



HAL
open science

Identification et caractérisation de composés circulants d'intérêt dans le sérum d'ours brun hibernant – Étude des effets biologiques du sérum d'ours hibernant sur cellules humaines

Christian Boyer

► **To cite this version:**

Christian Boyer. Identification et caractérisation de composés circulants d'intérêt dans le sérum d'ours brun hibernant – Étude des effets biologiques du sérum d'ours hibernant sur cellules humaines. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne, 2023. Français. NNT : 2023UCFA0012 . tel-04467479

HAL Id: tel-04467479

<https://theses.hal.science/tel-04467479>

Submitted on 20 Feb 2024

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.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

Thèse

Présentée à l'Université Clermont-Auvergne

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : BIOLOGIE SANTÉ

Présentée et soutenue publiquement par

CHRISTIAN BOYER

Le 02/02/2023

**Identification et caractérisation de composés circulants d'intérêt
dans le sérum d'ours brun hibernant – Étude des effets biologiques
du sérum d'ours hibernant sur cellules humaines**

Rapporteurs :

Dr. Béatrice Morio - CarMeN / INSERM U1060 - INRAE U1397 / Université Lyon 1

Pr. Damien Freyssenet - Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM) / Université Jean Monnet Saint Etienne – Université Lyon

Examineurs :

Dr. Isabelle Balandier - Laboratoire de Physique de Clermont (LPC) / UMR6533 (UCA-CNRS_IN2P3) / Université Clermont-Auvergne

Dr. Damien Roussel - Laboratoire des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA) / Equipe Ecophysiologie, Communication et Comportement (E2C) / Université Lyon 1

Directeur de Thèse :

Dr. Etienne Lefai UNH / INRAE U1019 / Université Clermont Auvergne

Remerciements à,

Mon directeur de thèse, le Dr. Etienne Lefai

Je remercie mon directeur de thèse, Etienne, pour son accompagnement, ses qualités humaines et sa disponibilité durant ces 3 années. Je le remercie encore que pour m'avoir aidé et conseillé jusqu'au bout, pour le temps qu'il m'a accordé, le partage précieux de ses connaissances et... de m'avoir fait découvrir ce magnifique modèle de l'ours brun hibernant, dont on entendra encore parler dans les années à venir !

Aux membres du jury, la Dr. Béatrice Morio et le Pr. Damien Freyssenet, ainsi que le Dr. Damien Roussel et la Dr. Isabelle Balandier

Je suis honoré de vous compter parmi les membres de mon jury, et je vous remercie sincèrement pour avoir accepté de donner de votre temps, pour la relecture et la présentation de mon manuscrit de thèse.

Aux membres de mon comité de thèse, le Dr. Fabrice Bertile et le Dr. Damien Freyssenet

Merci à Fabrice Bertille et Damien Freyssenet pour les échanges scientifiques lors de mes comités de thèse et pour leurs précieux conseils.

A l'équipe Proteostasis

Merci à **tous les membres** de l'équipe Proteostasis, pour leur bonne humeur durant ces 3 années. Un grand merci à Lydie Combaret et Christiane Deval qui ont été mes voisines de bureau durant 1 an, et que je remercie pour leurs conseils. Un grand merci à Laurent (alias Lolo), Cécile et Valérie pour leur aide, leur disponibilité et pour l'accompagnement technique durant ma thèse. Merci à Pierre, notre chef, pour avoir animé l'équipe durant cette période, avec la joie et la bonne humeur !

Aux thésards !

Merci à Ghita, Dulce, Laura, Aurore et Guillaume pour ces années de partage de bureau ! et les franches rigolades, Tiens Laura, un petit mot pour toi, il paraît qu'il est écrit dans ton manuscrit que je suis « râleur mais très attachant », je retiendrais donc le « mais très attachant » et je suis heureux d'avoir passé ces 3 années en ta compagnie. Je garderais de bons souvenirs de nos balades, de nos repas avec toi et Dulce, notre espagnole bien-aimée ! Je vous souhaite le meilleur à vous tous, peu importe ce qui adviendra après la thèse, car ce n'est pas une fin en soi mais un commencement !

Aux membres du SBBRP (Scandinavian Brown Bear Research Group)

Je remercie les différents membres du SBBRP, grâce à qui le projet existe, et nous permet d'avoir tous les ans des échantillons de sang et tissus d'ours brun. Je remercie les différents membres composant le SBBRP et qui sont des vétérinaires, des scientifiques, des rangers...

A la team ours de Strasbourg (Fabrice Bertile et Alexandre Geffroy)

Merci à la team ours de l'IPHC de Strasbourg ! Merci à Fabrice et Alexandre pour la réalisation des fractions de sérum d'ours pour mon projet.

Au Dr. Patrick Vernet, et à Guillaume et Mathilde

Merci à Patrick pour m'avoir fourni de belles cellules PC3 et m'avoir accueilli plusieurs fois au sein du LPC (Laboratoire de Physique de Clermont) pour mener des expériences. Je remercie également Guillaume et Mathilde du LPC pour leur aide et le soutien technique, et pour leur bonne humeur.

Aux plateformes de lipidomique de Lyon et de Dijon

Je souhaite remercier le personnel des plateformes de lipidomique de Lyon et Dijon pour la réalisation des analyses de lipidomique et pour la quantification des endocannabinoïdes dans le sérum, plasma et tissus d'ours brun. Des remerciements en particulier à Jean-Paul Pais de Barros (Plateforme Lipidomique, INSERM, UMR1231, Université de Bourgogne, Dijon, France) et à Nathalie Bernoud-Hubac (Université de Lyon, INSERM, INRAE, INSA, Functional Lipidomic Platform, Lyon, France).

A Laurence Canaple

Merci à Laurence, ingénieure à l'ENS de Lyon pour sa disponibilité et pour la réalisation des expériences de mesure de respiration mitochondriale avec le Seahorse.

Au Dr. Ludovic Gomez

Merci à Ludovic Gomez, du laboratoire CarMeN de Lyon pour l'accueil et le support technique qui a été nécessaire pour la réalisation des mesures de respiration mitochondriale avec l'Oroboros.

A ma mère

Je t'ai gardé pour la fin... Merci de m'avoir soutenu depuis toujours et surtout sur ces trois années qui ont pu être difficiles par moment, mais tu m'as toujours dit « Tu vas y arriver, tu es toujours arrivé à faire ce que tu voulais ».

A mes amis

Là encore il y en a beaucoup à remercier... et une pensée particulière à Phil, Aurelie, Benji, Antho, Mel et les frats ! Merci à toi Charlotte (la meilleur osteo de Paris !) pour ta bonne humeur et ton soutien.

Table des matières

Liste des publications et communications	1
1. Publications.....	1
1.1 Articles scientifiques	1
1.2 Article de vulgarisation	1
2. Communications orales	1
2.1 Congrès internationaux.....	1
2.2 Communication à destination du grand public.....	1
Liste des abréviations	2
PARTIE A : Revue bibliographique	5
1. Biomimétisme.....	5
1.1 Introduction	5
1.2 Biomimétisme et domaine biomédical	6
1.3 Exemples de modèles animaux d'intérêt pour la recherche biomédicale	8
1.3.1 Espèces animales à longue durée de vie.....	8
1.3.2 Modèles de résistance contre le cancer	11
1.3.3 Modèles d'intérêt pour des maladies métaboliques et cardio-vasculaires.....	12
1.3.4 Modèles de résistance à l'atrophie musculaire	13
2. L'hibernation.....	14
2.1 Introduction sur l'hibernation.....	14
2.1.1 Définition et considération phylogénétiques.....	14
2.1.2 Différents modes d'hibernation	15
2.2 Physiologie de l'hibernation : éléments régulateurs et inducteurs de l'hibernation.	17
2.2.1 Eléments généraux de physiologie.....	17
2.2.2 Facteurs exogènes.....	18
2.2.3 Facteurs endogènes	18

2.3 Adaptations métaboliques.....	21
2.3.1 Utilisation du glucose	21
2.3.2 Utilisation des lipides	23
2.3.3 Métabolisme de l'azote.....	24
2.3.4 Fonction mitochondriale	24
2.3.4.1 Généralités.....	24
2.3.4.2 Respiration mitochondriale et activité de la chaîne respiratoire.....	25
2.3.4.3 Mécanismes impliqués dans la suppression métabolique	26
2.3.4.4 Rôle du sulfure d'hydrogène (H ₂ S).....	27
2.4 Modifications cellulaires et moléculaires durant l'hibernation.....	27
2.4.1 Mécanismes généraux de transcription et traduction.....	28
2.4.2 Variations saisonnières dans l'expression de gènes et dans l'abondance ou l'activité de protéines.....	29
2.4.2.1 Modifications post-traductionnelles	29
2.4.2.2 Gènes et protéines régulés à la hausse	30
2.4.3 Mécanismes d'adaptation au stress cellulaire durant l'hibernation	33
2.4.3.1 Stress oxydant	33
2.4.3.2 Réponses cellulaires et moléculaires.....	34
3. L'hibernation chez l'ours	35
3.1 Caractéristiques générales de l'hibernation chez l'ours.....	35
3.2 Adaptations physiologiques et métaboliques	37
3.3 Modifications cellulaires et moléculaires chez l'ours hibernant	39
3.3.1 Synthèse protéique générale	40
3.3.2 Catabolisme et anabolisme protéique – Cycle de l'urée	41
3.3.3 Homéostasie du tissu osseux	42
3.3.4 Métabolisme et fonction mitochondriale	43
3.3.4.1 Lipolyse, lipogénèse et β -oxydation des lipides	43
3.3.4.2 Métabolisme du glucose (glycolyse et néoglucogénèse)	44
3.3.4.3 Cycle de Krebs – Fonction mitochondriale	45
PARTIE B : Matériel et Méthodes.....	46
1. Matériels.....	46
1.1 Echantillons collectés lors des captures d'ours sauvages.....	46
1.2 Lignées cellulaires et myoblastes primaires	47

2. Méthodes.....	48
2.1 Préparation des mix de sérum	48
2.2 Préparation des fractions de sérum.....	50
2.3 Dosages des lipides circulants.....	51
2.4 Dosages des endocannabinoides circulants et tissulaires	51
2.5 Traitement des cellules au sérum d'ours.....	51
2.6 Mesure de l'activité NADH-déshydrogénase (test MTT)	51
2.7 Extraction des protéines	52
2.8 Western blot	53
2.9 Mesure de la respiration mitochondriale	54
2.9.1 Respiration mitochondriale - SEAHORSE	54
2.9.2 Respiration mitochondriale – Oroboros	56
2.10 Analyses statistiques	57
PARTIE C : Présentation du sujet de thèse	58
PARTIE D : Données expérimentales	60
1. Publication	60
2. MTT et fractionnement du sérum	65
3. Fonction et respiration mitochondriale.....	77
Discussion et perspectives :	88
1. Contraintes liées au modèle d'étude	89
2. Approche ciblée et changements saisonniers dans les endocannabinoïdes circulants... 89	
3. Approche sans a priori et identification des fractions actives du sérum sur un readout métabolique : l'activité NADH-déshydrogénase	92
4. Exploration des effets du sérum sur la fonction et la respiration mitochondriale	93
5. Perspectives : utilisation du modèle de l'ours brun hibernant en recherche spatiale	94
Bibliographie :.....	98
Annexes :.....	116

Liste des publications et communications

1. Publications

1.1 Articles scientifiques

1) **Boyer C**, Cussonneau L, Brun C, Deval C, Pais de Barros J-P, Chanon S, Bernoud-Hubac N, Daira P, Evans AL, Arnemo JM, Swenson JE, Gauquelin-Koch G, Simon C, Blanc S, Combaret L, Bertile F & Lefai E (2020) Specific shifts in the endocannabinoid system in hibernating brown bears. *Frontiers in Zoology* 17, 35.

