan, I. J., McCarthy, I. D. and Metcalfe, N. B. (2000) 'Life-history strategies and protein metabolism in overwintering juvenile Atlantic salmon: growth is enhanced in early migrants through lower protein turnover', *Journal of Fish Biology* 56(3): 637-47.

Munch, S. B. and Conover, D. O. (2003) 'Rapid growth results in increased susceptibility to predation in *Menidia menidia*', *Evolution* 57(9): 2119-27.

Murphy, M. P. (2009) 'How mitochondria produce reactive oxygen species', *Biochemical Journal* 417: 1-13.

Murphy, M. P. and Brand, M. D. (1987) 'Variable stoichiometry of proton pumping by the mitochondrial respiratory-chain', *Nature* 329(6135): 170-2.

Murphy, M. P. and Brand, M. D. (1988) 'The stoichiometry of charge translocation by cytochrome-oxidase and the cytochrome-bc1 complex of mitochondria at high membrane-potential', *European Journal of Biochemistry* 173(3): 645-51.

Nicholls, D. G. (1974) 'Influence of Respiration and Atp Hydrolysis on Proton-Electrochemical Gradient across Inner Membrane of Rat-Liver Mitochondria as Determined by Ion Distribution', *European Journal of Biochemistry* 50(1): 305-15.

Nilsson, J. A. (2002) 'Metabolic consequences of hard work', *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269(1501): 1735-9.

Nogueira, V., Piquet, M. A., Devin, A., Fiore, C., Fontaine, E., Brandolin, G., Rigoulet, M. and Leverve, X. M. (2001) 'Mitochondrial adaptation to in vivo polyunsaturated

fatty acid deficiency: Increase in phosphorylation efficiency', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 33(1): 53-61.

Nussey, D. H., Pemberton, J. M., Pilkington, J. G. and Blount, J. D. (2009) 'Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population', *Functional Ecology* 23(4): 809-17.

Nylin, S. and Gotthard, K. (1998) 'Plasticity in life-history traits', *Annual Review of Entomology* 43: 63-83.

Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979) 'Assay for Lipid Peroxides in Animal-Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction', *Analytical Biochemistry* 95(2): 351-8.

Okuda, M., Lee, H. C., Kumar, C. and Chance, B. (1992) 'Comparison of the Effect of a Mitochondrial Uncoupler, 2,4-Dinitrophenol and Adrenaline on Oxygen Radical Production in the Isolated Perfused-Rat-Liver', *Acta Physiologica Scandinavica* 145(2): 159-68.

Olsson, M. and Shine, R. (2002) 'Growth to death in lizards', *Evolution* 56(9): 1867-70.

Ortiz-Santaliestra, M. E., Jose Fernandez-Beneitez, M., Lizana, M. and Marco, A. (2011) 'Responses of Toad Tadpoles to Ammonium Nitrate Fertilizer and Predatory Stress: Differences between Populations on a Local Scale', *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(6): 1440-6.

Padalko, V. I. (2005) 'Uncoupler of oxidative phosphorylation prolongs the lifespan of *Drosophila*', *Biochemistry-Moscow* 70(9): 986-9.

Parker, J. D., Parker, K. M., Sohal, B. H., Sohal, R. S. and Keller, L. (2004) 'Decreased expression of Cu-Zn superoxide dismutase 1 in ants with extreme lifespan', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(10): 3486-9.

Partridge, L., Prowse, N. and Pignatelli, P. (1999) 'Another set of responses and correlated responses to selection on age at reproduction in *Drosophila melanogaster*', *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266(1416): 255-61.

Pearl, R. (1928) 'The rate of living': Knopf, New York.

Peterson, J. D., Peterson, V. A. and Mendonca, M. T. (2009) 'Exposure to coal combustion residues during metamorphosis elevates corticosterone content and adversely affects oral morphology, growth, and development in *Rana sphenocephala*', *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 149(1): 36-9.

Philipp, E., Brey, T., Portner, H. O. and Abele, D. (2005) 'Chronological and physiological ageing in a polar and a temperate mud clam', *Mechanisms of Ageing and Development* 126(5): 598-609.

Philipp, E., Portner, H. O. and Abele, D. (2005) 'Mitochondrial ageing of a polar and a temperate mud clam', *Mechanisms of Ageing and Development* 126(5): 610-9.

Phillips, N. E. (2004) 'Variable timing of larval food has consequences for early juvenile performance in a marine mussel', *Ecology* 85(8): 2341-6.

Pietrobon, D., Azzone, G. F. and Walz, D. (1981) 'Effect of Funiculosin and Antimycin-a on the Redox-Driven H⁺-Pumps in Mitochondria - on the Nature of Leaks', *European Journal of Biochemistry* 117(2): 389-94.

Pietrobon, D., Zoratti, M. and Azzone, G. F. (1983) 'Molecular Slipping in Redox and Atpase H⁺ Pumps', *Biochimica Et Biophysica Acta* 723(2): 317-21.

Porter, R. K. and Brand, M. D. (1995) 'Causes of Differences in Respiration Rate of Hepatocytes from Mammals of Different Body-Mass', *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 269(5): R1213-R24.

Porter, R. K., Hulbert, A. J. and Brand, M. D. (1996) 'Allometry of mitochondrial proton leak: Influence of membrane surface area and fatty acid composition', *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 271(6): R1550-R60.

Promislow, D. E. L. and Harvey, P. H. (1990) 'Living Fast and Dying Young - a Comparative-Analysis of Life-History Variation among Mammals', *Journal of Zoology* 220: 417-37.

Reading, C. J. (2007) 'Linking global warming to amphibian declines through its effects on female body condition and survivorship', *Oecologia* 151(1): 125-31.

Remolina, S. C., Hafez, D. M., Robinson, G. E. and Hughes, K. A. (2007) 'Senescence in the worker honey bee *Apis Mellifera*', *Journal of Insect Physiology* 53(10): 1027-33.

Remolina, S. C. and Hughes, K. A. (2008) 'Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees', *Age* 30(2-3): 177-85.

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': BioMed Central Ltd, p. 5.

Rigoulet, M., Fraisse, L., Ouhabi, R., Guerin, B., Fontaine, E. and Leverve, X. (1990) 'Flux dependent increase in the stoichiometry of charge translocation by mitochondrial ATPase ATP synthase induced by almitrine', *Biochimica Et Biophysica Acta* 1018(1): 91-7.

Rigoulet, M., Leverve, X., Fontaine, E., Ouhabi, R. and Guerin, B. (1998) 'Quantitative analysis of some mechanisms affecting the yield of oxidative phosphorylation: Dependence upon both fluxes and forces', *Molecular and Cellular Biochemistry* 184(1-2): 35-52.

Robert, K. A. and Bronikowski, A. M. (2010) 'Evolution of Senescence in Nature: Physiological Evolution in Populations of Garter Snake with Divergent Life Histories', *American Naturalist* 175(2): E47-159.

Roff, D. A. and Fairbairn, D. J. (2007) 'The evolution of trade-offs: where are we?' *Journal of Evolutionary Biology* 20(2): 433-47.

Rogers, K. D., Thompson, M. B. and Seebacher, F. (2007) 'Beneficial acclimation: sex specific thermal acclimation of metabolic capacity in the striped marsh frog (*Limnodynastes peronii*)', *Journal of Experimental Biology* 210(16): 2932-8.

Rolfe, D. F. S. and Brand, M. D. (1996) 'Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate', *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 271(4): C1380-C9.

Rollo, C. D. (2002) 'Growth negatively impacts the life span of mammals', *Evolution & Development* 4(1): 55-61.

Rollo, C. D., Carlson, J. and Sawada, M. (1996) 'Accelerated aging of giant transgenic mice is associated with elevated free radical processes', *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 74(4): 606-20.

Rose, M. R. (1984) 'Laboratory Evolution of Postponed Senescence in *Drosophila-Melanogaster*', *Evolution* 38(5): 1004-10.

Rose, M. R. and Bradley, T. J. (1998) 'Evolutionary physiology of the cost of reproduction', *Oikos* 83(3): 443-51.

Rose, M. R., Graves, J. L. and Hutchinson, E. W. (1990) 'The use of selection to probe patterns of pleiotropy in fitness characters', pp. 29-42.

Roussel, D., Dumas, J. F., Augeraud, A., Douay, O., Foussard, F., Malthiery, Y., Simard, G. and Ritz, P. (2003) 'Dexamethasone treatment specifically increases the basal proton conductance of rat liver mitochondria', *Febs Letters* 541(1-3): 75-9.

Rubner, M. (1908) *Das problem der lebensdauer und seine beziehungen zu ernahrung*: R. Oldenbourg.

Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Muller, F. L., Guo, M. R., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A. J., Walkey, C., Maser, R. S., Tonon, G., Foerster, F., Xiong, R., Wang, Y. A., Shukla, S. A., Jaskelioff, M., Martin, E. S., Heffernan, T. P., Protopopov, A., Ivanova, E., Mahoney, J. E., Kost-Alimova, M., Perry, S. R., Bronson, R., Liao, R. L., Mulligan, R., Shirihai, O. S., Chin, L. and DePinho, R. A. (2011) 'Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise', *Nature* 470(7334): 356-62.

Salin, K., Teulier, L., Rey, B., Rouanet, J. L., Voituron, Y., Duchamp, C. and Roussel, D. (2010) 'Tissue variation of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in cold-acclimated ducklings', *Acta Biochimica Polonica* 57(4): 409-12.

Salmon, A. B., Marx, D. B. and Harshman, L. G. (2001) 'A cost of reproduction in *Drosophila melanogaster*: Stress susceptibility', *Evolution* 55(8): 1600-8.

Salmon, A. B., Richardson, A. and Perez, V. I. (2011) 'Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?' *Free Radical Biology and Medicine* 48(5): 642-55.

Schneider, S. A., Schrader, C., Wagner, A. E., Boesch-Saadatmandi, C., Liebig, J., Rimbach, G. and Roeder, T. (2011) 'Stress Resistance and Longevity Are Not Directly Linked to Levels of Enzymatic Antioxidants in the Ponerine Ant Harpegnathos saltator', *Plos One* 6(1).

Schrader, M. and Fahimi, H. D. (2006) 'Peroxisomes and oxidative stress', *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1763(12): 1755-66.

Seehuus, S. C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T. and Amdam, G. V. (2006) 'Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(4): 962-7.

Selman, C., McLaren, J. S., Collins, A. R., Duthie, G. G. and Speakman, J. R. (2008) 'The impact of experimentally elevated energy expenditure on oxidative stress and lifespan in the short-tailed field vole *Microtus agrestis*', *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 275(1645): 1907-16.

Sibille, B., Keriél, C., Fontaine, E., Catelloni, F., Rigoulet, M. and Leverve, X. M. (1995) 'Octanoate Affects 2,4-Dinitrophenol Uncoupling in Intact Isolated Rat Hepatocytes', *European Journal of Biochemistry* 231(2): 498-502.

Silbernagl, S. and Despopoulos, A. (2008) 'Atlas de poche de physiologie (4 Éd.)'.

Sims, N. R. and Anderson, M. F. (2008) 'Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation', *Nature Protocols* 3(7): 1228-39.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. (1988) 'A Simple Technique for Quantitation of Low-Levels of DNA Damage in Individual Cells', *Experimental Cell Research* 175(1): 184-91.

Smirina, E. M. (1972) 'Les couches annuelles dans les os de *Rana temporaria*', *Zoolicheskii Zhurnal* 51: 1529-34.

Smith, T. B. and Skulason, S. (1996) 'Evolutionary significance of resource polymorphisms in fishes, amphibians, and birds', *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 111-33.

- Sohal, R. S. and Weindruch, R. (1996) 'Oxidative stress, caloric restriction, and aging', *Science* 273(5271): 59-63.
- Speakman, J. R. (2005) 'Body size, energy metabolism and lifespan', *Journal of Experimental Biology* 208(9): 1717-30.
- Spieler, M. and Linsenmair, K. E. (1999) 'Aggregation behaviour of *Bufo maculatus* tadpoles as an antipredator mechanism', *Ethology* 105(8): 665-86.
- Starkov, A. A. (1997) "'Mild" uncoupling of mitochondria', *Bioscience Reports* 17(3): 273-9.
- Stearns, S. C. (1992) *The evolution of life histories*: Oxford university press.
- Steiner, U. K. (2007) 'Linking antipredator behaviour, ingestion, gut evacuation and costs of predator-induced responses in tadpoles', *Animal Behaviour* 74: 1473-9.
- Steiner, U. K. and Van Buskirk, J. (2009) 'Predator-Induced Changes in Metabolism Cannot Explain the Growth/Predation Risk Tradeoff', *Plos One* 4(7).
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. and Brand, M. D. (2002) 'Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain', *Journal of Biological Chemistry* 277(47): 44784-90.
- Summey, M. R. and Mathis, A. (1998) 'Alarm responses to chemical stimuli from damaged conspecifics by larval anurans: Tests of three neotropical species', *Herpetologica* 54(3): 402-8.
- Townsend, C. R. and Calow, P. (1981) *Physiological ecology: an evolutionary approach to resource use*: Blackwell Scientific Publications.
- United States. Agency for Toxic Substances and Disease, R., United States Department of Health and Human Services. Public Health, S. and Research Triangle, I. (1995) *Toxicological Profile for Dinitrophenols*: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Van Allen, B. G., Briggs, V. S., McCoy, M. W. and Vonesh, J. R. (2010) 'Carry-over effects of the larval environment on post-metamorphic performance in two hylid frogs', *Oecologia* 164(4): 891-8.

Van Noordwijk, A. J. and Dejong, G. (1986) 'Acquisition and Allocation of Resources - Their Influence on Variation in Life-History Tactics', *American Naturalist* 128(1): 137-42.

Venard, R., Brethes, D., Giraud, M. F., Vaillier, J., Velours, J. and Haraux, F. (2003) 'Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase', *Biochemistry* 42(24): 7626-36.

von Schantz, T., Bensch, S., Grahn, M., Hasselquist, D. and Wittzell, H. (1999) 'Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals', *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266(1414): 1-12.

Vonesh, J. R. (2005) 'Sequential predator effects across three life stages of the African tree frog, *Hyperolius spinigularis*', *Oecologia* 143(2): 280-90.

Wallace, K. B. and Starkov, A. A. (2000) 'Mitochondrial targets of drug toxicity', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40: 353-88.

Walsh, P. T. (2010) 'Anuran life history plasticity: Variable practice in determining the end-point of larval development', *Amphibia-Reptilia* 31(2): 157-67.

Wang, Y., Salmon, A. B. and Harshman, L. G. (2001) 'A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*', *Experimental Gerontology* 36(8): 1349-59.

Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J. R. and Verhulst, S. (2004) 'Birds sacrifice oxidative protection for reproduction', *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271: S360-S3.

Williams, G. C. (1966) 'Natural Selection Costs of Reproduction and a Refinement of Lacks Principle', *American Naturalist* 100(916): 687-&.

Winston, M. L. (1987) *The biology of the honey bee*: Harvard Univ Pr.

Yearsley, J. M., Kyriazakis, A., Gordon, I. J., Johnston, S. L., Speakman, J. R., Tolkamp, B. J. and Illius, A. W. (2005) 'A life history model of somatic damage associated with resource acquisition: damage protection or prevention?' *Journal of Theoretical Biology* 235(3): 305-17.

Zera, A. J. and Harshman, L. G. (2001) 'The physiology of life history trade-offs in animals', *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 95-126.

Zhou, M. J., Diwu, Z. J., PanchukVoloshina, N. and Haugland, R. P. (1997) 'A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases', *Analytical Biochemistry* 253(2): 162-8.

Zoratti, M., Favaron, M., Pietrobon, D. and Azzone, G. F. (1986) 'Intrinsic uncoupling of mitochondrial proton pumps. 1. Nonohmic conductance cannot account for the nonlinear dependence of static head respiration on. DELTA. \sim . mu. H': ACS Publications, pp. 760-7.

Annexes

1 Article A

Salin K, Teulier L, Rey B, Rouanet JL, Voituron Y, Duchamp C, Roussel D. (2010) Tissue variation of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in cold-acclimated ducklings. *Acta Biochimica Polonica*, Volume 57, Issue 4, Pages 409-412.

Tissue variation of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in cold-acclimated ducklings*

Karine Salin², Loïc Teulier¹, Benjamin Rey³, Jean-Louis Rouanet¹, Yann Voituron², Claude Duchamp¹ and Damien Roussel¹✉

¹Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, UMR 5123 CNRS, Université de Lyon, Villeurbanne, France; ²Ecologie des Hydrosystèmes fluviaux, UMR 5023 CNRS, Université de Lyon, Villeurbanne, France; ³Biométrie et Biologie Evolutive, UMR 5558 CNRS, Université de Lyon, Villeurbanne, France

We investigated the oxidative phosphorylation efficiency of liver and gastrocnemius muscle mitochondria in thermoneutral and cold-acclimated ducklings. The yield of oxidative phosphorylation was lower in muscle than in liver mitochondria, a difference that was associated with a higher proton conductance in muscle mitochondria. Cold exposure did not affect oxidative phosphorylation efficiency or basal proton leak in mitochondria. We conclude that the basal proton conductance of mitochondria may regulate mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency, but is not an important contributor to thermogenic processes in cold-acclimated ducklings.

Keywords: thermogenesis, liver, skeletal muscle, mitochondrial oxidative phosphorylation, proton conductance

Received: 28 August, 2010; **revised:** 04 November, 2010; **accepted:** 27 November, 2010; **available on-line:** 29 November, 2010

INTRODUCTION

When chronically exposed to cold, the survival of some species of birds, including chickens, ducklings, and penguins, depends on their ability to develop non-shivering thermogenesis processes (review in Duchamp *et al.*, 1999). In the absence of both mammalian thermogenic brown adipose tissue and UCP1, both skeletal muscle and liver appear as contributors to the non-shivering thermogenesis (Duchamp & Barre, 1993; Bedu *et al.*, 2001). Two separate mechanisms have been proposed to explain how skeletal muscle may contribute to non-shivering thermogenesis. The first one is cytoplasmic and would generate heat from the futile cycling of calcium across the reticulum sarcoplasmic membrane (Dumontel *et al.*, 1995), consuming ATP and stimulating mitochondrial respiration. The second one is mitochondrial and involves loose coupling of oxidative phosphorylation (Skulachev & Maslov, 1960; Duchamp *et al.*, 1992; Roussel *et al.*, 1998), whereby a regulated leak of protons would partially dissipate the protonmotive force, producing heat instead of ATP. New evidence for this lies in the recent identification in the skeletal muscle of a functional avian uncoupling protein homologous to UCP1 (Raimbault *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2001; Talbot *et al.*, 2003), whose mRNA expression and activity are up-regulated during cold acclimation in birds (Raimbault *et al.*, 2001; Toyomizu *et al.*, 2002; Collin *et al.*, 2003; Talbot *et al.*, 2004; Rey *et al.*, 2010; Teulier *et al.*, 2010). In liver, heat generation is ill defined and may be a by-product of the increased metabolic activity of the organ rather than

involve a specific thermogenic mechanism. Indeed, cold acclimation has been reported to stimulate hepatic energy-demanding pathways such as lipogenesis and glucagon-enhanced gluconeogenesis (Bedu *et al.*, 2001; 2002).

As illustrated above, there are two fundamental ways of generating more heat for thermogenesis purpose, one is to increase the cellular ATP utilization and the other is to reduce the efficiency of mitochondrial ATP synthesis. A central requirement of these two mechanisms is the mitochondrial oxidative phosphorylation process, as mitochondria either supply the cellular energy-consuming mechanisms with ATP or undergo loose coupling, generating more heat per ATP synthesized. In the context of thermal physiology, the coupling efficiency of mitochondrial energy transduction is therefore of interest, because it describes how much energy mitochondria use for each ATP molecule they produce in the course of substrate oxidation and oxidative phosphorylation. Several studies have previously reported values of mitochondrial ADP/O ratio in muscle and liver from cold-acclimated birds, and found either a decrease or no changes when compared to the values found for control birds (Roussel *et al.*, 1998; Chainier *et al.*, 2000; Toyomizu *et al.*, 2002). However, in those studies the yield of ATP synthesis was calculated from the rates of oxygen consumption in mitochondria under fully phosphorylating active state (state 3, high concentration of ADP). In order to generate data with more physiological relevance, we initiated the study reported here. By measuring oxygen consumption and ATP synthesis at maximal and submaximal oxidative phosphorylation rates, we re-investigated the effect of cold acclimation on the energetic efficiency of skeletal muscle and liver mitochondria from ducklings. We found that the ATP yield of mitochondria was not affected by cold exposure but greatly differed between the muscle and liver mitochondria. This tissue variation was associated with a difference in the membrane proton conductivity of mitochondria.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Male muscovy ducklings (*Cairina moschata* L, pedigree R31, Institut National de la Recherche Agronomique, France) were obtained from a commercial

✉ e-mail: damroussel@yahoo.fr

* This work is related to that presented in the poster and oral forms at the 16th European Bioenergetics Conference (Warsaw, 2010); abstract in *Biochim Biophys Acta*, **1797** (Suppl): 62 (2010).

stock breeder (Ets Grimaud, France). From one-week of age, ducklings were randomly assigned to thermoneutral control group or cold-acclimated group and reared for 1 month at either 25°C (thermoneutral group) or 11°C (cold-acclimated group) under a constant photoperiod (8:16 light/dark cycle) and free access to food and water. Ducklings were fasted overnight prior to being killed by decapitation. The present investigation was conducted in accordance with the guiding principles of the French Department of Animal and Environmental Protection for the care and use of laboratory animals.

Mitochondria isolation. Muscle and liver samples were rapidly dissected, weighed, placed in ice-cold isolation buffer and homogenized with a Potter-Elvehjem homogenizer. Liver mitochondria were isolated in a buffer containing 250 mM sucrose, 2 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA, 20 mM Tris/HCl, pH 7.3 at 4°C. The liver homogenate was centrifuged at $700\times g$ for 10 min. The resulting supernatant was centrifuged at $1000\times g$ for 10 min, filtered through cheesecloth and re-centrifuged at $8700\times g$ for 10 min to pellet mitochondria. Muscle mitochondria were isolated from the internal part of the gastrocnemius muscle in a buffer containing 100 mM sucrose, 50 mM KCl, 5 mM EGTA, 50 mM Tris/HCl, pH 7.4 at 4°C. The muscle homogenate was centrifuged at $800\times g$ for 10 min. The pellet containing intermyofibrillar mitochondria was suspended in 40 ml of isolation buffer and then treated with nagarse (1 mg/g muscle wet weight) for 5 min in an ice bath. The mixture was diluted 1:2, homogenized and then centrifuged at $1000\times g$ for 10 min. The supernatant was filtered through cheesecloth and centrifuged at $8700\times g$ for 10 min. Finally, liver and muscle mitochondrial pellets were washed twice by suspension in their respective isolation buffer and centrifugation at $8700\times g$ for 10 min. The protein concentration of mitochondrial suspensions was determined by the biuret method with bovine serum albumin as a standard.