2) Cussonneau L, **Boyer C**, Brun C, Deval C, Loizon E, Meugnier E, Gueret E, Dubois E, Taillandier D, Polge C, Béchet D, Gauquelin-Koch G, Evans AL, Arnemo JM, Swenson JE, Blanc S, Simon C, Lefai E, Bertile F & Combaret L (2021) Concurrent BMP Signaling Maintenance and TGF- β Signaling Inhibition Is a Hallmark of Natural Resistance to Muscle Atrophy in the Hibernating Bear. *Cells* 10, 1873.

1.2 Article de vulgarisation

Article de vulgarisation scientifique écrit pour Lanutrition.fr, janvier 2019.

<https://www.lanutrition.fr/le-serum-dours-pourrait-conduire-a-de-nouvelles-molecules-therapeutiques>

2. Communications orales

2.1 Congrès internationaux

16th International Hibernation Symposium, Specific shifts in the endocannabinoid system in hibernating brown bears, Groningen (Pays-bas), août 2021.

2.2 Communication à destination du grand public

Fête de la science - Étudier les animaux pour aller sur Mars : une histoire avec des fusées, des hommes et des ours. Public de collégiens et lycéens, Clermont-Ferrand (France), octobre 2019

Liste des abréviations

AA : Acide Arachidonique
A1AR : Adenosine A1 receptor
ACACA : Acetyl-CoA Carboxylase
ACADM : Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase
ACADVL : Very Long-Chain Specific Acyl-CoA Dehydrogenase
2-AcGs : 2-Acylglycérols
ACL : ATP Citrate Lyase
ACO1 : Aconitase 1
AEA : Anandamide
2-AG : 2-Arachidonoylglycerol
ALAT : Alanine-Amino-Transférase
ALB : Albumine
5'-AMP : 5'-adenosine monophosphate
ARG1 : Arginase 1
ASL : Argininosuccinate Lyase
ASS1 : Argininosuccinate Synthase 1
ATF4 : Activating transcription factor 4

BGLAP : Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein
BMP : Bone Morphogenic Protein
BSALP : Bone-Specific Alkaline Phosphatase

CB1 : Cannabinoid Receptor 1
CB2 : Cannabinoid Receptor 2
CDC : Center for Disease Control
CE : Efficacité de Couplage
CPS1 : Carbamoyl-Phosphate Synthase 1
CPT1A : Carnitine Palmitoyltransferase 1A
CPT1B : Carnitine Palmitoyltransferase 1B
CS : Citrate Synthase
CYCS : Cytochrome C
COQ5 : Coenzyme Q5 Methyltransférase
CIRP : Cold-Inducible RNA-binding Protein

DE : Différentiellement exprimé
DGAT2 : Diacylglycérol O-Acyltransferase 2
DHCR7 : 7-dehydrocholesterol reductase
DHEA : Docosahexaenoylethanolamide
DO : Densité Optique
DOPs : Delta-opioïdes

eCBs : Endocannabinoïdes
ECS : Système endocannabinoïde
eEF-2 : eukaryotic Elongation factor-2

ETC : Chaîne de transport d'électrons

FASN : Fatty-Acide Synthase

FBP1 : Fructose-1,6-Biphosphatase 1

FBS : Sérum de Veau Foetal

FDPS : Farnesyl Diphosphate Synthase

GCK : Glucokinase

GLUT4 : Glucose Transporter 4

G6PC : Glucose-6-Phosphatase

GPR199 : G Protein-Coupled Receptor 119

GPx : Glutathion Peroxydase

GRP75 : Glucose-Regulated Protein 75

HADHA : Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Trifunctional Multienzyme Complex Subunit Alpha

HbA1c : Hémoglobine glyquée

HDAC : Histone deacetylase

HIF1 : Hypoxia-Inducible Factor-1

HK1 : Hexokinase 1

HP : Hibernation specific Protein

H2S : Sulfure d'hydrogène

HSL : Hormone-Sensitive Lipase

HSP : Heat Shock Protein

IBA : Interbout Arousal

ID1 : DNA-Binding Protein Inhibitor 1

KEAP1 : Kelch-like ECH-associated protein 1

MAFG : MAF BZIP Transcription Factor G

MAP1LC3A : Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha

MEF2A : Myocyte Enhancer Factor 2A

MEF2C : Myocyte Enhancer Factor 2C

MFN1 : Mitofusin 1

MFN2 : Mitofusin 2

NAEs : N-acyléthanolamines

NDUFS1 : NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit S1

NH3 : Ammoniac

NRF2 : Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2

OCR : Oxygen Consumption Rate

OEA : N-oleoylethanolamide

OPA1 : Mitochondrial Dynamin Like GTPase

OTC : Ornithine Transcarbamylase

ΔP : Force protomotrice

PC : Pyruvate Carboxylase

PCK1 : Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1
PDH : Pyruvate Dehydrogenase
PDK4 : Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4
PEA : Palmitoylethanolamide
PKFM : 6-Phosphofructokinase ATP-dépendante
PPAR : Peroxysome Proliferator-Activated Receptors
PTL : Pancreatic Triacylglycerol Lipase
PUFAs : Polyunsaturated Fatty Acids

QL : Quotient de longévité

RBM3 : RNA Binding Motif Protein 3
RBP : RNA-Binding Protein
RCR : Respiratory Control Ratio
RQ : Quotient respiratoire
ROS : Reactive Oxygen Species
RUNX2 : RUNX Family Transcription Factor 2

SBBRG : Scandinavian Brown Bear Research Group
SBS : Sérum ours été
SDH : Succinate dehydrogenase
SERPINF1 : Serpin Family F Member 1
SHBG : Sex Hormone Binding Globulin
SNC : Système Nerveux Central
SOD : Superoxyde Dismutase
SpF : Santé publique France
SQR : Succinate Quinone Réductase

Ta : Température ambiante
TAMs : Thyronamines
Tb : Température corporelle
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TKT : Transketolase

UCP2 : Uncoupling Protein 2
UCP3 : Uncoupling Protein 3
UPR : Unfolded Protein Response
UPS : Ubiquitin-Proteasome System

WBS : Sérum d'ours hiver

ZFAND5 : Zinc Finger AN1-Type Containing 5

PARTIE A : Revue bibliographique

1. Biomimétisme

1.1 Introduction

Le biomimétisme signifie littéralement « imiter le vivant ». Dans les années 1950, Otto Schmitt, un chercheur américain, est à l'origine de la création du terme *biomimetics* (biomimétisme en français) qui désigne à la fois une démarche intellectuelle et une méthode de recherche qui s'appuie sur l'observation des organismes vivants. Le concept va ensuite être repris par la biologiste Janine Benyus avec le terme *biomimicry* qui a été popularisé dans son livre publié en 1997 *Biomimicry : Innovation Inspired by Nature*. Le terme *biomimicry* ajoute une nouvelle dimension, où l'inspiration des processus naturels vise à créer des innovations avec une dimension de durabilité et de protection de l'environnement.

Le biomimétisme consiste à prendre la nature et les phénomènes naturels comme modèle, pour en transposer les principes et les processus en matière d'ingénierie humaine. Il repose sur le fait que la diversité des adaptations présentes dans la nature est le fruit de sélections naturelles depuis des millions d'années. En effet, les premières formes de vie, qui étaient alors exclusivement aquatiques, ont émergé il y a 3.8 milliards d'années (Cooper 2000). La vie animale est apparue il y a environ 600 millions d'années (Ros-Rocher et al. 2021), avec une estimation (datant d'un article de 2011) de l'existence d'environ 8.7 millions d'espèces au sein de ce règne (Mora et al. 2011). La biodiversité retrouvée dans la nature représente donc un véritable laboratoire pour les scientifiques de toutes disciplines.

Le point de départ du biomimétisme est l'observation et l'analyse de comportements et phénomènes naturels, dont les principes ou les mécanismes vont pouvoir être exploités au service de l'humanité. Le transfert de connaissances peut ainsi être une source de solutions et d'innovations pour des domaines aussi variés que l'industrie et l'économie, l'environnement, l'éducation ou encore la médecine. D'ailleurs, les développements récents dans le domaine du biomimétisme dans l'industrie comprennent notamment l'invention du Velcro au début des années 1950, inspiré par la capacité du fruit de la bardane à s'accrocher

aux vêtements par le biais de ses crochets, de conceptions architecturales s'inspirant des termitières pour améliorer la thermorégulation, de maillots de bain avec un glissement sur l'eau optimisé et inspiré d'après la structure de la peau des requins, ou encore la conception des ailes d'avions inspirées par les oiseaux (Choi et al. 2015; Stenvinkel et al. 2020).

1.2 Biomimétisme et domaine biomédical

L'approche du biomimétisme peut contribuer de manière significative aux progrès de la recherche biomédicale (Zhang 2012; Choi et al. 2015; Stenvinkel et al. 2020; Stenvinkel et al. 2021). Le développement de cette approche nécessite néanmoins une coopération multiple entre les différents acteurs des domaines de la médecine humaine et vétérinaire, ainsi que de la zoologie et de l'écophysiologie, et elle repose aussi sur le fait que les animaux ont développé au cours de leur évolution de nombreux et différents mécanismes d'adaptation comme : la régénération d'organes, la réparation tissulaire, la résistance face à des micro-organismes pathogènes, la protection contre les UV et contre l'hypoxie, ou encore une résistance face à de nombreux stress (stress hydrique et nutritionnels, stress oxydant, ...) et maladies. L'approche biomimétique pourrait être une source de nouvelles stratégies afin de lutter contre certaines maladies liées au mode vie ou au vieillissement de la population comme l'obésité, les maladies cardiovasculaires, la sarcopénie, les maladies neurodégénératives et auto-immunes et les cancers.