Mitochondrial respiration and ATP synthesis. Respiration was measured in a glass cell of 1.5 ml volume fitted with a Clark oxygen electrode (Rank Brothers Ltd, France), at 38°C and calibrated with air-saturated respiratory buffer (120 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 0.3% bovine serum albumin (w/v) and 3 mM Hepes, pH 7.4). Liver mitochondria (1 mg of protein/ml) and muscle mitochondria (0.3 mg of protein/ml) were incubated in the respiratory buffer supplemented with 20 mM glucose, 1.5 U/ml hexokinase, 5 μM rotenone and 5 mM succinate. Different steady states of phosphorylation were obtained by adding increasing amounts of ADP from 5 to 100 μM . The respiration rate was recorded for 2 min and four 300- μl aliquots of mitochondrial suspension were then withdrawn every 30 s and immediately quenched in perchloric acid solution (10% HClO_4 /25 mM EDTA). After centrifugation of the denatured protein ($15000\times g$ for 5 min) and neutralization of the resulting supernatant with KOH (2 M KOH/0.3 M Mops), the ATP production was determined from the samples' glucose-6-phosphate content, which was measured enzymatically by spectrophotometry according to (Bergmeyer, 1974).

It is important to note that we made sure that the rates we measured were specific of the mitochondrial ATP synthase activity, by determining oxygen consumption and ATP synthesis rates in the presence of oligomycin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Over the range of ADP concentrations used, an oligomycin-insensitive ATP synthesis activity was measurable at 100 μM ADP in skeletal muscle

mitochondria purified from both experimental groups (37 ± 12 nmol ATP/min.mg of protein and 35 ± 3 nmol ATP/min.mg of protein in control and cold-acclimated birds, respectively) and in liver mitochondria from cold-acclimated ducklings (5 ± 1 nmol ATP/min.mg of protein). These values were taken into account to calculate the rate of mitochondrial ATP synthesis.

Mitochondrial proton leak. Respiration and membrane potential were measured simultaneously using electrodes sensitive to oxygen and to the potential-dependent probe triphenyl-methyl-phosphonium (TPMP⁺), respectively. Liver mitochondria (1 mg of protein/ml) and muscle mitochondria (0.35 mg of protein/ml) were suspended in respiratory buffer supplemented with 65 ng/ml nigericin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oligomycin and 5 μM rotenone. The TPMP electrode was calibrated by sequential 0.5 μM additions up to 2 μM TPMP⁺, and then succinate was added to start the reaction. Respiration and membrane potential were progressively inhibited through successive steady states induced by additions of malonate. Membrane potential was calculated as described in (Brand, 1995), assuming a TPMP binding correction of 0.42 and 0.35 ($\mu\text{l}/\text{mg}$ of protein)⁻¹ for liver and skeletal muscle mitochondria, respectively (Rolfe *et al.*, 1994).

Statistical analysis. The statistical significance of observed differences was assessed using two-way ANOVA. Differences between means were subsequently tested by Scheffe's test.

RESULTS AND DISCUSSION

The relationships between the rates of ATP synthesis and oxygen consumption were linear in both liver and muscle mitochondria (Fig. 1A). The maximal ATP synthesis rate in muscle mitochondria (highest points to the right of the linear relationships) was significantly increased by 14% ($P < 0.01$) in cold-acclimated ducklings compared to the control birds, while the corresponding rate of oxygen consumption was slightly increased but failed to reach statistical significance (+11%, $P = 0.06$). In contrast, maximal rates of ATP synthesis and oxygen consumption were not affected by cold in liver mitochondria. Nevertheless, the relationship concerning the cold-acclimated group was superimposed on that of the thermoneutral group in both liver and skeletal muscle mitochondria (Fig. 1A). Hence, 4 weeks of cold exposure did not alter the amount of ATP synthesized from ADP per amount of oxygen consumed. This is better shown in Fig. 1B where the ATP/O ratio is plotted *versus* the oxygen consumption rate. Indeed, at any given rate of oxygen uptake, ATP/O was the same in the cold-acclimated and thermoneutral groups. The present observation that cold acclimation specifically increased the maximal capacity of skeletal muscle mitochondria to synthesize ATP with no alterations in the efficiency of oxidative phosphorylation reinforce previously published data (Roussel *et al.*, 1998; Teulier *et al.*, 2010).

Moreover, liver mitochondria displayed higher oxidative phosphorylation efficiency than skeletal muscle mitochondria (Fig. 1). Indeed, the linear relation in liver mitochondria was shifted to the left compared to muscle mitochondria, indicating that to produce a given amount of ATP, less oxygen was consumed by liver mitochondria (Fig. 1A). This remains true even though Fig. 1B shows that at maximal rates of ATP synthesis and oxygen consumption (the highest points to the right of the relationships), ATP/O was slightly higher in skeletal

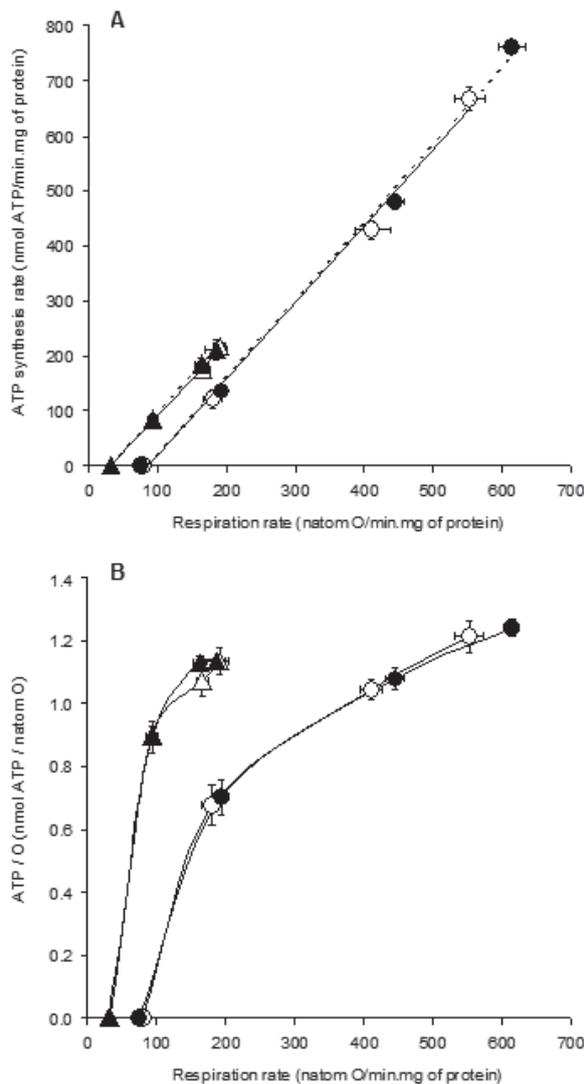


Figure 1. Effects of cold acclimation on oxidative phosphorylation efficiency

Liver (triangles) and skeletal muscle mitochondria (circles) from thermoneutral (open symbols) and cold-acclimated ducklings (filled symbols) were incubated in respiratory buffer supplemented with 20 mM glucose and 1.5 U/ml hexokinase, as described in Materials and Methods. Oxygen consumption and ATP synthesis rates were measured in the presence of increasing concentrations of ADP (0–100 μ M). Values are means \pm S.E.M. of four to six independent preparations.

muscle (+8%) than in liver mitochondria from both thermoneutral (1.21 ± 0.05 versus 1.12 ± 0.05 , $P=0.27$) and cold-acclimated ducklings (1.24 ± 0.02 versus 1.14 ± 0.01 , $P<0.05$). However, it remains that for the same fluxes, i.e., at any given rate of oxygen consumption, ATP/O was higher in liver mitochondria (Fig. 1B), indicating that liver mitochondria are set to minimize the cost of ATP production thereby optimizing ATP synthesis for cellular processes. In turn, it appears that mitochondria are more “thermogenic” in the skeletal muscle than in the liver, a characteristic that would be further pronounced in resting skeletal muscle, when cellular ATP demand and mitochondrial phosphorylation activity are low (Fig. 1B).

As suggested from Fig. 2 in (Roussel *et al.*, 2002), a difference in the membrane proton conductivity between liver and muscle mitochondria might explain

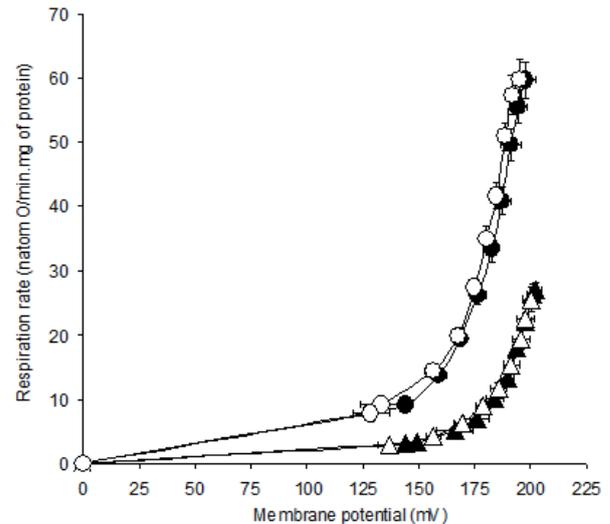


Figure 2. Effect of cold acclimation on basal proton leak

Liver (triangles) and skeletal muscle mitochondria (circles) from thermoneutral (open symbols) and cold-acclimated ducklings (filled symbols) were incubated in respiration buffer supplemented with 65 ng/ml nigericin and 1 μ g/ml oligomycin, as described in Materials and Methods. Oxygen consumption rate and membrane potential were measured in the presence of increasing concentrations of malonate (0–3 mM). Values are means \pm S.E.M. of seven independent preparations.

such a difference in ATP yield. The reason for this being that in the effective ATP/O values reported in Fig. 1B, a fraction of the oxygen consumed is associated with proton leaks in the inner membrane and not directly involved in the production of ATP (Stuart *et al.*, 2001). We therefore measured the activity of basal proton leak in both liver and skeletal muscle mitochondria from thermoneutral and cold-acclimated ducklings (Fig. 2). It clearly appeared that the liver inner mitochondrial membrane displayed a lower leak than the skeletal muscle inner mitochondrial membrane. Indeed, at any given membrane potential, the rate of oxygen consumed to counteract the proton leak (mitochondria respiring in the presence of oligomycin) was lower in the liver than in skeletal muscle mitochondria. Interestingly, cold exposure did not alter the basal proton leak of either mitochondrial type (Fig. 2), which may explain why the mitochondrial ATP yield was not different in thermoneutral and cold-acclimated ducklings. Interestingly, it was found previously that cold exposure altered the basal proton leak in muscle and liver mitochondria from rats (Mollica *et al.*, 2005), underlining some species specificities in mitochondrial adaptations toward cold exposure. Finally, it is important to keep in mind that the basal proton leak measured in the present study was not related to the activity of avian uncoupling protein, which requires specific activators (free fatty acids and superoxides) and inhibitor (GDP) to function (Talbot *et al.*, 2003). Alternatively, it has been suggested that the basal proton conductance of mitochondria might depend on the ADP/ATP carrier content (Brand *et al.*, 2005). Since skeletal muscle is well known to have a higher content of the ADP/ATP carrier than liver mitochondria (Rossignol *et al.*, 2000; Mollica *et al.*, 2005; Hulbert *et al.*, 2006), the lower coupling of oxidative phosphorylation reported in duckling skeletal muscle mitochondria would be explained by their higher content of ADP/ATP carrier. This assumption deserves further investigation.

The slope values of the linear relationships shown in Fig. 1A describe the amount of extra oxygen that mitochondria have to consume in order to sustain an additional ATP production imposed by a change in the activity of the phosphorylating system, and so independently of the activity of ATP synthesis-independent proton gradient-consuming processes (e.g., proton leak). As such, these values would be close to, if any a measure of, the mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. Notwithstanding, these slopes displayed an average value of 1.38 ± 0.02 and were not significantly different between liver and skeletal muscle mitochondria or between control and cold-acclimated ducklings. Surprisingly, this is a good estimate of the maximal P/O ratio for succinate if we assume that duckling mitochondrial ATP synthase is comprised of three $\alpha\beta$ pairs, hence three catalytic sites, in its catalytic sector F_1 , and ten c-subunits in its membrane embedded sector, F_0 (Stock *et al.*, 1999), which would predict an H^+ /ATP ratio of 10/3 and an overall coupling stoichiometry of 4.33 (Brand, 2005).

In conclusion, the basal proton conductance of mitochondria may be a determinant of the effective ATP/O ratio but it does not play an important role in the development of non-shivering thermogenesis in cold-acclimated ducklings.

REFERENCES

- Bedu E, Cohen-Adad F, Dallevet G, Garin D, Barre H, Duchamp C (2001) Effect of cold-acclimation on oxygen uptake and glucose production of perfused duckling liver. *Comp Biochem Physiol* **128A**: 851–861.
- Bedu E, Châinier F, Sibille B, Meister R, Dallevet G, Garin D, Duchamp C (2002) Increased lipogenesis in isolated hepatocytes from cold-acclimated ducklings. *Am J Physiol* **283**: R1245–R1253.
- Bergmeyer HU (1974) In *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie Weinheim Academic Press, Inc., New York.
- Brand MD (1995) Measurement of mitochondrial proton motive force. In *Bioenergetics — a practical approach*, Brown GC, Cooper CE, eds, pp 39–62. IRL Press, Oxford.
- Brand MD (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem Soc Trans* **33**: 897–904.
- Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, Cornwall EJ (2005) The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J* **392**: 353–362.
- Châinier F, Roussel D, Georges B, Meister R, Rouanet JL, Duchamp C, Barré H (2000) Cold acclimation or grapeseed oil feeding affects phospholipid composition and mitochondrial function in duckling skeletal muscle. *Lipids* **35**: 1099–1106.
- Collin A, Buyse J, van As P, Darras VM, Malheiros RD, Moraes VMB, Reyns GE, Taouis M, 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.
- Duchamp C, Barre H (1993) Skeletal-muscle as the major site of non-shivering thermogenesis in cold-acclimated ducklings. *Am J Physiol* **265**: R1076–R1083.
- Duchamp C, Marmonier F, Denjean F, Lachuer J, Eldershaw TPD, Rouanet JL, Morales A, Meister R, Benistant C, Roussel D *et al.* (1999) Regulatory, cellular and molecular aspects of avian muscle nonshivering thermogenesis. *Ornis Fenn* **76**: 151–165.
- Duchamp C, Cohen Adad F, Rouanet JL, Barre H (1992) Histochemical arguments for muscular nonshivering thermogenesis in muscovy ducklings. *J Physiol* **457**: 27–45.
- Dumontel E, Barre H, Meissner G (1995) Expression of sarcoplasmic-reticulum Ca^{2+} transport proteins in cold-acclimating ducklings. *Am J Physiol* **269**: C955–C960.
- Hulbert AJ, Turner N, Hinde J, Else P, Guderley H (2006) How might you compare mitochondria from different tissues and different species? *J Comp Physiol B* **176**: 93–105.
- Mollica AP, Lionetti L, Crescenzo R, Tasso R, Barletta A, Liverini G, Iossa S (2005) Cold exposure differently influences mitochondrial energy efficiency in rat liver and skeletal muscle. *FEBS Lett* **579**: 1978–1982.
- Raimbault S, Dridi S, Denjean F, Lachuer J, Couplan E, Bouillaud F, Bordas A, Duchamp C, Taouis M, Ricquier D (2001) An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem J* **353**: 441–444.
- Rey B, Roussel D, Romestaing C, Belouze M, Rouanet JL, Desplaches D, Sibille B, Servais S, 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.
- Rolfe DFS, Hulbert AJ, Brand MD (1994) Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative-phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* **1188**: 405–416.
- Rosignol R, Letellier T, Malgat M, Rocher C, Mazat JP (2000) Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem J* **347**: 45–53.
- Roussel D, Rouanet JL, Duchamp C, Barre H (1998) Effects of cold acclimation and palmitate on energy coupling in duckling skeletal muscle mitochondria. *FEBS Lett* **439**: 258–262.
- Roussel D, Harding M, Runswick MJ, Walker JE, Brand MD (2002) Does any yeast mitochondrial carrier have a native uncoupling protein function? *J Bioenerg Biomembr* **34**: 165–176.
- Skulachev VP, Maslov SP (1960) The role of nonphosphorylating oxidation in temperature regulation. *Biochemistry (Moscow)* **25**: 826–832.
- Stock D, Leslie AGW, Walker JE (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**: 1700–1705.
- Stuart JA, Cadenas S, Jekabsons MB, Roussel D, Brand MD (2001) Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochim Biophys Acta* **1504**: 144–158.
- Talbot DA, Hanuise N, Rey B, Rouanet JL, Duchamp C, Brand MD (2003) Superoxide activates a GDP-sensitive proton conductance in skeletal muscle mitochondria from king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *Biochem Biophys Res Commun* **312**: 983–988.
- Talbot DA, Duchamp C, Rey B, Hanuise N, Rouanet JL, Sibille B, Brand MD (2004) Uncoupling protein and ATP/ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins. *J Physiol* **558**: 123–135.
- Teulier L, Rouanet JL, Letexier D, Romestaing C, Belouze M, Rey B, Duchamp C, Roussel D (2010) Cold-acclimation-induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency. *J Exp Biol* **213**: 2476–2482.
- Toyomizu M, Ueda M, Sato S, Seki Y, Sato K, Akiba Y (2002) Cold-induced mitochondrial uncoupling and expression of chicken UCP and ANT mRNA in chicken skeletal muscle. *FEBS Lett* **529**: 313–318.
- Vianna CR, Hagen T, Zhang CY, Bachman E, Boss O, Gereben B, Moriscot AS, Lowell BB, Bicudo J, Bianco AC (2001) Cloning and functional characterization of an uncoupling protein homolog in hummingbirds. *Physiol Genomics* **5**: 137–145.

2 Article B

Salin K, Voituron Y, Mourin J, Hervant F. (2010) Cave colonization without fasting capacities: an example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part A, molecular & integrative physiology*, Volume 156, Issue 4, Pages 451-457.



Cave colonization without fasting capacities: An example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*

K. Salin^{a,*}, Y. Voituron^a, J. Mourin^b, F. Hervant^a

^a Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux, UMR CNRS 5023, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne cedex, France

^b Aquarium du Grand Lyon, 7 rue Stéphane Déchant, 69350 La Mulatière, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 December 2009

Received in revised form 26 March 2010

Accepted 27 March 2010

Available online 9 April 2010

Keywords:

Fish
Hypogean
Metabolism
Starvation
Refeeding
Ecophysiology

ABSTRACT

Subterranean animals have commonly evolved hypoactivity, hypometabolism and/or the sequential use of energetic reserves to tolerate long fasting periods imposed by the low food levels found in subterranean environments. However, some tropical caves are characterized by a potential high level of nutriment. By using the tropical fish *Astyanax fasciatus* that presents both populations subterranean (*Astyanax fasciatus mexicanus*) and epigeal (*Astyanax fasciatus fasciatus*) populations, we described behavioral, metabolic and biochemical responses during a long-term fasting period followed by a refeeding period. The results demonstrated that fed hypogean fishes exhibited different energy stores together with a hypometabolism. But, despite drastic decreases in locomotory activity and oxygen consumption during fasting, hypogean fishes consumed significantly more glycogen, triglycerides and proteins during the starvation period than epigeal fishes. This lower fasting capacity showed by hypogean fishes is confirmed by the higher activation of the compensatory metabolic pathways (ketogenesis and gluconeogenesis). After the refeeding period, cave fishes did not recover from the “food deprivation” stress, and resume fed levels in glycogen, triglyceride reserves and proteins, in contrast to epigeal ones. This study thus demonstrates that starvation adaptations are not necessary for cave life, but are rather correlated to the “energetic state” of each ecosystem, and that troglomorphy is not linked to starvation capacities and thus not to the impoverished food availability.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The ability to withstand and recover from long periods of nutritional stress is a critical adaptation for the colonization by and/or survival of any organism in food-limited environments (Mendez and Wieser, 1993; Hervant et al., 1998, 1999, 2001; Hervant and Renault, 2002; Fonseca and Cabral, 2007). Even if subterranean habitats are characterized by constant abiotic factors, such as darkness, high humidity, and temperature (Poulson, 1963), several of them (i.e. phreatic and karstic aquifers) also exhibit high temporal and spatial patchiness of food availability resulting from a lack of autotrophic production and sporadic, unpredictable and allochthonous input (Hüppop, 2005). In contrast, other hypogean ecosystems show high food availability like some tropical caves (Deharveng, 2005), biotopes with guano-based areas (Gnaspini, 2005) and caves containing sulfurous water (Langecker et al., 1996; Palmer and Hill, 2005). Studies focused on fasting capacities in hypogean organisms mainly included species from temperate regions and showed effective behavioral, physiological and metabolic adaptations allowing them to exploit such harsh subterranean environments

successfully [crustaceans (Spicer, 1998; Hervant et al., 1997, 1998, 1999; Hervant and Renault, 2002), amphibians (Hervant et al., 2001)].

These studies showed that hypogean organisms display capacity to accumulate large amounts of triglycerides (Hervant et al., 1998, 1999; Hervant and Renault, 2002; Vögt and Strus, 1999), maintain a lower basal metabolic rate (Hervant et al., 1998; Hervant and Renault 2002) during food-rich periods, and exhibit a sequential utilization of energy substrates during fasting (Hervant et al., 1999; Hervant and Renault, 2002). When food becomes available *de novo*, subterranean organisms, in contrast to epigeal ones, recover quickly and completely from nutritional stress, with regard to locomotory activity, metabolic rate and energy reserves (Hervant et al., 1998, 1999, 2001; Hervant and Renault, 2002).

However, Spicer (1998) argued that “hypogean animals inhabiting “energy rich” environments... should have no requirement for a genetically-determined reduced metabolism” allowing low energy use. Furthermore, as energy storage can be costly (synthesis and maintenance of storage products, reduced mobility and increased susceptibility to predators, e.g. Witter and Cuthill, 1993), *trade-offs* are expected, so in environments with small resource fluctuations, there is no selective advantage to store energy. An absence of differences in metabolism and energy reserves between epigeal and hypogean tropical organisms can be expected. These untested hypotheses deserve testing and constitute only a part of the general question regarding the relationship between

* Corresponding author. Tel.: +33 4 72 43 15 20; fax: +33 4 72 43 11 41.

E-mail address: karine.salini@univ-lyon1.fr (K. Salin).

nutritional constraints imposed by subterranean environments and the physiology of organisms at tropical latitudes.