Dans le domaine de la recherche médicale, un grand nombre d'études reposent sur l'utilisation de modèles simplifiés tels que des invertébrés comme le ver *Caenorhabditis Elegans* et la mouche *Drosophila melanogaster*, et sur des modèles animaux vertébrés qui sont essentiellement des modèles murins (rats et souris). La transposition chez l'homme des données obtenues sur des modèles animaux dans le cadre d'expérimentation scientifiques n'est pas toujours évidente. En effet une étude de 2019, parue dans *Journal of Translational Medicine* (Leenaars et al. 2019), a fait une analyse globale des taux de succès de cette transposition. L'étude conclue que la transposition des données de l'animal à l'homme est difficile à apprécier et imprévisible. D'ailleurs, dans le domaine de la recherche sur le cancer, le succès de la transposition chez l'homme des résultats obtenus sur des animaux est évalué en moyenne à moins de 8% (Mak et al. 2014). L'explication avancée est qu'il est difficile de

reproduire dans les modèles animaux de laboratoire, les processus extrêmement complexes de la cancérogenèse existant chez l'homme. D'une manière générale les problématiques liées à la transposition des données chez l'homme peuvent notamment s'expliquer par des conceptions expérimentales sous-optimales qui introduisent des biais expérimentaux (Garner 2014; Leenaars et al. 2019). Il a été mis en évidence que les rongeurs utilisés en laboratoire dans une condition assimilée à une condition « standard » ou « contrôle », ne pouvaient pas être considéré comme une situation respectant la physiologie de l'animal. Les animaux de laboratoire ont tendance à être sédentaires, à présenter de la résistance à l'insuline, de l'hypertension, du surpoids et sont plus susceptibles de mourir prématurément (Martin et al. 2010).

Dans le domaine de la biologie médicale l'approche couramment utilisée, qu'on nomme « approche conventionnelle », est basée sur l'induction d'une maladie grâce à l'utilisation de molécules pharmacologiques ou de techniques de biologie moléculaire, comme l'inactivation d'un gène (knockout). Le suivi de l'évolution de la maladie chez l'animal permet d'étudier les mécanismes physiopathologiques mis en jeu, avec pour objectif de développer des solutions thérapeutiques. En parallèle, il existe une autre approche, dite « bio-inspirée », qui repose sur l'identification, dans le milieu naturel, d'espèces qui ont développé une tolérance à des stress physiologiques ou des environnements extrêmes. L'approche « bio-inspirée » doit être considérée comme une approche complémentaire à l'approche conventionnelle, dans le but de mieux comprendre des mécanismes physiopathologiques, et pour développer de nouvelles solutions thérapeutiques chez l'homme (Stenvinkel et al. 2020) **[voir Figure 1]**.

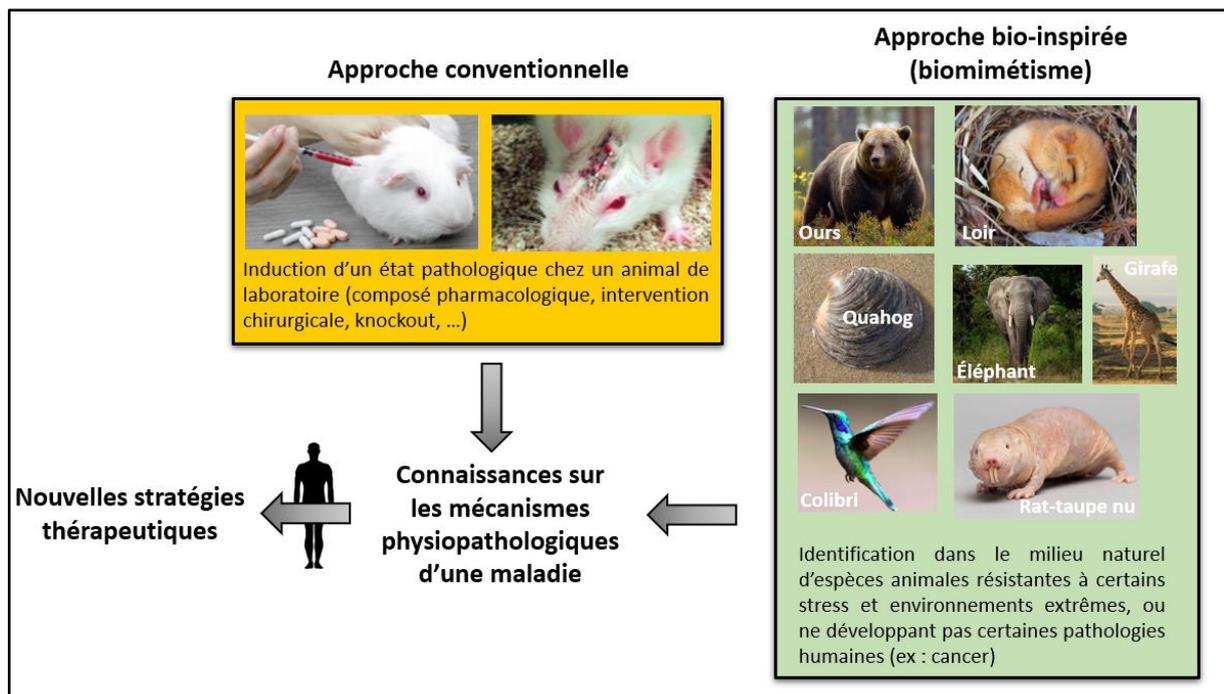


Figure 1 : Présentation de l'approche conventionnelle et de l'approche bio-inspirée dans le domaine biomédical (modifié d'après Stenvinkel et al. 2019).

L'approche conventionnelle dans le domaine bio-médical consiste à utiliser une combinaison de recherche fondamentale et clinique dans une approche translationnelle. La science fondamentale s'appuie généralement sur des modèles cellulaires et/ou des modèles murins avec une intervention, telle que l'inactivation de gènes (knockout) ou l'usage d'un composé pharmacologique, pour étudier des mécanismes physiopathologiques. La limite de cette approche est que la transposition des résultats des animaux de laboratoire aux humains est aléatoire, et échoue souvent. En utilisant l'approche biomimétique, l'identification d'espèces qui, au cours de millions d'années d'évolution, ont adapté des mécanismes pour se protéger de situation ou d'environnements extrêmes, pourrait être un levier dans la découverte de nouvelles stratégies thérapeutique en santé humaine. Parmi ces espèces, on retrouve notamment des espèces à longue durée de vie et d'intérêt pour le domaine de la gérontologie, comme le quahog nordique, le rat-taube nu. Les espèces hibernantes comme les ours et les loirs, les colibris, les éléphants et la girafe ont développés des capacités d'adaptation exceptionnelles contre des stress métaboliques et ne sont pas sujets à certaines pathologies humaines (cancer, diabète, hypertension artérielle, ...).

1.3 Exemples de modèles animaux d'intérêt pour la recherche biomédicale

1.3.1 Espèces animales à longue durée de vie

Les mécanismes impliqués dans les processus de vieillissements sont multifactoriels et complexes, et les principaux étudiés sont : le stress oxydatif, les dommages à l'ADN et aux protéines, la réduction des télomères, la dysfonction mitochondriale et les dérégulations des voies de signalisation cellulaire (Mc Auley et al. 2017; Li et al. 2021).

Il existe une grande diversité de longévité parmi les différentes espèces animales (Austad 2010), allant de quelques jours à plus de 500 ans pour un mollusque appelé le quahog nordique (*Arctica islandica*). Les animaux avec une masse corporelle élevée ont une espérance de vie généralement plus longue que ceux de petite masse corporelle (Healy et al. 2014), et il existe une corrélation positive entre la durée de vie et la masse corporelle de l'animal [voir Figure 2].

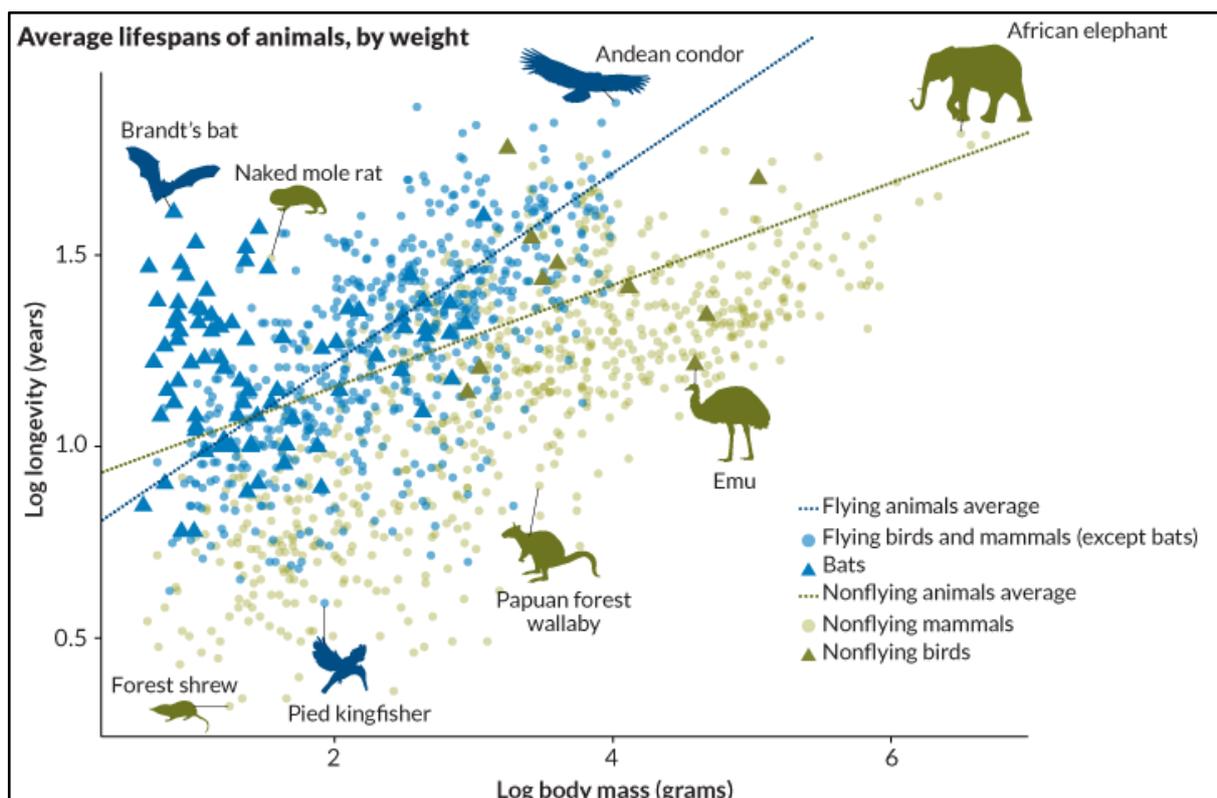


Figure 2 : Relations entre la masse corporelle et la durée de vie maximale chez les oiseaux et les mammifères (d'après Healy et al. 2014).

Lorsque l'on compare différentes espèces, il existe une corrélation entre la masse corporelle et la durée de vie moyenne. Les petites espèces comme les rongeurs ont une espérance de vie faible (quelques années), tandis que les espèces comme les éléphants et les baleines ont tendance à avoir une espérance de vie relativement longue (dizaines d'années). Bien entendu, de nombreux autres facteurs entrent en ligne de compte et il existe des exceptions. Des espèces, comme le rat-taube nu, ont une durée de vie remarquablement longue (environ 30 ans) compte-tenu de leur faible masse corporelle. Les données sur l'espérance de vie des animaux montrent que les espèces volantes (en bleu) ont tendance à vivre plus longtemps pour leur masse que les espèces non-volantes (en vert).