Moreover, it is noteworthy that nearly all the previous studies have focused on the adult stage of distantly related species from temperate aquifers, with groups differing in ages and sizes. Such a protocol may weaken the strength of the interpretation especially with regard to evolutionary physiology because of both phylogenetic (Garland et al., 2005) and ontogenetic effects (Suneetha et al. 1999; Gwak and Tanaka 2001). Indeed, the surface-dwelling ancestors of many cave forms have become extinct, leaving their underground derivatives as the sole representatives of the taxon. However, a few rare species like the *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 present both hypogean and epigeal populations thus facilitating the study of evolutionary physiology. These freshwater fishes have a broad distribution on the American continent (Romero and Paulson, 2001) but have evolved hypogean populations mainly at tropical latitudes with high food availability (Mitchell et al., 1977; Deharveng, 2005).

Ontogeny is known to affect a number of physiological parameters such as starvation (i.e. Suneetha et al. 1999; Gwak and Tanaka 2001) demonstrating the importance of comparing specimens of the same age. The adaptive strategies of fish during early development are known to be crucial for the species' success. Mortality rates at early stages are generally high, often due to starvation and predation pressures (Post and Parkinson, 2001; Fonseca and Cabral, 2007). In groundwater ecosystems, predation pressures are often absent, whereas food deprivation periods are one of the main environmental sources of stress (Hüppop, 2005). The metabolic consequences of such events being most pronounced in juveniles (Mendez and Wieser, 1993), the juvenile stage must thus be considered to be a crucial step in the strategies adopted by a species facing a stressful situation, especially in groundwaters. For all these reasons, juvenile hypogean organisms provide crucial informations within the framework of an ecophysiological approach and were therefore used in the following experiments.

Here, for the first time, we propose to compare cave-dwelling and surface-dwelling tropical organisms from the same species complex (*A. fasciatus*) and of the same age (juvenile) and size range (thus avoiding a number of biases), during long-term starvation (two months) and subsequent recovery (12 days) with the following objectives: 1– to determine behavioral, physiological and metabolic responses to starvation and refeeding; 2– to demonstrate whether compulsory groundwater colonization induced genetically-determined starvation capacities.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental protocol

Epigeal populations, *Astyanax fasciatus fasciatus*, and cave populations (completely blind and depigmented), *Astyanax fasciatus mexicanus*, interbreed in both natural and laboratory conditions, producing fertile hybrids and a F2 generation with a multiple phenotypically intermediate forms (Hüppop, 1986; Romero and Paulson, 2001). Five-month old juvenile *A. fasciatus* from both populations ($n = 224$ each) were obtained from a professional breeder (Nguyen, Kingersheim, France) and were raised in the "Grand Lyon" aquarium (a specialized institution, La Mulatière, France). On reception of the animals, in order to acclimatize them, both populations were fed every two days with *chironomid* larvae in amounts equivalent to 5% of fish body mass for 20 days before the fasting and refeeding experiments. Both populations of fishes were divided into three groups: 45 fishes in a 200 L aquarium for the initially fed group, 30 fishes in a 200 L aquarium which were used to follow variations in body mass, locomotory activity and basal metabolism during starvation and recovery, and 149 fishes in an 800 L aquarium used only for metabolite assays. The density obtained (10^{-4} kg/m³) is much lower

than density imposed by EU laws (maximal fish density of 1 kg/m³). *In vivo* measurements (body mass, locomotory activity and basal metabolism) and metabolite assays (glycogen, triglycerides, protein, ATP, glucose, ketone bodies, and glycerol) were carried out: during the feeding stage, after one and two months of fasting, after a five-day refeeding period (only for *in vivo* measurements) and after a 12-day refeeding period following the two month starvation period. The recovery capacities after 12 days of refeeding were estimated to represent 20% of the food deprivation period (2 months). According to previous studies, this duration should be sufficient to completely recover the characteristics of fed animals (Hervant et al., 1999, 2001; Hervant and Renault, 2002). For the entire experiment, the fishes of both populations were maintained separately in aquaria with aerated fresh water at 24 °C with a 12 h/12 h light/dark cycle and with much less intense lighting for the hypogean ones ($0.16 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in *A. fasciatus mexicanus*, versus $8.60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in *A. fasciatus fasciatus*, monitored with a photometer model LI250, Eurosep instruments, USA). Professional breeders have found both cave- and surface-dwelling fish to survive, grow and breed optimally in such an environment. The present investigation was carried out according to the ethical principles of the French Ministry of agriculture and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Scientific Purposes (Council of Europe, no. 123, Strasbourg).

2.2. Locomotory activity

To quantify behavioral adaptations to varying resource-levels for each individual, we counted the number of caudal fin movements during a 2 minute observation period ($n = 30$). Observations were done visually, in the 200 L aquarium, on randomly chosen individuals at the same time of day to counter the potential effects of the circadian rhythm according to Hervant et al. (1998, 1999a and 2001).

2.3. Basal metabolism

For both types, rates of oxygen consumption were measured under standardized conditions, at the same time of day. Oxygen consumption was measured for 2 to 3 h (in darkness) in a closed respirometer placed in a constant temperature chamber at 25.0 ± 0.2 °C and supplied with normoxic water. One hour before the experiments began, fed, starved and refed fishes were transferred individually into a 200 mL Plexiglas metabolic chamber which was part of the respirometer. Oxygen depletion inside the system was monitored with an oxymeter (oxi 330i, WTW, Germany) accurate to ± 0.01 mg O₂/L. Fed individuals were starved for two days before experiments to ensure that the digestive metabolism did not affect the results.

2.4. Metabolic assays

To investigate changes in levels of key metabolites and in body composition, initially fed, starved and refed individuals were frozen in liquid nitrogen. Fed and refed groups were deprived of food for 72 h before being sacrificed to avoid measuring the metabolic contents in the digestive bolus in addition to metabolite contents in the whole animal. Before each extraction, individuals were weighed. The following metabolites were determined as described in Hervant et al. (1995, 1996) by standard enzymatic methods (Bergmeyer, 1985): ATP, glucose and glycogen. Total proteins, triglycerides and glycerol were extracted according to the methods of Elendt (1989) and Barclay et al. (1983), and then determined using specific test-combinations (Boehringer-Mannheim, Germany). Ketone bodies (acetoacetate and β -hydroxybutyrate) contents were extracted like ATP, glucose and glycerol and assayed using the specific kit no. 067 (Biosentec, Toulouse, France) containing hydroxybutyrate dehydrogenase. All assays were performed using a recording spectrophotometer (Aquamate, Thermo electron corporation, USA) at 25 °C, except for the ATP assays, which were performed in an LKB

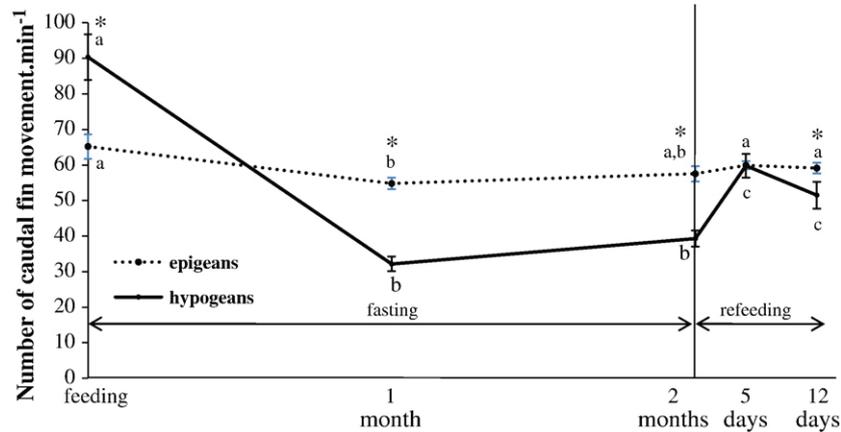


Fig. 1. Changes in locomotory activity during long-term starvation (2 months) and subsequent refeeding (15 days) in the surface-dwelling fish *A. fasciatus fasciatus* and the cave-dwelling fish *A. fasciatus mexicanus*. Values are means \pm S.E.M. for $n = 15$ to 30. The same letter within the same population at different time intervals is not significantly different. An asterisk indicates a value that is significantly different between two populations of fishes.

210 luminometer. Enzymes, coenzymes and substrates used for enzymatic assays were purchased from Boehringer (Mannheim, Germany) and Sigma Co. (St Louis, USA).

2.5. Statistical analyses

The inter-taxa comparisons were determined using Student's *t*-tests at the appropriate time intervals ($n = 15$ for biochemical analyses and $n = 30$ for *in vivo* experiments). At the intra-taxon among time intervals were compared using a one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test for multiple comparisons. Data were expressed as mean \pm S.E.M. and considered significantly different when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Body mass

With a 30 individuals sample per population, fresh masses of initially fed organisms, were significantly higher in epigean fishes ($0.581 \text{ g} \pm 0.009$) than in hypogean ones (0.549 ± 0.010 ; t -value = 2.32, $df = 58$, $P < 0.05$). The decrease in body mass was of the same magnitude for both populations during the two months of starvation (-30%). During the refeeding period, surface-dwelling and cave-dwelling fishes did not show

a significant increase in body mass. Consequently, they did not recover their initial weight after 12 days of refeeding.

3.2. Locomotory activity

Initially fed cave-dwelling fishes displayed a spontaneous activity rate 1.5-fold higher than that of surface organisms (Fig. 1; t -value = -3.45 , $df = 58$; $P < 0.001$). While hypogean locomotory activity decreased highly during fasting (-64% after 1 month of fasting and -56% after 2 months of fasting), the surface fishes' activity decreased slightly during the first month of fasting (-16% , Tukey's post-hoc test, $P < 0.05$) and returned to the fed values on the second month (Tukey's post-hoc test, $P = 0.11$). During refeeding, activity returned to initially fed level for epigeans ($F_{2,87} = 2.13$, $P = 0.13$) and was lower than the initially fed level (-38% , $F_{2,77} = 17.62$, $P < 0.001$) for hypogean organisms.

3.3. Basal metabolism

The cave-dwelling *A. fasciatus mexicanus* showed an oxygen consumption rate two times lower than that of surface-dwelling individuals during feeding, fasting and refeeding ($P < 0.001$, see Fig. 2). In hypogean fishes, fasting resulted in a decrease in oxygen consumption (-29% , $F_{2,85} = 84.47$, $P < 0.001$). No significant changes in epigean basal metabolism were observed during food deprivation.

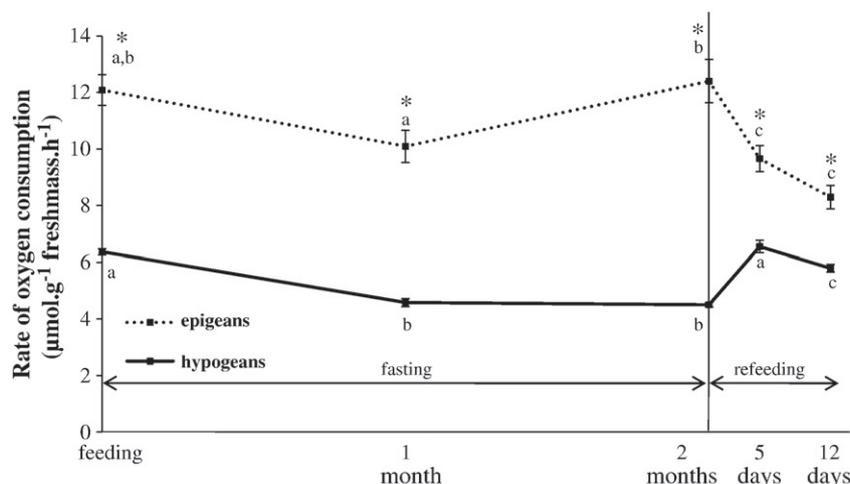


Fig. 2. Changes in the rate of oxygen consumption during long-term starvation (2 months) and subsequent refeeding (15 days) in the surface-dwelling fish *A. fasciatus fasciatus* and the cave-dwelling fish *A. fasciatus mexicanus*. Values are means \pm S.E.M. for $n = 15$ to 30. The same letter within the same population at different time intervals is not significantly different. An asterisk indicates a value that is significantly different between two populations of fishes.