Les points bleus représentent les oiseaux et les mammifères volants (exceptés les chauves-souris). Les points verts représentent les mammifères non-volants. Les triangles bleus représentent les espèces de chauves-souris et les triangles verts les espèces d'oiseaux non-volants. Les lignes en pointillés verts et bleus représentent respectivement l'évolution de l'espérance de vie moyenne des animaux non-volants et volants en fonction de la masse corporelle.

Le quotient de longévité (QL) est le ratio entre la longévité maximale observée chez une espèce par rapport à la durée de vie maximale théorique (estimée par rapport à la masse corporelle) [voir Figure 3]. L'étude des individus possédant un quotient de longévité élevé comme le rat-taupe nu (*Heterocephalus glaber*), la petite chauve-souris brune (*Myotis lucifugus*) ou encore le quahog nordique (*Arctica islandica*), apporte des informations d'intérêt sur les mécanismes impliqués dans la sénescence (Austad 2010; Stenvinkel & Shiels 2019; Stenvinkel et al. 2020; Stenvinkel et al. 2021).

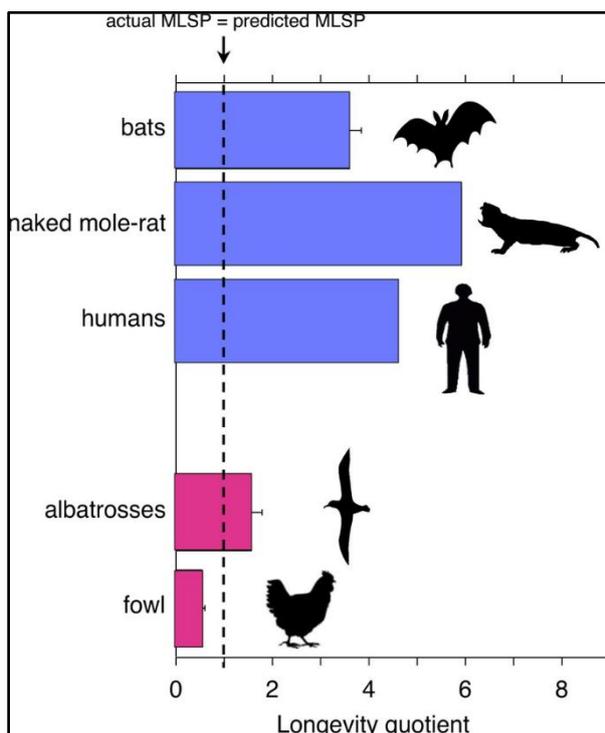


Figure 3: Quotients de longévité de certains mammifères et oiseaux (d'après Hulbert et al. 2007).

Le quotient de longévité (QL) est le rapport entre la longévité maximale observée d'une espèce et la durée de vie maximale (MLSP) prévue pour sa masse corporelle. La durée de vie maximale théorique pour chaque espèce a été obtenue à partir des estimations données dans la figure 2. L'homme fait partie des espèces ayant un QL élevé, et le rat-taupe nu fait partie des espèces de mammifères non-volants qui ont la plus longue durée de vie par rapport à leur masse corporelle. Certaines espèces comme les volailles ont un faible QL.

MLSP = Maximum Lifespan (durée de vie maximale)

Les données de la littérature suggèrent que le maintien de l'homéostasie des protéines et d'un splicing alternatif fonctionnel, une protection contre le stress oxydant, ainsi qu'une fonction mitochondriale optimale, pourraient expliquer la résistance exceptionnelle au stress et à la sénescence, des espèces animales à quotient de longévité élevé (Austad 2010; Stenvinkel & Shiels 2019; Stenvinkel et al. 2020; Stenvinkel et al. 2021; Lee et al. 2020).

Les rats-taupe nus (*Heterocephalus glaber*) ont une résistance accrue au stress et à la sénescence, et sont très rarement atteints de pathologies. Il a été mis en évidence chez *Heterocephalus glaber*, une grande plasticité transcriptomique, avec une forte expression de facteurs d'épissage et un maintien de la capacité de régulation de l'épissage sur toute la durée

de vie de l'animal, en comparaisons avec d'autres rongeurs de masse similaire (Lee et al. 2020). On retrouve une forte expression du facteur de transcription NRF2 chez le rat-taupe nu et le quahog nordique (revue dans Stenvinkel & Shiels 2019), qui est un facteur de transcription qui joue un rôle majeur dans la protection contre l'inflammation et le stress oxydant. Plusieurs études ont clarifié le rôle du système KEAP1-NRF2 dans la prévention et la réduction du vieillissement physiologique et des pathologies associées chez l'homme, en mettant en avant son rôle dans l'activation de la transcription de gènes principalement impliqués dans le métabolisme, la détoxification, la fonction antioxydante et anti-inflammatoire (revue dans Matsumaru & Motohashi 2021).

1.3.2 Modèles de résistance contre le cancer

Parmi les animaux de grande taille, l'éléphant est connu pour posséder une grande résistance face au cancer. Les éléphants ont une mortalité liée au cancer estimée à moins de 5% alors que chez les humains les chiffres sont situés entre 11 et 25% (Abegglen et al. 2015). Les analyses génomiques chez ce mammifère ont mis en évidence la présence de multiples copies du gène suppresseur de tumeur TP53, ce qui induit une meilleure apoptose cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN (Stenvinkel et al. 2020; Stenvinkel et al. 2021; Abegglen et al. 2015).

Le rat-taupe nu est également un exemple exceptionnel de résistance au cancer dans le règne animal, et il possède le quotient de longévité le plus élevé parmi les espèces de rongeurs. Les nombreuses nécropsies effectuées sur des animaux en captivité mettent en avant l'absence de développement spontané de néoplasmes (Buffenstein et al. 2021). La résistance de l'animal au cancer serait notamment expliquée par une cytoprotection accrue (surexpression de NRF2), une forte inhibition de contact qui permet de réguler la multiplication des cellules (en provoquant un arrêt de la division cellulaire), et la sécrétion très importante d'acide hyaluronique de haut poids moléculaire par les cellules fibroblastiques, qui pourrait jouer un rôle anti-inflammatoire et régulateur des processus de division cellulaire (Tian et al. 2013; Buffenstein et al. 2021). La sécrétion d'acide hyaluronique de haut poids moléculaire est environ 5 fois plus importante chez le rat-taupe nu que chez l'homme ou la souris (Tian et al. 2013).

1.3.3 Modèles d'intérêt pour des maladies métaboliques et cardio-vasculaires

L'hypertension est actuellement un problème de santé publique majeur puisqu'elle touche presque 1 français sur 3 d'après les données de 2015 rapportées par Santé publique France (SpF), et presque la moitié des américains d'après les données de 2017 du CDC (Center for Disease Control). Les données de SpF montrent qu'en 2020, plus de 3.5 millions de la population française était atteinte de diabète (soit plus de 5% de la population), et les chiffres récents donnés par le CDC font état de plus de 37 millions d'Américains atteints de cette maladie.

Au sein du monde animal, le colibri et la girafe représentent respectivement un intérêt majeur pour l'apport de nouvelles connaissances sur le diabète, et l'hypertension artérielle (Stenvinkel et al. 2020; Stenvinkel et al. 2021). Les colibris, dont le régime alimentaire est très riche en sucres (nectar), a une capacité à tolérer de fortes concentrations de glucose circulant (Beuchat & Chong 1998; Stenvinkel et al. 2021), jusqu'à plus de 7g/L, avec cependant une hémoglobine glyquée (HbA1c) autour de 4.5%, ce qui reste relativement bas en comparaison à ce qui est habituellement retrouvé chez l'homme hyperglycémique (diabétique) où l'HbA1c peut dépasser largement dépasser 10% (Beuchat & Chong 1998; Stenvinkel et al. 2021). Les colibris sont donc capables de se protéger des complications microvasculaires normalement provoquées par des taux de glucose élevés dans le sang. Le renouvellement rapide des hématies chez les oiseaux (et donc le colibri) pourrait expliquer le fait qu'elles soient moins exposées à la glycation malgré une glycémie élevée (Hargrove 2005). L'autre hypothèse avancée est liée au métabolisme des colibris qui est fortement glycolytique, avec une capacité de transport et de l'oxydation du glucose qui est très importante, en particulier dans les muscles impliqués dans le vol des oiseaux (Suarez & Welch 2017).

Un autre exemple particulièrement intéressant est celui de la girafe. La pression artérielle moyenne chez la girafe est située entre 210 et 325 mmHg, une pression sanguine nécessaire afin d'alimenter le cerveau qui se situe à presque 3m de hauteur du cœur (Stenvinkel et al. 2020; Stenvinkel et al. 2021). Le système cardio-vasculaire de la girafe s'est adapté afin de supporter de très fortes variations de pression, notamment au niveau de la tête de l'animal.

Les valves cardiaques ont une structure adaptée (collagène) pour résister à de fortes pressions et les reins sont également protégés par la présence d'une capsule rénale renforcée, permettant notamment de moduler la pression de filtration dans l'organe (Stenvinkel et al. 2020; Stenvinkel et al. 2021).

1.3.4 Modèles de résistance à l'atrophie musculaire

A l'heure actuelle, bien que des recherches importantes aient été entreprises pour trouver des cibles médicamenteuse et investiguer les mécanismes moléculaires de l'atrophie musculaire, aucun médicament n'a été approuvé pour traiter cette problématique chez l'humain (Chen et al. 2021).

L'hibernation est une adaptation évolutive permettant la survie de certaines espèces durant de longues périodes de pénurie alimentaire (voir chapitre 2. L'hibernation). Les adaptations et mécanismes de protection mis en place par les animaux hibernants présentent un intérêt pour la recherche biomédicale (Reilly & Franklin 2016), notamment car les animaux se retrouvent dans une situation d'inactivité physique totale et de jeûne, qui sont des facteurs inducteurs connus de l'atrophie musculaire.

Contrairement aux animaux de laboratoire immobilisés pour induire une atrophie, les animaux qui connaissent des périodes naturelles et prolongées d'inactivité physique (torpeur), comme les mammifères hibernants, sont capables de limiter fortement la perte de la masse et de la force musculaire (Reilly & Franklin 2016). Parmi les mécanismes étudiés chez les animaux hibernants, la limitation du stress oxydant durant la torpeur ainsi qu'une augmentation de certains acteurs clés comme les protéines de chocs thermiques (HSP) pourraient contribuer au maintien de la masse musculaire (Lee et al. 2008; Chazarin, Ziemianin, et al. 2019).

2. L'hibernation

2.1 Introduction sur l'hibernation

2.1.1 Définition et considération phylogénétiques

Afin de survivre face à une raréfaction des sources de nourriture, la stratégie mise en place par les animaux hibernant est de réduire drastiquement leur dépense énergétique en adoptant une phase de torpeur. La torpeur peut être séparée en torpeur journalière ou saisonnière. La phase de torpeur saisonnière, ou encore appelée circannuelle, est par ailleurs appelée estivation en climat chaud et hibernation en climat froid. L'hibernation est une période prolongée d'hypométabolisme, associée à une réduction de la température corporelle, qui peut être obligatoire ou facultative selon les différentes conditions nécessaires pour l'entrée en hibernation (Ueda & Ibuka 1995; Wang & Lee 2011). Les hibernateurs facultatifs (par exemple le hamster syrien) n'entrent en hibernation que lorsqu'ils sont soumis à un stress thermique et/ou à une privation de nourriture, contrairement aux hibernateurs obligatoires (comme les marmottes), dont l'entrée en hibernation dépend de paramètres de synchronisation saisonnière plutôt que de facteurs de stress environnementaux.