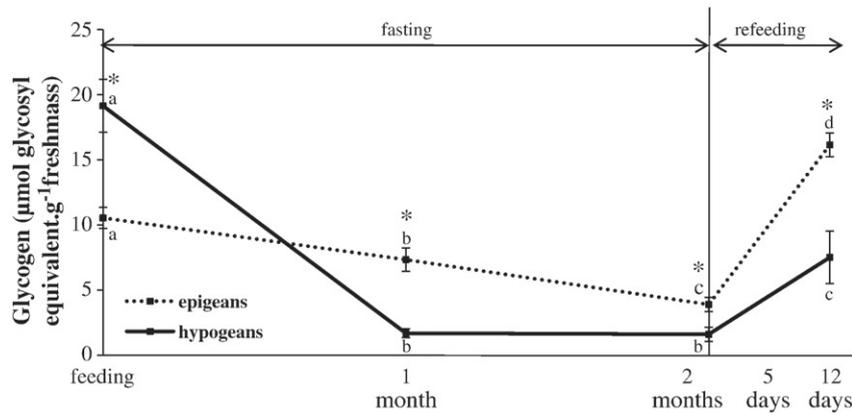


Fig. 3. Changes in glycogen body level during long-term starvation (2 months) and subsequent refeeding (15 days) in the surface-dwelling fish *A. fasciatus fasciatus* and the cave-dwelling fish *A. fasciatus mexicanus*. Values are means \pm S.E.M. for $n = 15$ to 30. The same letter within the same population at different time intervals is not significantly different. An asterisk indicates a value that is significantly different between two populations of fishes.

Oxygen consumption increased after 5 days of recovery (+31%), returning to the initially fed level in hypogean fishes. Refeeding resulted in a decrease in the rate of oxygen consumption for epigean fishes, falling to 79% of the 2 month fasting values after 5 days of refeeding and 67% after 12 days.

3.4. Metabolic assays

Glycogen body content was twice as high in initially fed hypogean fishes as in initially fed epigean ones (Fig. 3). During fasting and refeeding, *A. fasciatus mexicanus* showed a glycogen level significantly lower than *A. fasciatus fasciatus* (t -tests, all $P < 0.001$). In hypogean organisms, glycogen content decreased within the first month of fasting, reaching 9% of the fed level. In the epigean population, the glycogen level decreased slowly to 63% of the fed level after 2 months of starvation. During recovery, both populations displayed a significant increase in glycogen content, reaching only 39% of the initial value for hypogean and 135% for epigean organisms.

Significantly lower triglyceride body levels were observed in fed *A. fasciatus mexicanus* than in fed *A. fasciatus fasciatus* (Table 1). In epigean fishes, body triglycerides remained constant during feeding, fasting and refeeding stages, whereas the first month of starvation resulted in a significant decrease in triglyceride content (−91%) in cave-dwelling fishes. During refeeding, hypogeans showed a triglyceride content no significant higher than that of starved ones (Tukey's post-hoc test, $P = 0.86$), but lower than fed individuals (Tukey's post-hoc test, $P < 0.05$).

During starvation, the glycerol body content of hypogean fishes showed no significant variation during the first month, but decreased after 2 months of starvation, reaching 49% of the fed level (Table 1). After 12 days of refeeding, hypogean organisms presented a glycerol content identical to the initially fed organisms. With regard to surface-dwelling fishes, glycerol content increased to 160% of the fed value after one month of fasting. During the second month glycerol content returned to the initially fed fish level and during refeeding glycerol content was maintained identical to the initially fed fish level.

In the epigean fish, body proteins were maintained around a level of 21 mg protein g^{-1} fresh mass during feeding, fasting and refeeding stages, whereas the first month of starvation resulted in a significant decrease in protein content (−12%) in cave-dwelling fishes (in appendix: Supplementary Table A). During both the second month of starvation and the refeeding, protein content remained constant and lower than values obtained with fed animals.

During the feeding stage, body glucose was higher in cave fishes than in surface ones (in appendix: Supplementary Table B). During starvation, both populations catabolised glucose, but at a greater rate in hypogean fishes than in epigean fishes (41.7 nmol g^{-1} fresh mass per day of fasting in *A. fasciatus mexicanus*, versus 10.0 nmol g^{-1} fresh mass per day of fasting in *A. fasciatus fasciatus*). During recovery, the glucose content of epigean fishes returned to the initially fed fish level, whereas in hypogean fishes it increased to +86% of the value measured in the starvation group, but did not reach the initially fed fish value (−43%). No significant changes in the ATP content, average $7.73 \pm 0.05 \mu\text{mol } g^{-1}$ fresh mass, were observed during food deprivation and subsequent

Table 1
Changes in triglycerides and glycerol body levels during long-term starvation (2 months) and subsequent refeeding (15 days) in the surface-dwelling fish *A. fasciatus fasciatus* and the cave-dwelling fish *A. fasciatus mexicanus*. Values are means \pm S.E.M. with numbers of animals used within brackets. The same letters within the same population at different time intervals are not significantly different.

	Triglycerides			Glycerol		
	(μmol equivalent glycerol g^{-1} fresh mass)			(μmol g^{-1} fresh mass)		
	Hypogeans	Epigeans	Test t	Hypogeans	Epigeans	Test t
Initially fed	^a 41.21 \pm 15.76 (10)	^a 65.80 \pm 28.45 (11)	t -value = 2.41 $df = 19$ $P < 0.05$	^a 2.75 \pm 0.22 (11)	^a 2.62 \pm 0.23 (12)	t -value = −0.39 $df = 21$ $P = 0.70$
1 month of fasting	^b 3.77 \pm 1.74 (9)	^a 63.44 \pm 18.41 (9)	t -value = 9.10 $df = 15$ $P < 0.001$	^a 3.42 \pm 0.23 (10)	^b 4.20 \pm 0.26 (10)	t -value = 2.24 $df = 18$ $P < 0.05$
2 months of fasting	^b 2.89 \pm 1.00 (8)	^{ab} 41.99 \pm 28.87 (11)	t -value = 4.90 $df = 22$ $P < 0.001$	^b 1.34 \pm 0.17 (8)	^a 2.04 \pm 0.17 (12)	t -value = 2.92 $df = 18$ $P < 0.001$
12 days of refeeding	^c 6.42 \pm 4.14 (5)	^b 25.57 \pm 3.79 (9)	t -value = 8.78 $df = 12$ $P < 0.001$	^a 2.54 \pm 0.30 (5)	^a 2.08 \pm 0.33 (9)	t -value = −0.91 $df = 12$ $P = 0.79$

Table 2

Changes in ketone bodies body level during long-term starvation (2 months) and subsequent refeeding (15 days) in the surface-dwelling fish *A. fasciatus fasciatus* and the cave-dwelling fish *A. fasciatus mexicanus*. Values are means \pm S.E.M. with numbers of animals used within brackets. The same letter within the same population at different time intervals is not significantly different.

	β -Hydroxybutyrate			Acetoacetate		
	($\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh mass)			($\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh mass)		
	Hypogean	Epigean	Test <i>t</i>	Hypogean	Epigean	Test <i>t</i>
Initially fed	^a 92.96 \pm 11.35 (11)	^a 94.64 \pm 7.48 (12)	<i>t</i> -value = 0.13 <i>df</i> = 21 <i>P</i> = 0.90	^a 42.43 \pm 11.35 (11)	^a 40.17 \pm 7.64 (12)	<i>t</i> -value = -0.17 <i>df</i> = 21 <i>P</i> = 0.87
1 month of fasting	^b 172.29 \pm 24.49 (10)	^b 134.24 \pm 10.89 (10)	<i>t</i> -value = -1.42 <i>df</i> = 18 <i>P</i> = 0.17	^a 66.70 \pm 14.42 (10)	^b 45.50 \pm 7.91 (10)	<i>t</i> -value = -1.29 <i>df</i> = 18 <i>P</i> = 0.21
2 months of fasting	^c 275.92 \pm 32.17 (8)	^c 194.18 \pm 12.96 (12)	<i>t</i> -value = -2.68 <i>df</i> = 18 <i>P</i> < 0.05	^b 133.02 \pm 18.22 (8)	^c 73.68 \pm 7.31 (12)	<i>t</i> -value = -3.44 <i>df</i> = 12 <i>P</i> < 0.05
12 days of refeeding	^a 84.08 \pm 11.67 (5)	^a 83.53 \pm 11.67 (9)	<i>t</i> -value = -0.03 <i>df</i> = 12 <i>P</i> = 0.97	^a 44.75 \pm 12.78 (5)	^a 40.02 \pm 11.13 (9)	<i>t</i> -value = -2.27 <i>df</i> = 12 <i>P</i> = 0.79

renutrition (hypogean: $F_{3,30} = 0.57$, $P = 0.63$; epigean: $F_{3,39} = 1.29$, $P = 0.94$; in appendix: Supplementary table C).

Although presenting identical levels in both population at the fed state, body content of ketone bodies increased more in the hypogean than in the epigean population during starvation: acetoacetate increased 3.1-fold and 1.8-fold respectively in hypogean and epigean organisms, and β -hydroxybutyrate: increased 3.0-fold and 2.1-fold respectively in hypogean and epigean fishes (see Table 2).

4. Discussion

Since groundwater ecosystems are generally thought to be food-limited habitats, various hypogean species have evolved fasting resistance and feeding efficiency strategies (Hervant et al., 1999, 2001; Hervant and Renault, 2002). However, physiological and biochemical comparative studies between hypogean and epigean organisms are potentially weakened by the genetic distances existing between the species studied (Garland et al., 2005). As far as we know, only Culver and Poulson (1971) then Huppopp (1986) compared the metabolism of individuals from closely related species (respectively the amphipod *Stygonectes* sp. and the fish *A. fasciatus*). The present investigation compared the fasting abilities of hypogean and epigean populations belonging to the same species, at the same age and size range. Such a *modus operandi* excluded both ontogenetic and phylogenetic biases that could alter the interpretation of results (Garland et al., 2005). Based on a number of comparisons between temperate hypogean and epigean animals, Hervant and Renault (2002) argued that the ability to withstand long-term fasting in groundwater organisms involves the possession of low energetic requirements, large body stores and high recovery abilities during refeeding, leading to an optimal utilization of available food energy and therefore rapid restoration of the body reserves depleted during nutritional stress. However, comparison with tropical organisms was till now impossible due to the lack of data.