La torpeur se retrouve chez de nombreux animaux, particulièrement les mammifères, dont la masse varie de quelques grammes à une centaine de kilos (Humphries et al. 2003). Cependant, la majorité des animaux capables de torpeur, ont une masse inférieure à 10kg (Wang & Lee 2011). L'hibernation est largement répandue dans la classe des mammifères [voir Figure 4] et on la retrouve notamment dans les ordres suivants : *Monotremata*, *Insectivora* / *Eulipotyphla*, *Chiroptera*, *Rodentia*, *Marsupialia*, *Carnivora* et chez les *Primates* (Carey et al. 2003; Wang & Lee 2011). Dans chacun des différents ordres, des espèces hibernantes et non hibernantes cohabitent, ce qui semble suggérer que les mécanismes de régulations nécessaires pour l'hibernation seraient partagés par tous les mammifères et impliqueraient une expression différentielle plutôt que l'induction de gènes qui seraient spécifiquement retrouvés chez les espèces hibernantes (Carey et al. 2003).

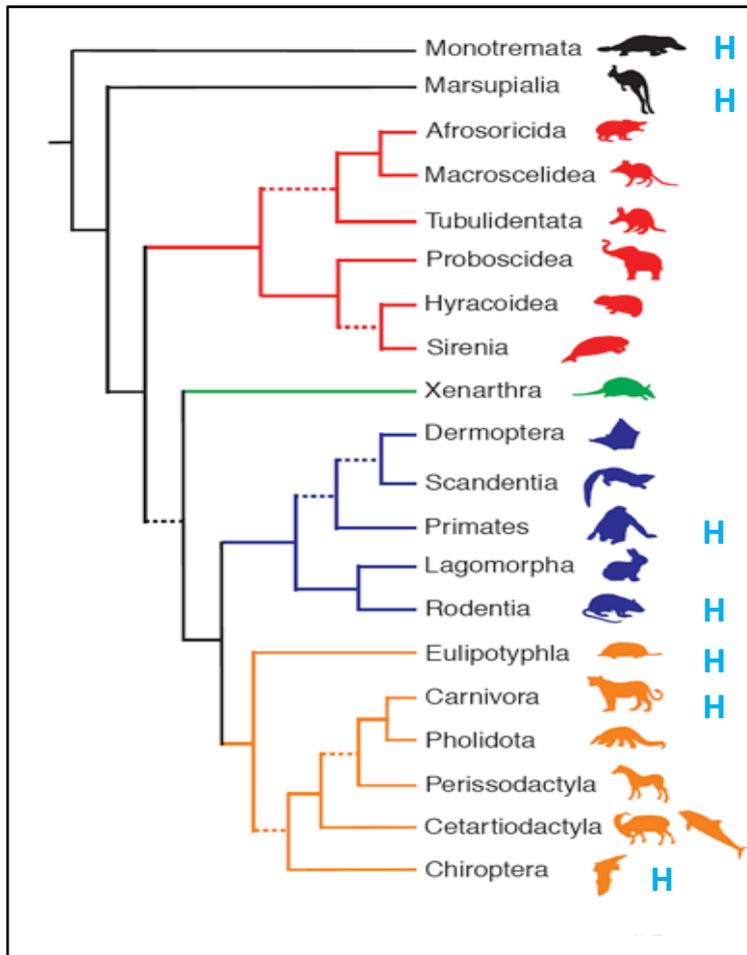


Figure 4: Dendrogramme de la classe des mammifères représentant les différents ordres où cohabitent des espèces hibernantes et non hibernantes (modifié d'après Springer et al. 2004).

Les espèces hibernantes se retrouvent dans plusieurs branches de la classe des mammifères. Cette distribution est cohérente avec l'hypothèse que tous les mammifères partagent les gènes nécessaires à l'hibernation.

Les espèces hibernantes sont retrouvées dans les ordres suivants : Monotremata, Insectivora / Eulipotyphla, Chiroptera, Rodentia, Marsupialia, Carnivora et Primates.

H = Présence d'espèces hibernantes parmi les ordres signalés par la lettre « H »

2.1.2 Différents modes d'hibernation

L'entrée en hibernation est anticipée plusieurs semaines en avance par des changements dans le comportement et/ou la physiologie de l'animal qui vont permettre une accumulation de réserves énergétiques. Deux stratégies d'accumulation de réserves sont mises en place par les hibernants, et on distingue ainsi les espèces « fat-storing » et « food-storing » et celles qui utilisent une combinaison des deux stratégies (Humphries et al. 2003). Chez les animaux hibernants qui stockent des réserves (fat-storing hibernators), la prise alimentaire et les réserves adipeuses vont plus que doubler durant la période estivale, et 60-80% des réserves accumulées sont sous forme de tissu adipeux blanc (Boyer & Barnes 1999). Le stockage de réserves dans le tissu adipeux est privilégié par les animaux hibernants, du fait de la densité énergétique élevée des lipides (1g de lipides fournit 9 calories contre 4 calories pour la même quantité de glucides). Les hibernants appelés « food-storing », vont constituer des réserves de nourriture (graines) au sein de leur habitat, qui fourniront un apport énergétique sur toute la

durée de l'hibernation. Dans le groupe des « fat-storing » on retrouve notamment les marmottes, les spermophiles (écureuils), les marsupiaux ainsi que les chauves-souris (Weitten 2015). Parmi les espèces « food-storing » on retrouve des espèces de hamsters ainsi que des rongeurs de la famille des sciuridés tels que le *Tamias striatus* (Weitten 2015).

On distingue également deux grands modes d'hibernation parmi les différentes espèces (Heldmaier et al. 2004). Le premier, qui est le plus représenté, est caractérisé par des cycles de torpeur entrecoupés par des phases de réveils euthermiques [voir Figure 5], appelés « interbout arousals » (IBA), et qui durent généralement moins de 24h (Wang & Wolowyk 1988; Ruf & Geiser 2015). Ce mode d'hibernation est notamment retrouvé chez les écureuils, les marmottes et les chauves-souris. Par ailleurs, les épisodes de torpeur des hibernants « food-storing » sont plus courts que ceux des « fat-storing » (Humphries et al. 2001). Le second est caractérisé par une hibernation prolongée sans phases de réveils euthermiques, comme c'est le cas chez les ours hibernants, où la phase de torpeur est continue et peut durer jusqu'à 5 à 7 mois, en fonction des conditions environnementales (Evans et al. 2016; Tøien et al. 2011).

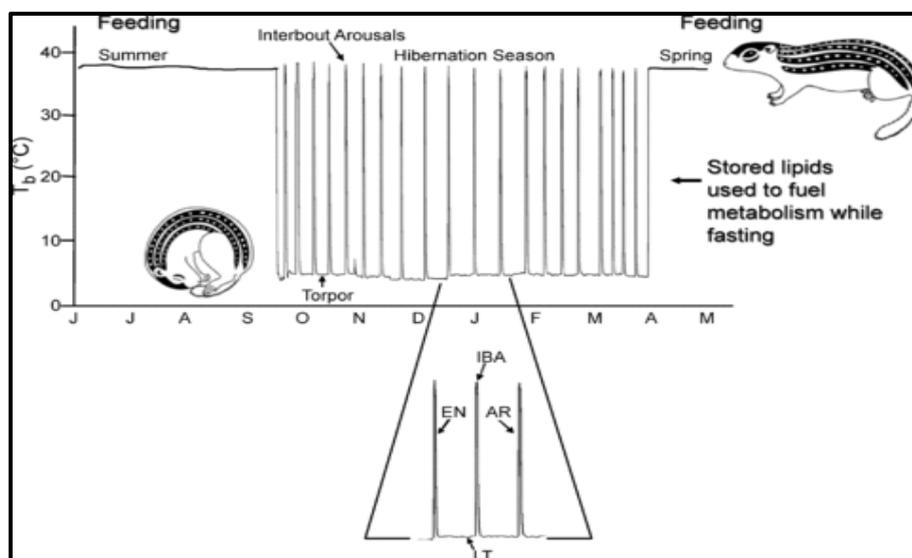


Figure 5 : Déroulement de l'hibernation et des phases de cycles torpeur/réveils euthermiques chez *Ictidomys tridecemlineatus* en milieu naturel (d'après Nelson et al. 2009).

Le graphique représente l'évolution de la température corporelle (T_b) en fonction de la période de l'année. La période de torpeur est entrecoupée de phases très brèves, où la température corporelle remonte rapidement (interbout arousals ou IBA). En bas, un agrandissement de trois cycles de torpeur et d'IBA indique le temps passé dans les différentes parties du cycle (pas à l'échelle). EN, entrée en torpeur ; LT, torpeur tardive (≥ 7 jours de torpeur continue) ; AR, sortie de torpeur ; IBA, interbout arousals (réveil euthermique).

Chaque épisode de torpeur est caractérisé par 4 phases successives : l'entrée en torpeur, le maintien de l'état de torpeur, la sortie de la torpeur et une phase d'euthermie. Les phases de réveils avec le retour à l'euthermie sont très coûteuses en énergie pour les hibernants et représentent approximativement 86% des coûts énergétiques durant l'hibernation (Karpovich et al. 2009). Le rôle exact des épisodes de retour à l'euthermie n'est pas totalement clair, bien que de nombreuses hypothèses soient avancées, comme la nécessité d'un retour à l'euthermie pour réactiver le système immunitaire mis au repos durant l'hypométabolisme (Prendergast et al. 2002). Il a également été mis en évidence que l'hypothermie est incompatible avec la fonction restaurative du sommeil, et que les animaux hibernants se trouvent dans un état de déprivation de sommeil. Les épisodes de retour à l'euthermie seraient donc nécessaires pour restaurer les phases de sommeil profond quasiment absentes durant la torpeur (Trachsel et al. 1991; Larkin & Heller 1998).

2.2 Physiologie de l'hibernation : éléments régulateurs et inducteurs de l'hibernation

2.2.1 Eléments généraux de physiologie

La majorité des données sur la physiologie de l'hibernation proviennent de petits hibernants de la famille des sciuridés (revue dans Wang & Lee 2011 et Carey et al. 2003), dont les épisodes de torpeurs sont entrecoupés par des Interbout arousals (IBA).

L'hibernation est accompagnée d'une diminution drastique du métabolisme, de la température corporelle, du rythme cardiaque, du rythme respiratoire, de l'activité physique ainsi que de nombreux autres paramètres physiologiques de l'animal, comme le débit de filtration glomérulaire. Le début de l'hibernation est caractérisé par une diminution du métabolisme qui précède souvent la diminution de la thermogenèse et de la température corporelle (Boyer & Barnes 1999). Cette baisse de la température corporelle s'étend sur une plage de 4°C à 40°C, en fonction de l'espèce et de la zone géographique (habitat) concernée (Wang & Lee 2011). Par ailleurs la température corporelle la plus basse a été relevée chez un petit hibernant, l'écureuil arctique (*Uroditellus parryii*), et peut descendre jusqu'à -2.9°C durant la torpeur (Barnes 1989). La réduction du métabolisme est très prononcée durant l'état de torpeur, et il peut être réduit à 5-12% de la valeur du métabolisme de base (Geiser 2004; Carey et al. 2003; Wang & Wolowyk 1988). Bien que la diminution de la température

corporelle réduit les vitesses de réactions enzymatiques (d'après la loi d'Arrhenius), et participe donc à la réduction passive du métabolisme chez les hibernants, il a été mis en évidence que la réduction du métabolisme précédait celle de la température corporelle, ce qui suggère donc une réduction régulée (active) de ce paramètre (Staples 2014). Cette suppression active du métabolisme, par des mécanismes indépendants de la température, va notamment faire intervenir le système nerveux central (SNC) (revue dans Staples & Brown 2008; Staples 2014).

La coordination de l'ensemble des changements physiologiques mis en place durant l'hibernation présentés ci-dessus, sont sous le contrôle de facteurs exogènes et endogènes, qui participent dans l'induction et la régulation de l'état de torpeur.

2.2.2 Facteurs exogènes

De nombreux facteurs exogènes comme la photopériode, la température extérieure et la disponibilité alimentaire et en eau, sont capables d'influencer l'entrée et/ou la durée de la torpeur (Wang & Lee 2011; Ueda & Ibuka 1995; Ibuka & Fukumura 1997; Humphries et al. 2003; Chayama et al. 2016). L'importance de ces différents facteurs exogènes sur l'hibernation peut différer en fonction des espèces considérées, notamment qu'il s'agisse d'hibernants facultatifs ou obligatoires. Chez le hamster syrien (*Mesocricetus auratus*), un hibernant facultatif, la durée de la torpeur augmente avec la diminution de la température ambiante, indépendamment de la photopériode et de l'âge de l'animal (Ueda & Ibuka 1995). Une déprivation en eau aléatoire et répétée chez *Mesocricetus auratus* est également capable d'augmenter la probabilité de l'entrée en torpeur (Ibuka & Fukumura 1997).

2.2.3 Facteurs endogènes

Il a été démontré que le cycle annuel d'hibernation est déterminé par une horloge circannuelle endogène (Hut et al. 2014; Mrosovsky 1990; Kondo et al. 2006), capable de réguler différents paramètres comme le déclenchement et le maintien de l'hibernation, la masse corporelle et l'activité de l'appareil reproducteur. L'influence des hormones sexuelles sur l'hibernation, comme les androgènes, a été démontrée chez les écureuils (*Callospermophilus lateralis*) et le hamster (*Mesocricetus brandti*) (Hall et al. 1982; Lee et al. 1990), avec un possible effet

inhibiteur sur l'entrée en torpeur mis en évidence chez *Callospermophilus lateralis* (Lee et al. 1990). Chez certaines espèces, une masse corporelle élevée tend à réduire l'expression de la torpeur pendant l'hibernation (Bieber et al. 2014; Zervanos et al. 2014), bien que d'autres études aient suggéré une corrélation positive entre la masse corporelle et l'expression de la torpeur chez les hérissons (*Atelerix frontalis*) (Hallam & Mzilikazi 2011) et les lémuriers souris (*Microcebus murinus*) (Vuarin et al. 2013). Les hibernants qui ne consomment pas de nourriture pendant l'hibernation (par exemple, les écureuils terrestres, les chauves-souris, les hérissons) pourraient avoir besoin de quantités plus importantes de réserves corporelles pour survivre en hiver, mais d'un autre côté il a également été suggéré qu'une masse corporelle inférieure à un certain seuil pourrait obliger les animaux à entrer en hibernation, comme stratégie afin de réduire la consommation des quantités limitées de réserves corporelles (Chayama et al. 2016).

L'horloge circannuelle est généralement auto-régulée mais nécessite une synchronisation saisonnière, qui est dépendante de la photopériode (Darrow et al. 1988; Hut et al. 2014). Bien que l'activité électrique et métabolique du système nerveux central (SNC) soit fortement diminuée en hiver, plusieurs zones du SNC restent très actives, notamment l'hypothalamus qui est une zone impliquée dans la thermorégulation (Kilduff et al. 1990; Heller 1979). L'implication du système nerveux central dans l'induction de l'hibernation ou dans le contrôle des épisodes de réveils (interbout arousals) est démontré avec l'implication de l'hypothalamus mais aussi de l'hippocampe et du noyau du système nerveux autonome (Drew et al. 2007). Le noyau suprachiasmatique est un oscillateur circadien qui est considéré comme ayant une fonction d'horloge biologique. L'activité de cette partie du système nerveux central a été montrée comme augmentée durant l'entrée et tout au long de l'état de torpeur (Drew et al. 2007). L'ablation partielle ou complète du noyau suprachiasmatique du SNC chez *Callospermophilus lateralis* est capable de perturber partiellement la durée des cycles d'hibernation voire d'empêcher l'établissement de la torpeur chez certains animaux (Dark et al. 1990). Comme l'ablation de cette partie du SNC ne provoque pas une absence d'induction de la torpeur chez tous les animaux (Dark et al. 1990), et qu'il n'y a pas d'effet majeur sur les rythmes circannuels du poids corporel (notamment la période de prise de masse grasse pre-hibernation) et de l'activité de reproduction dans la majorité des écureuils (Dark et al. 1985), cela suggère l'existence d'autres zones du SNC impliqué dans la régulation des cycles

d'hibernation. Un article publié en 2014 par Sáenz de Miera et al. met en avant que l'horloge circannuelle serait localisée au niveau du lobe tubéral (pars tuberalis) de l'hypophyse (Sáenz de Miera et al. 2014).

De nombreuses recherches se sont intéressées à l'identification de composés circulants ayant un rôle dans l'hibernation chez les petits hibernants (Wang & Lee 2011; Hastings & Ebling 2006; Takamatsu et al. 1993; Horii et al. 2018; Kondo & Sekijima 1998; Fujita et al. 2013; Sekijima et al. 2000; Kondo & Kondo 1992). L'hypothèse de l'existence de composés circulants inducteurs de l'hibernation a été rapporté en 1969 via des expériences de transfusion chez les spermophiles rayés (*Ictidomys tridecemlineatus*) (Dawe & Spurrier 1969). Le sang prélevé chez les animaux hibernants et transfusé chez des animaux euthermiques durant la saison estivale, est capable d'induire l'hibernation chez les receveurs, en l'absence de conditions environnementales favorables (basses températures notamment). Ces expériences semblent démontrer que des facteurs circulants retrouvés dans le sérum d'animaux hibernants auraient un rôle dans l'induction et le maintien d'un état de torpeur.

L'existence de protéines spécifiques à l'hibernation, a été mis en évidence pour la première fois chez des chipmunks (*Tamias asiaticus*), des petits mammifères de la famille des Sciuridés (Kondo & Kondo 1992). La protéine concernée est appelée « hibernation-specific protein » (HP) et elle est composée de 4 sous-unités : HP-20, HP-25, HP-27 et HP-55. Les niveaux plasmatiques des sous-unités diminuent fortement durant la saison d'hibernation (Takamatsu et al. 1993; Kondo & Kondo 1992) au contraire de l'hétérodimère appelé HP20c (composé des 3 sous unités HP20, HP25 et HP-27) qui est augmenté au niveau du cerveau (Kondo et al. 2006). L'implication d'HP20c dans l'induction de l'hibernation a été mis en évidence par le fait que l'administration d'un anticorps neutralisant, au niveau du cerveau, diminuait la durée de l'hibernation chez *Tamias asiaticus* et que l'hibernation n'est jamais induite chez des animaux ne présentant pas d'augmentation de l'HP20c dans le cerveau, même en présence de déclencheurs environnementaux (froid) (Kondo et al. 2006).

Il a également été démontré qu'une grande diversité de molécules biochimiques, tels que des gaz, des composés opioïdes, des hormones ou dérivés d'hormones pouvaient avoir un rôle dans l'induction et/ou le maintien de l'état de torpeur. Certains agents biochimiques ont ainsi

été identifiés tels que le gaz sulfure d'hydrogène (H₂S), la 5'-adénosine monophosphate (5'-AMP), les thyronamines (TAMs) qui sont des dérivés des hormones thyroïdiennes ainsi que des delta-opioïdes (DOPs) (Dirkes et al. 2015). Il a été démontré, chez le hamster, que l'adénosine qui agit via le récepteur A1 de l'adénosine (A1AR) dans le système nerveux central joue un rôle dans la réduction de la température corporelle et dans phase d'entrée en hibernation (Tamura et al. 2005). L'injection intracérébroventriculaire d'un antagoniste au A1AR est capable d'inhiber l'entrée en hibernation en bloquant la diminution de la température corporelle (Tamura et al. 2005).

Un autre paramètre affectant le déroulement de l'hibernation est la composition en acides gras des membranes cellulaires, sous influence des lipides alimentaires (revue dans Dark 2005 et Giroud et al. 2018). Une augmentation des apports en acides gras polyinsaturés (PUFAs) de la famille n-6, en particulier l'acide linoléique C18 :2 n-6, permet aux animaux hibernant de réduire de manière plus importante leur température corporelle, de diminuer la dépense énergétique durant la torpeur ainsi que d'augmenter la durée des épisodes de torpeur (revue dans Dark 2005 et Giroud et al. 2018). Le rôle potentiel des PUFAs n-6 dans la régulation de la torpeur pourrait notamment être lié au maintien d'une fonction cardiaque normale à de faibles températures (Arnold et al. 2015; Ruf & Arnold 2008).

2.3 Adaptations métaboliques

De nombreuses données mettent en évidence une réduction de l'oxydation des glucides au profit de l'oxydation des lipides durant la phase d'hibernation (revue dans Dark 2005). Les cycles annuels sont bien caractérisés chez les petits hibernants, comme l'écureuil, avec une période précédant l'hibernation où on observe une augmentation importante de la masse corporelle (environ 40-45%) et des réserves adipeuses, suivie d'une forte diminution durant la torpeur, ce qui corrobore la mobilisation active des réserves du tissu adipeux (Blake 1972).

2.3.1 Utilisation du glucose

La concentration plasmatique en glucose chez les écureuils *Ictidomys tridecemlineatus*, *Callospermophilus lateralis* et les marmottes *Marmota flaviventris* reste relativement stable durant la période d'hibernation et à des niveaux similaires aux animaux euthermiques (Florant

et al. 1986; Nizielski et al. 1989; Tashima et al. 1970; Twente & Twente 1967; Zimmerman 1982). En revanche d'autres données chez les écureuils *Uroditellus parryii*, *Uroditellus beldingi* et chez la grande gerboise d'Égypte (*Jaculus orientalis*) mettent en avant une diminution du glucose plasmatique durant la torpeur (Mountassif et al. 2007; Galster & Morrison 1975; Galster & Morrison 1970; Krilowicz 1985).