4.1. Hypogean and epigean *A. fasciatus* at feeding stage

When fed, the hypogean fishes showed a locomotory activity higher than that of epigean ones, which was contrary to data observed in hypogean crustaceans and amphibians studied before (Hervant et al., 1998, 1999, 2001; Hervant and Renault, 2002) but in complete agreement with data on other cave-dwelling fishes such as *Typhlichthys subterraneus*, *Amblyopsis spelea* and *Amblyopsis rosae* (Poulson, 1963). This apparent disparity found in fishes could be explained by differences in the sensory organs that enable them to perceive their environment. Indeed, without eyes, the main sense capable of providing detailed

information on the immediate surroundings of fishes is the mechanosensory lateral line system (Burt de Perera, 2004, Windsor et al., 2008). This organ is common among fishes, but the lateral line capacities of cave fishes are enhanced with respect to their sighted relatives (Windsor et al., 2008). Cave fishes thus have to move permanently to be informed about their environment (Burt de Perera, 2004).

In addition, hypogean fishes exhibited a lower standard metabolic rate than epigean ones, which agrees with previous investigations on crustaceans (Hervant et al., 1998, 1999), fishes (Poulson, 1963; Huppopp, 1986, Ercolini et al., 1987) and amphibians (Hervant et al., 2001). Hypometabolism is generally considered as a preadaptation to low food supplies (Poulson, 1963; Spicer, 1998; Hervant et al., 1998, 1999, 2001; Hervant and Renault, 2002) so it was unexpected in regard to the “energy rich environment” of the hypogean *A. fasciatus*. Regarding energy reserves, like most subterranean species, the crustacean *Stenasellus virei* presents both body triglyceride and glycogen levels higher than the epigean crustacean *Asellus aquaticus* (Hervant and Renault, 2002). However, the present data with *A. fasciatus* shows a more complex pattern. The hypogean population exhibited significantly lower triglyceride body contents but higher glycogen contents compared to the epigean population (see Table 1). Thus, the hypometabolism associated with higher glycogen reserve observed in the fish *A. fasciatus mexicanus* at the fed state constitutes a characteristic enabling it to withstand long-term starvation period.

4.2. Hypogean and epigean *A. fasciatus* during starvation period

During fasting, both populations decreased their locomotory activity but at a lower rate in the epigean population (-16%) than in the hypogean population (-60%). This discrepancy explains how hypogean fishes reached a lower level of activity than epigean ones. Similar results have been obtained in amphibians and crustaceans by Hervant et al. (1998, 2001) and Hervant and Renault (2002). This “hypoactivity” enabled both fish populations to limit their energetic expenditure caused by moving, and therefore to reduce the use of energy reserves.

In contrast to the epigean fishes, in which fed and fasted individuals exhibited similar oxygen consumption suggesting a high use of energy reserves, subterranean fishes decreased their basal metabolism during fasting (-29%) suggesting a higher survival rates during fasting periods. A decrease in metabolism has been also observed in other fishes like *Scorpaena aguttata* and *Sebastes alascanus*, which exhibited a large decrease in oxygen consumption after 90 days of food deprivation (respectively 34% and 40% to the initially fed fish level) (Yang and Somero, 1993).

4.2.1. Energetic molecules

In contrast to epigeal individuals, hypogean fishes consumed nearly their entire glycogen and triglyceride body reserves together with a part of the protein content from the first month of starvation in spite of a larger decrease in oxygen consumption and locomotory activity. This phenomenon suggests a surprising monophasic use of body energetic reserves by the hypogean *A. fasciatus*. Protein use during fasting is generally considered harmful because proteins are functional molecules, which an animal needs to survive (for locomotion, reproduction, respiration, etc.). In parallel, although ATP body content remained stable and identical between the two populations during fasting, the glucose content decreased in a much more important way in the hypogean population than in the epigeal one. ATP is the principal energetic molecule used to answer the organism's energy demands to maintain bodily functions. Hypogean fishes may be able to maintain ATP body content at a stable level thanks to induction of substitution pathways.

4.2.2. Induction of substitution pathways: gluconeogenesis and ketogenesis

Triglyceride catabolism releases NEFA (Non-Esterified Fatty Acid) and glycerol. Glycerol content in hypogean fishes remained constant during the first month of starvation whereas triglycerides were hydrolyzed, suggesting the activation of a gluconeogenesis pathway by glycerol in this population. In parallel, numerous amino acids stemming from protein catabolism could be used as precursors for gluconeogenesis (Echevarria et al., 1997). The activation of such a pathway detected after one month of starvation in the hypogean population seemed to participate in slowing down the decrease in glucose level and glycogen stocks, as described in the hypogean crustaceans *Niphargus rhenorhodanensis* and *S. virei* during 180 days of food deprivation (Hervant et al., 1999; Hervant and Renault, 2002). On the other hand, animals from the surface presented a higher body glycerol content after one month of starvation, which suggests the lack of any gluconeogenesis pathway activation. During the second month of starvation, the decrease in glycerol level seemed to highlight an important activation of gluconeogenesis. The epigeal form of *A. fasciatus* thus seems to favor a low lipid use rather than the mobilization of muscular proteins to fuel gluconeogenesis. This kind of response to starvation has been reported for the white sturgeon *Acipenser transmontanus* (Hung et al., 1997).

In addition, the subterranean *A. fasciatus* activated a ketogenic pathway in more than the surface-dwelling *A. fasciatus*. In mammals, ketone bodies are molecules produced in response to long-term starvation (or diabetes) to compensate for glucose shortage used as substrate by gluco-dependant cells. Ketone bodies are synthesized from acetyl-CoA produced by the β -oxidation of fatty acids. In fishes, the effect of fasting upon ketone bodies metabolism is poorly documented and still under debate. Indeed, it has been observed in the carp *Cyprinus carpio* that long-term fasting did not induce stimulation of ketone bodies metabolism but only moderate gluconeogenesis (Segner et al., 1997). Unfortunately, glycemia was not measured in this study, thus it is unknown whether conditions of ketogenesis initiation were fulfilled (i.e. decreasing glycemia). In contrast, Zammit and Newsholme (1979) reported that during fasting teleost fishes exclusively produced acetoacetate, whereas Soengas and Aldegunde (2002) presented β -hydroxybutyrate as the unique ketone body consumed by the brain during long-term fasting. The ketogenic pathway activation in *A. fasciatus* suggested that ketone body metabolism is triggered by starvation and that these compounds are used as substitution substrates for gluco-dependant cells (Soengas and Aldegunde, 2002). Ketogenesis is significantly more stimulated in *A. fasciatus mexicanus* than in *A. fasciatus fasciatus* and this can be correlated to the difference in glucose dynamics presented by subterranean and epigeal fishes. In conclusion, despite the depression in basal metabolism and locomotory activity exhibited by cave organisms, they clearly presented the profile of animals not adapted to fasting (high

decrease in energetic substrates and early activation of metabolic substitution pathways).

4.3. Hypogean and epigeal *A. fasciatus* at refeeding stage

From an ecological point of view, it is important for organisms to quickly and entirely restore energy reserves to be able to resist another stress period, especially in harsh and unpredictable biotopes such as groundwaters (Hervant et al., 1998, 1999a, 2001; Hervant and Renault, 2002). In hypogean fishes, the inability to restore locomotory activity could reflect their inability to restore muscular protein contents. Indeed during refeeding, hypogean fishes did not resynthesize all the protein content – predominantly muscular proteins – which could impact their locomotory activity. During refeeding, epigeal fishes presented a decrease in oxygen consumption, unexpectedly reaching a lower rate than fed organisms, which cannot be explained and would require further studies. On the other hand, after 5 days of refeeding, hypogean fishes recovered fed level of metabolism, in agreement with results previously reported by Hervant et al. (1998, 2001). Contrary to these studies, the refeeding period allocated to subterranean fishes (representing 20% of the duration of nutritional stress) seems insufficient for a complete recovery from nutritional stress: glucose level, glycogen and triglyceride stocks and protein contents did not reach initially fed fish level, whereas after 12 days of refeeding, epigeal fishes showed a glucose level and protein content equivalent to a glycogen stock greater than that observed in initially fed organisms.

To sum up, the cave-dwelling population, in contrast with surface-dwelling one, did not succeed in recovering from the 2 month food stress in 12 days of refeeding. The subterranean population of *A. fasciatus* would thus probably not be able to survive a new fasting.

5. Conclusion

Despite a hypometabolism, *A. fasciatus mexicanus*' responses to food deprivation are not only not equivalent (as was expected) but rather even less effective than those exhibited by the epigeal population *A. fasciatus fasciatus*. So, it is now clear that (i) starvation adaptations are not necessary to cave life but are more probably correlated to the "energetic state" of each ecosystem (mainly food availability) and (ii) troglomorphy is not linked to starvation capacities and thus not to the impoverished food availability as claimed by Hüppop (2005).

Few ecological variables, like density, may explain the low starvation resistance in hypogean individuals. Since hypogean and epigeal aquatic environments are often contiguous, most cave-dwelling environments present identical food availability to up-dwelling ones (Mitchell et al., 1977; Deharveng, 2005). However, in cave-dwelling habitats, population densities are often significantly lower than epigeal population densities (Mitchell et al., 1977; Parzefall, 1983). Thus, ponderated by density, hypogean individuals could have higher food availability compared to their surface-dwelling conspecifics. In addition, when working with tropical fishes it is important to keep in mind that many epigeal species can endure long-term starvation during the dry season. Indeed, many fish species get confined to temporary ponds or main river channels where food availability can be minimal (or not food at all). Consequently, many surface-dwelling fish species stop eating during the dry season (Fink and Fink 1979; Rios et al. 2002; Rios et al. 2004; German et al. 2010).

Our study is original as we studied a system that is opposite of what usually occurs in temperate region: the epigeal taxon experiences seasonal food shortages, and thus, shows an ability to physiologically deal with starvation, whereas the hypogean taxon does not regularly experience food shortages. Consequently, subterranean animals would be less constrained than epigeal species to food deprivation periods in tropical biotopes.

Acknowledgements

The authors express their thanks to Dr Christina Richardson for the English language correction of the manuscript. We are also grateful to the “Aquarium du Grand Lyon” team for the technical support. This work was partly supported by both the Environment and the French Ministry of Research and Technology.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.cbpa.2010.03.030.