La réduction de l'utilisation du glucose durant l'hibernation est notamment mise en avant par le suivi de glucose radiomarké (glucose-U-¹⁴C) chez *Callospermophilus lateralis*, montrant une diminution de l'incorporation du carbone radiomarké en CO₂ (Tashima et al. 1970). Durant la torpeur la lactatémie est diminuée chez les écureuils hibernant en comparaison avec les animaux euthermiques (Nizielski et al. 1989; Zimny & Tyrone 1957), ce qui va également dans le sens d'une diminution de l'activité glycolytique. De plus, plusieurs enzymes ayant un rôle dans l'activité glycolytique (pyruvate déshydrogénase, phosphofructokinase) sont inhibées durant la période de torpeur (Brooks & Storey 1992; Buck et al. 2002). Bien que la capacité d'utilisation du glucose soit fortement diminuée durant l'hibernation, l'effet d'inhibition n'est pas total et il est réversible. En effet l'oxydation des glucides peut être stimulée durant la torpeur si la diminution de la température ambiante (Ta) devient critique, et nécessite une activation de la thermogénèse afin de maintenir la température corporelle (Tb) (Buck & Barnes 2000).

Les données concernant les niveaux de glycogène dans les tissus des écureuils hibernants sont contradictoires, ayant montré une diminution du glycogène hépatique (Burlington & Klain 1967) ou un maintien du glycogène dans le foie et le muscle squelettique (Zimmerman 1982), durant la période de torpeur. Dans une autre étude (Zimny & Tyrone 1957), l'augmentation du glycogène hépatique chez les écureuils hibernants n'a été mise en avant que durant les premiers jours de la torpeur, suivi d'une diminution. Le maintien d'un stock minimal de glycogène dans les tissus constitue une réserve énergétique utilisable lors des périodes de réveils euthermiques où le métabolisme est fortement augmenté (Lyman & Chatfield 1955; Zimny & Tyrone 1957). Les études menées chez l'écureuil arctique *Uroditellus parryii* mettent en évidence qu'en plus d'une diminution du glucose circulant, le glycogène hépatique diminue progressivement durant les périodes de torpeur, et que les stocks de glycogènes sont resynthétisés durant chaque épisode de réveil euthermique (Galster & Morrison 1975; Galster & Morrison 1970). Afin de compenser l'utilisation du glucose (même modeste) durant

l'hibernation et maintenir une homéostasie glycémique, une synthèse de glucose est maintenue par glyco-génolyse et néogluco-génèse hépatique (Green et al. 1984; Burlington & Klain 1967). En cohérence avec l'hydrolyse des triglycérides de réserve, le substrat majeur de la néogluco-génèse durant l'hibernation est le glycérol, suivi du lactate, alors que la contribution des acides aminés à la production de glucose endogène est plus modeste durant cette période (Burlington & Klain 1967; Galster & Morrison 1975).

2.3.2 Utilisation des lipides

L'ensemble des données de la littérature supportent le fait que les lipides sont le carburant principal durant la période d'hibernation, même si une certaine capacité à utiliser le glucose et à synthétiser du glyco-gène semble maintenue, et d'une manière tissu-dépendante (Dark 2005; Lyman & Chatfield 1955; Zimny & Tyrone 1957; Galster & Morrison 1975; Galster & Morrison 1970; Buck & Barnes 2000).

Le quotient respiratoire (RQ), correspondant au ratio du volume de dioxyde de carbone produit sur le volume d'O₂ consommé, est représentatif des substrats (glucides ou lipides) utilisés comme source d'énergie. Un RQ de 1.0 indique une oxydation des glucides alors qu'un RQ de 0.7 indique une oxydation des acides gras. Le RQ durant la torpeur est d'environ 0.7, ce qui indique une oxydation préférentielle des acides gras (Snapp & Heller 1981; Tähti 1978; Mokrasch et al. 1960). Par ailleurs, durant l'hibernation, les acides gras mobilisés à partir des triacylglycérols des adipocytes ne le sont pas de manière uniforme, avec une mobilisation préférentielle des acides gras saturés et une épargne de certaines acides gras polyinsaturés comme le C18 :2 n-6 (acide linoléique) (Price et al. 2013).

Les profils plasmatiques mettent en évidence, chez les petits hibernants, une augmentation de la cholestérolémie et une diminution de la triglycéridémie, durant la phase de torpeur (Nizielski et al. 1989; Otis et al. 2011), mais pas ou peu de différences dans les concentrations des acides gras circulants entre la période de torpeur et d'euthermie (Krulowicz 1985; Nizielski et al. 1989). En revanche, une forte augmentation des corps cétoniques (notamment le β -hydroxybutyrate) a lieu durant la période de torpeur (Krulowicz 1985; Nizielski et al. 1989; Mountassif et al. 2007; Rauch & Behrisch 1981; Otis et al. 2011). Les corps cétoniques sont synthétisés à partir de l'acetyl-CoA provenant de l'oxydation des acides gras, et peuvent être

utilisés comme source énergétique par différents organes (en particulier le cerveau), durant des épisodes de jeûne. L'augmentation de l'utilisation des corps cétonique durant la torpeur permettrait une épargne du glucose durant cette période. En effet, il a été mis en évidence chez les écureuils hibernants que ces composés avaient la capacité de réduire la captation de glucose par le muscle (revue dans Dark 2005).

2.3.3 Métabolisme de l'azote

Malgré une absence d'apports protéiques et une inactivité prolongée durant la torpeur, les hibernants perdent peu ou pas de masse et de fonction musculaire pendant l'hiver (Gao et al. 2012; Lee et al. 2008). Il a été mis en évidence un mécanisme adaptatif de recyclage de l'azote, permettant un maintien de la balance protéique chez les hibernants durant la période de torpeur (Regan et al. 2022). Ce processus, appelé récupération de l'azote uréique, présent chez les ruminants et des animaux non-ruminants (Stewart & Smith 2005), a été mis en évidence chez l'écureuil durant la période d'hibernation (Regan et al. 2022). Les capacités uréolytiques du microbiote intestinal des hibernants est augmenté durant la torpeur, et l'urée produit de façon endogène est ainsi hydrolysée, libérant de l'ammoniac (NH_3) qui pourra être reconverti en acides aminés, puis en protéines par l'hôte.

2.3.4 Fonction mitochondriale

2.3.4.1 Généralités

Les mitochondries sont responsables de 90% de la consommation totale de l' O_2 respiré chez les mammifères (Rolfe & Brown 1997). Etant donné la forte diminution du métabolisme durant l'hibernation, plusieurs études ont investigué l'implication des mitochondries dans cette suppression métabolique (revue dans Staples 2014).

Les premières études concernant l'effet de l'hibernation sur le métabolisme mitochondrial datent de la fin des années 60 et ont produit des résultats très hétérogènes, ayant amené à conclure que durant la période de torpeur le métabolisme mitochondrial est soit augmenté, soit diminué, soit inchangé en fonction de l'espèce animale, des tissus, des substrats de la chaîne respiratoire utilisés ou encore en fonction de la température à laquelle les expériences

ont été effectuées (revue dans Staples & Brown 2008). La qualité des préparations de mitochondries ou les méthodologies utilisées dans les premières études ont également été mis en cause (revue dans Staples & Brown 2008). Il a cependant été rapporté, que chez *U. parryii*, une diminution de la force protomotrice (ΔP) et donc de l'activité de la chaîne respiratoire avait bien lieu durant l'hibernation (Barger et al. 2003; Staples & Brown 2008), témoignant ainsi d'un ralentissement dans la consommation des substrats.

Les mécanismes thermiques passifs, dépendants de la température, ont un rôle dans la diminution du métabolisme mitochondrial (Brown et al. 2012; Muleme et al. 2006). Cependant, durant l'entrée dans la phase de torpeur, il a été observé chez l'écureuil (*Ictidomys tridecemlineatus*) que la suppression maximale du métabolisme mitochondrial avait lieu très rapidement et avant même que la température corporelle ne passe en dessous des 30°C (Chung et al. 2011). A l'inverse, la levée de cette inhibition se fait de manière progressive lors des phases de remonté en température (interbout arousals).

2.3.4.2 Respiration mitochondriale et activité de la chaîne respiratoire

Les données de la littérature portent principalement sur des mitochondries isolées du foie de mammifères en hibernation, et sur les espèces *Urocitellus parryii* (Barger et al. 2003; Fedotcheva et al. 1985; Brustovetsky et al. 1989), *Ictidomys tridecemlineatus* (Gehnrich & Aprille 1988; Muleme et al. 2006; Brown et al. 2013), *Callospermophilus lateralis* (Martin et al. 1999). Le foie représente environ 12% de la consommation totale d'oxygène (donnée obtenue chez les rongeurs) (Martin & Fuhrman 1955), et la réduction de la respiration mitochondriale pouvant atteindre 70% dans cet organe, chez les animaux hibernants, va contribuer à une préservation de l'énergie durant la phase de torpeur (Muleme et al. 2006; Brown et al. 2013; Staples & Brown 2008). La suppression de la respiration mitochondriale au niveau hépatique est particulièrement importante lorsque qu'elle est mesurée sur des mitochondries d'animaux hibernants, en présence de succinate. La suppression de la respiration mitochondriale du foie est plus modeste avec d'autres substrats (pyruvate par exemple), ce qui suggère qu'une grande partie de la suppression se produit au niveau ou en aval du complexe II (revue dans Staples & Brown 2008).

Les différentes études mettent en avant une réduction générale de l'état 3 de la respiration mitochondriale, liée à la production d'ATP, chez différentes espèces d'écureuils hibernants. Chez *Ictidomys tridecemlineatus*, une diminution modérée de l'état 3 de respiration durant la torpeur a été mise en évidence, dans le muscle squelettique (Brown et al. 2012) et cardiaque (Brown & Staples 2014), mais pas au niveau du cortex cérébral (Gallagher & Staples 2013). En revanche, chez *U. parryii*, la torpeur n'entraîne pas de modification de l'état 3 de respiration mitochondriale dans le muscle squelettique (Barger et al. 2003; Muleme et al. 2006). Les données concernant la respiration mitochondriale non couplée à la synthèse d'ATP (état 4) donnent des résultats plus variables. Chez *Urocitellus richardsonii* (Pehowich & Wang 1984) il a été rapporté une diminution de l'état 4 de respiration mitochondriale au niveau du foie des animaux hibernants, en comparaison aux animaux en saison active. Chez l'espèce *U. parryii* (Barger et al. 2003; Fedotcheva et al. 1985) l'état 4 de respiration mitochondriale est également diminuée durant l'hibernation, ce qui n'est pas le cas chez d'autres espèces comme *Callospermophilus lateralis* (Martin et al. 1999).