References

- Barclay, M.C., Dall, W., Smith, D.M., 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the molting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 68, 229–244.
- Bergmeyer, H.U. (Ed.), 1985. *Methods of Enzymatic Analysis*. I, vols. VI–VII. Verlag Chemie, Weinheim, Basel.
- Burt de Perera, T., 2004. Fish can encode order in their spatial map. *Proc. Biol. Sci.* 271, 2131–2134.
- Culver, D.C., Poulson, T.L., 1971. Oxygen consumption and activity in closely related amphipod populations from cave and surface habitats. *Am Midl Nat* 85, 74–84.
- Deharveng, L., 2005. Diversity patterns in the tropics. In: Culver, D.C., White, B. (Eds.), *Encyclopedia of Cave*. Elsevier academic press, pp. 166–170.
- Echevarria, G., Martinez-bebia, M., Zamora, S., 1997. Evolution of biometric indices and plasma metabolites during prolonged starvation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Comp. Biochem. Physiol. A* 118, 111–123.
- Elenndt, B.P., 1989. Effects of starvation on growth, reproduction, survival and biochemical-composition of *Daphnia magna*. *Archiv. Hydrobiol.* 116, 415–433.
- Ercolini, A., Berti, R., Chelazzi, L., Messana, G., 1987. Oxygen consumption in hypogean and epigeal cyprinids (Pisces). *Ital. J. Zool.* 4, 23–30.
- Fink, W.L., Fink, S.V., 1979. Central amazonia and its fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A* 62, 13–29.
- Fonseca, V.F., Cabral, H.N., 2007. Are fish early growth and condition patterns related to life-history strategies? *Rev. Fish Biol. Fish* 17, 545–564.
- Garland, T., Bennett, A.F., Rezende, E.L., 2005. Phylogenetic approaches in comparative physiology. *J. Exp. Biol.* 208, 3015–3035.
- German, D.P., Neuberger, D.T., Callahan, M.N., Lizardo, N.R., Evans, D.H., 2009. Feast to famine: the effects of food quality and quantity on the gut structure and function of a detritivorous catfish (Teleostei: Loricariidae). *Comp. Biochem. Physiol. A* 155, 281–293.
- Gnasplini, P., 2005. Guano communities. In: Culver, D.C., White, B. (Eds.), *Encyclopedia of Cave*. Elsevier academic press, pp. 276–283.
- Gwak, W.S., Tanaka, M., 2001. Developmental change in RNA:DNA ratios of fed and starved laboratory-reared Japanese flounder larvae and juveniles, and its application to assessment of nutritional condition for wild fish. *J. Fish Biol.* 59, 902–915.
- Hervant, F., Renault, D., 2002. Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigeal isopods: a proposed adaptive strategy for groundwater organisms. *J. Exp. Biol.* 205, 2079–2087.
- Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D., Freminet, A., 1995. Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and the epigeal *gammarus fossarum* (crustacea, amphipoda). *Physiol. Zool.* 68, 223–244.
- Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D., Freminet, A., 1996. Behavioral, ventilatory, and metabolic responses of the hypogean amphipod *Niphargus virei* and the epigeal isopod *Asellus aquaticus* to severe hypoxia and subsequent recovery. *Physiol. Zool.* 69, 1277–1300.
- Hervant, F., Mathieu, J., Barre, H., Simon, K., Pinon, C., 1997. Comparative study on the behavioral, ventilatory, and respiratory responses of hypogean and epigeal crustaceans to long-term starvation and subsequent feeding. *Comp. Biochem. Physiol. A* 118, 1277–1283.
- Hervant, F., Mathieu, J., Barre, H., Simon, K., 1998. Long-term starvation and re-feeding in hypogean and epigeal crustaceans: survival, locomotory and respiratory adaptations. *Mém Biospéléol.* XXV, pp. 15–23.
- Hervant, F., Mathieu, J., Barre, H., 1999. Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipods to long-term starvation and subsequent refeeding. *J. Exp. Biol.* 202, 3587–3595.
- Hervant, F., Mathieu, J., Durand, J., 2001. Behavioural, physiological and metabolic responses to long-term starvation and refeeding in a blind cave-dwelling (*Proteus anguinus*) and a surface-dwelling (*Euproctus asper*) salamander. *J. Exp. Biol.* 204, 269–281.
- Hung, S.S.O., Liu, W., Li, H.B., Storebakken, T., Cui, Y.B., 1997. Effect of starvation on some morphological and biochemical parameters in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture* 151, 357–363.
- Hüppop, K., 1986. Oxygen-consumption of *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces): a comparison of epigeal and hypogean populations. *Environ. Biol. Fish.* 17, 299–308.
- Hüppop, K., 2005. Adaptation to low food. In: Culver, D.C., White, B. (Eds.), *Encyclopedia of Cave*. Elsevier academic press, pp. 4–10.
- Langecker, T.G., Wilkens, H., Parzefall, J., 1996. Studies on the trophic structure of an energy-rich Mexican cave (cueva de las sardinas) containing sulfurous water. *Mém. Biospé.* XXIII, 121–125.
- Mendez, G., Wieser, W., 1993. Metabolic responses to food-deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei, Cyprinidae). *Environ. Biol. Fish.* 36, 73–81.
- Mitchell, R., Russel, W.H., Elliot, W.R., 1977. Mexican eyeless characin fishes, genus *Astyanax*: environment, distribution, and evolution. The Museum Special Publications, 12. Texas tech press, Lubbock, Texas, p. 89.
- Palmer, A.N., Hill, C.A., 2005. Sulfuric acid caves. In: Culver, D.C., White, B. (Eds.), *Encyclopedia of Cave*. Elsevier academic press, pp. 573–581.
- Parzefall, J., 1983. Field observation in epigeal and cave populations of the Mexican characid *Astyanax mexicanus* (Pisces, Characidae). *Mém Biospéléol.* X, pp. 171–176.
- Post, J.R., Parkinson, E.A., 2001. Energy allocation strategy in young fish: allometry and survival. *Ecology* 82, 1040–1051.
- Poulson, T.L., 1963. Cave adaptation in amblyopsid fishes. *Am. Midl. Nat.* 70, 257–290.
- Rios, F.S., Kalinin, A.L., Rantin, F.T., 2002. The effects of long-term food deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *J. Fish Biol.* 61, 85–95.
- Rios, F.S., Kalinin, A.L., Fernandes, M.N., Rantin, F.T., 2004. Changes in gut gross morphology of traíra, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) during long-term starvation and after refeeding. *Braz. J. Biol.* 64, 683–689.
- Romero, A., Paulson, K.M., 2001. It's wonderful hypogean life: a guide to the troglomorphic fishes of the world. *Environ. Biol. Fish.* 62, 13–41.
- Segner, H., Dolle, A., Bohm, R., 1997. Ketone body metabolism in the carp *Cyprinus carpio*: biochemical and H-1 NMR spectroscopical analysis. *Comp. Biochem. Physiol. B* 116, 257–262.
- Soengas, J.L., Aldegunde, M., 2002. Energy metabolism of fish brain. *Comp. Biochem. Physiol. B* 131, 271–296.
- Spicer, J.L., 1998. Is the reduced metabolism of hypogean amphipods solely a result of food limitation? *Hydrobiologia* 377, 201–204.
- Suneetha, K.B., Folkvord, A., Johannessen, A., 1999. Responsiveness of selected condition measures of herring, *Clupea harengus*, larvae to starvation in relation to ontogeny and temperature. *Environ. Biol. Fish.* 54, 191–204.
- Vögt, G., Strus, J., 1999. Hypogean life-style fuelled by oil. *Naturwissenschaften* 86, 43–45.
- Windsor, S., Mallinson, G., Montgomery, J., 2008. Hydrodynamic imaging by blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 150 (Issue 3), Supplement 1, S79.
- Witter, M.S., Cuthill, I.C., 1993. The ecological costs of avian fat storage. *Phil. Trans. Roy Soc. London B-Biol. Sci.* 340, 73–92.
- Yang, T.H., Somero, G.N., 1993. Effects of feeding and food-deprivation on oxygen-consumption, muscle protein-concentration and activities of energy-metabolism enzymes in muscle and brain of shallow-living (*scorpaena-guttata*) and deep-living (*sebastolobus-alascanus*) scorpaenid fishes. *J. Exp. Biol.* 181, 213–232.
- Zammit, V.A., Newsholme, E.A., 1979. Activities of enzymes of fat and ketone-body metabolism and effects of starvation on blood-concentrations of glucose and fat fuels in teleost and elasmobranch fish. *Biochem. J.* 184, 313–322.

Résumé

Le concept de compromis évolutif est central dans la compréhension de l'évolution des histoires de vie ; cependant, les mécanismes sous-jacents sont encore peu compris. Généralement, les études physiologiques sur les compromis d'histoire de vie ont porté sur les phénomènes d'allocation des ressources. Depuis une dizaine d'année, plusieurs études sur les causes fonctionnelles des compromis d'histoire de vie ont permis de mettre en évidence un lien entre le stress oxydatif et les différentes composantes des performances de l'organisme. Nous proposons que le fonctionnement mitochondrial, source principale de production d'énergie (adénosine triphosphate, ATP) et d'espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS) puisse être le lien entre les processus d'allocation des ressources et de stress oxydatif. Par des approches descriptives et expérimentales, nous avons étudié les relations entre les flux d'énergie, le stress oxydatif et la croissance sur un modèle amphibien anoure, la grenouille rousse *Rana temporaria*. L'intérêt principal de ces travaux de thèse a été de considérer la balance oxydative dans son ensemble (pro-oxydants, anti-oxydants et dégâts oxydatifs) ainsi que le flux d'énergie pondéré par l'efficacité de la mitochondrie à convertir l'énergie (le rapport ATP/O). Des têtards, exposés de façon chronique à un découplant (2,4-dinitrophénol) au cours de leur développement, présentent un ralentissement de croissance, ainsi qu'une diminution de l'efficacité de conversion énergétique mitochondriale et un meilleur statut oxydatif (moins de ROS produits et peu de dégâts oxydatifs malgré la diminution des capacités anti-oxydantes). Par ailleurs, les paramètres physiologiques décrits chez des grenouilles sauvages présentant des différences de taille corporelles montrent une efficacité de conversion énergétique mitochondriale plus élevée chez les grenouilles à croissance élevée. De plus, les résultats sur la balance oxydative des grenouilles adultes montrent que la compréhension des relations entre paramètres de la balance oxydative implique de replacer les variables dans leur rôle physiologique. L'ensemble de ces résultats suggèrent que (i) l'étude d'un seul paramètre de la balance oxydative ne permet ni d'émettre des conclusions sur les autres paramètres, ni de comprendre l'impact de la balance oxydative sur les organismes ; (ii) l'efficacité de conversion énergétique mitochondriale est un facteur affectant les flux d'énergie et pourrait contrôler la quantité d'énergie disponible pour la croissance de l'animal. Cette thèse montre la nécessité d'étudier les mécanismes sous-jacents aux compromis évolutifs en fusionnant les notions d'allocation des ressources et de balance oxydative, et ouvre de nombreuses voies vers des études plus intégratives.

Abstract

The concept of trade-off is central to our understanding of life history evolution but the underlying mechanisms are still poorly understood. Traditional physiological studies of life history trade-offs focused mainly on the differential allocation of limited resources. During the last decade, numerous studies on functional causes of life history trade-off have shown that oxidative stress was related to different components of animal performances. Here, we propose that the functioning of mitochondria, which is the main site of both energy (adenosine triphosphate, ATP) production and of reactive oxygen species (ROS) generation, could be the link between the resource allocation and oxidative stress processes. From descriptive and experimental approaches, we investigate the relationship between energy flow, oxidative stress and growth in an amphibian anuran model, the common frog *Rana temporaria*. All studies presented in this thesis aim to consider the overall oxidative balance (pro-oxidants, anti-oxidants and oxidative damages) and the energy flow accounting for mitochondrial efficiency of the energy transduction system (the ATP/O ratio variation) to better understand growth patterns in an ectotherm that influence both survival and reproductive capacities. Chronic exposure to an uncoupler (2,4-dinitrophenol) during tadpole development induced a lower growth rate associated with a decreased mitochondria efficiency of energy transduction and an improved oxidative status (lower ROS production and low oxidative damage despite low antioxidant defenses). In addition, the description of physiological parameters of wild frogs exhibiting dissimilar body size shows a higher energy efficiency transduction in frogs exhibiting high growth rate. Thus, the results on the oxidative balance of frogs show that understanding the relationship between the variables of the oxidative balance involves replacing their physiological role. Altogether, our results suggest that (i) the study of a single oxidative balance setting alone does not allow to conclude on other parameters and on the impact of oxidative stress on the organism; (ii) understanding the mitochondrial efficiency of energy transduction is a factor affecting the flow of energy and could drive the amount of energy available for the animal growth. This thesis demonstrates the need to study the underlying mechanisms of trade-offs in merging the resource allocation and oxidative balance approaches, and open the way for more integrative studies.