En comparaison avec les épisodes d'euthermie, le stade de torpeur est associé à une réduction de 40% de l'activité du complexe I et de 60% de l'activité du complexe II (SDH), alors que les activités du complexe III, IV ou V ne sont pas affectés, d'après les mesures effectués sur des mitochondries isolés d'*Ictidomys tridecemlineatus* (Mathers et al. 2017). En revanche, l'activité de la SDH, chez *Ictidomys tridecemlineatus*, est plus de 70% plus importante durant les épisodes de réveils euthermiques que durant la phase de torpeur (Armstrong & Staples 2010).

2.3.4.3 Mécanismes impliqués dans la suppression métabolique

Parmi les mécanismes impliqués dans la suppression métabolique chez les hibernants, des changements dans le phosphoprotéome mitochondrial ont été investigués chez *Ictidomys tridecemlineatus* (Chung et al. 2013), avec la conclusion qu'il n'y avait pas de changements dans l'état de phosphorylation des protéines qui pouvaient être associés avec une modification de la respiration mitochondriale durant la torpeur. De plus une modification saisonnière dans la quantité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale n'a pas été détectée chez ces animaux (Muleme et al. 2006).

La suppression de la respiration mitochondriale est en partie reliée à une inhibition partielle de certains complexes de la chaîne de transport d'électrons (ETC). Le flux d'électrons entre la succinate déshydrogénase (SDH, complexe II) et la cytochrome c oxydase (complexe IV) est diminué durant la torpeur, et cette diminution est réversible durant les périodes de réveils euthermiques (Muleme et al. 2006).

Un ralentissement du fonctionnement du cycle de Krebs, via la diminution de la citrate synthase (CS), une enzyme limitante du cycle qui a pour rôle de convertir l'oxaloacétate (OAA) en citrate, a été mis en évidence durant la torpeur chez *Ictidomys tridecemlineatus* (Armstrong & Staples 2010). L'activité de CS est réduite de 25% durant la torpeur chez *Ictidomys tridecemlineatus*, ce qui pourrait expliquer une accumulation d'OAA durant l'hibernation, qui jouerait un rôle dans l'inhibition de l'activité de la SDH (Armstrong & Staples 2010).

2.3.4.4 Rôle du sulfure d'hydrogène (H₂S)

Des changements significatifs dans les niveaux endogènes de sulfure d'hydrogène (H₂S) et de ses métabolites a été rapporté chez des mammifères hibernants, comme l'écureuil, parallèlement à des modifications de l'activité de la sulfite quinone réductase (SQR) mitochondriale qui a un rôle dans le catabolisme du H₂S (revue dans Jensen & Fago 2021). La diminution de l'activité de la SQR durant la torpeur, pourrait jouer un rôle dans l'accumulation de l'H₂S qui a un rôle inhibiteur sur l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire, et donc participer à la suppression métabolique active chez les hibernants durant la période de torpeur (revue dans Jensen & Fago 2021). Néanmoins, il n'y a pas à ce jour des arguments soutenant que l'activité du complexe IV est diminué chez les animaux hibernants, et les données vont plutôt dans le sens d'une suppression de l'oxydation des substrats qui est située en amont du complexe IV (Staples & Brown 2008).

2.4 Modifications cellulaires et moléculaires durant l'hibernation

Une diminution globale de l'expression de nombreux gènes a lieu durant la torpeur, cependant un programme transcriptionnel spécifique à l'état d'hibernation est mis en place par les animaux hibernants, avec certains acteurs clés régulés à la hausse, qui vont participer

à toutes les adaptations cellulaires et moléculaires nécessaires durant cette période (revue dans Carey et al. 2003).

2.4.1 Mécanismes généraux de transcription et traduction

Une proportion importante de la dépense énergétique d'un organisme provient des mécanismes de transcription et de traduction, et on estime le coût énergétique total de la traduction dans des cellules de mammifère à environ 30% de la consommation totale d'ATP (Buttgereit & Brand 1995). L'entrée dans l'état d'hypométabolisme provoque une diminution générale des processus de transcription et de traduction (Storey & Storey 2004; Storey & Storey 2007). La diminution de la température corporelle est associée à une diminution générale de la dégradation des ARNs et des protéines chez les hibernants (Boyer & Barnes 1999). Cependant il a également été mis en évidence que des gènes et/ou des protéines sont préférentiellement synthétisés, stabilisés ou dégradés durant l'hibernation, et qu'une régulation active et ciblée des processus de transcription et traduction est nécessaire pour la mise en place de l'état d'hibernation (Boyer & Barnes 1999; Carey et al. 2003). On retrouve notamment une quantité d'ARN totaux et de protéines diminuée dans le foie, le muscle et le cerveau d'écureuils hibernants en comparaison avec les animaux qui ne sont pas en état d'hibernation (revue dans Boyer & Barnes 1999). La synthèse d'ARN et de protéines est réduite durant la torpeur mais fortement augmentée durant chaque période « d'interbout arousal » (revue dans Boyer & Barnes 1999).

Durant la torpeur, les taux d'incorporation de [³H]-uridine dans les ARN dans le cerveau de *Spermophilus suslicus* ont été évalués à seulement 12% du taux d'incorporation observé chez les animaux en euthermie (Bocharova et al. 1992). L'observation d'une diminution de la transcription a également été faite dans plusieurs organes d'hamster hibernants, comme le cœur, le foie, les reins, le tissu adipeux et certaines zones du cerveau (Osborne et al. 2004).

Ce processus de réduction globale de la transcription passe par différents mécanismes : une diminution de l'activité de l'ARN polymérase II (Pol II), une modification de la structure de la chromatine (Storey & Storey 2010; Morin & Storey 2009), et des régulations épigénétiques qui font notamment intervenir des processus comme la méthylation de l'ADN, et la modifications post-traductionnelle des histones (Morin & Storey 2009). Il a d'ailleurs été montré qu'une forte augmentation de l'activité de certaines HDAC (Histone désacétylase)

avait lieu dans le muscle squelettique des écureuils hibernants (Morin & Storey 2009). La diminution de la transcription chez les hibernants passe également par une diminution globale de l'activité des facteurs de transcription, par le biais de modifications post-traductionnelles comme la sumoylation (Storey & Storey 2010; Morin & Storey 2009; Lee et al. 2007).

Les taux d'incorporation de ¹⁴C-leucine dans les protéines, mesurés sur plusieurs organes (cerveau, foie, cœur) d'animaux en torpeur, sont fortement réduits (d'un facteur pouvant aller jusqu'à 1000 fois) en comparaison aux écureuils en saison active (Frerichs et al. 1998; Boyer & Barnes 1999). Les mécanismes responsables de la diminution de l'étape de traduction incluent notamment une rétention nucléaire de certains transcrits, une régulation opérée par l'expression de certains micro-ARN, ainsi qu'une modification de l'association des ribosomes en polysomes (Storey & Storey 2010; Morin & Storey 2009). La réduction de la synthèse protéique durant l'hibernation n'est pas seulement effective qu'à l'étape d'initiation mais aussi à l'étape d'élongation (Chen et al. 2001; van Breukelen & Martin 2001). En effet, une suppression active de l'élongation a lieu durant la période d'hibernation, par le biais d'une augmentation de la phosphorylation inhibitrice du facteur d'élongation eEF-2 (eukaryotic elongation factor-2) (Chen et al. 2001).

2.4.2 Variations saisonnières dans l'expression de gènes et dans l'abondance ou l'activité de protéines

Les données portant sur l'expression différentielle d'acteurs durant la période d'hibernation mettent en avant des changements dans les mécanismes moléculaires qui coordonnent la suppression des fonctions métaboliques pendant la torpeur, ou encore de mécanismes qui sont impliqués dans le métabolisme énergétique et l'adaptation de certaines fonctions physiologique.

2.4.2.1 Modifications post-traductionnelles

Les cascades de transduction de signaux intracellulaires sont au cœur des mécanismes de régulations cellulaires fortement impactés par l'état de torpeur (revue dans Storey & Storey 2010). Les études menées chez les hibernants se sont intéressées à plusieurs protéines kinases différenciellement régulées, notamment la protéine kinase AKT (aussi appelé PKB) (revue dans

Storey & Storey 2010). Il a été montré que la protéine kinase AKT est inactivée durant la période de torpeur, par déphosphorylation, dans différents tissus (muscle squelettique, tissu adipeux blanc, foie) et chez différents animaux hibernants, comme la marmotte et les écureuils (Hoehn et al. 2004; Abnous et al. 2008; McMullen & Hallenbeck 2010). Dans les organes des chauves-souris hibernantes, la teneur en phospho-Akt était réduite ou inchangée dans six organes, et particulièrement diminuée dans le foie et le tissu adipeux blanc (Eddy & Storey 2003). La diminution de l'activité d'AKT durant la torpeur contribuerait à la suppression des processus anaboliques et de croissance, qui sont coûteux en énergie, et elle jouerait donc un rôle important dans la diminution de l'activité métabolique observée sur cette période.

Un autre exemple du contrôle de l'activité de protéines durant la torpeur par l'état de phosphorylation est la PDH (pyruvate déshydrogénase), une enzyme clé intervenant dans l'oxydation aérobie des glucides, par le biais de la conversion du pyruvate en acetyl-CoA qui alimente le cycle de Krebs. La phosphorylation de la PDH inactive l'enzyme, et on retrouve chez *Callospermophilus lateralis* une quantité de PDH phosphorylée (dans le cœur et les reins des animaux en torpeur), qui représente environ 96-97% de la quantité totale, en comparaison avec les témoins euthermiques (Brooks & Storey 1992).

2.4.2.2 Gènes et protéines régulés à la hausse

Le switch métabolique de l'oxydation des glucides vers l'oxydation des acides gras qui a lieu durant la période d'hibernation, est en partie régulée par une expression différentielle de gènes clés. Des niveaux élevés d'ARNm de PDK4 ainsi qu'une augmentation de la protéine ont été observés chez des spermophiles en hibernation, dans différents tissus (cœur, muscle squelettique, tissu adipeux), ce qui va contribuer à la suppression de l'activité glycolytique (oxydation des glucides) (Buck et al. 2002; Andrews 2004). La régulation coordonnée de PDK4 dans différents tissus pourrait notamment être due à l'activité de certains récepteurs nucléaires appelés les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs) comme PPAR-alpha (PPAR α) et PPAR-gamma (PPAR γ) (Buck et al. 2002).

Certains acides gras libres (saturés et insaturés), ainsi que des dérivés lipidiques tels que les eicosanoïdes (Varga et al. 2011) sont notamment capables d'activer le récepteur PPAR α , qui

joue un rôle dans la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (Wang 2010) et dans la régulation de l'expression de PDK4 (Harris et al. 2002). Etant donné la forte augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux, et donc de la libération d'acides gras, l'hypothèse d'une augmentation de l'activité de PPAR α durant l'hibernation a été avancée (Andrews 2004). Les niveaux protéiques de PPAR γ varient de manière saisonnière chez les animaux hibernants, avec une augmentation dans le tissu adipeux des écureuils *Ictidomys tridecemlineatus* hibernants (Eddy et al. 2005), et dans la plupart des tissus analysés chez des chauves-souris hibernantes (Eddy & Storey 2003). PPAR γ régule l'expression d'un grand nombre de protéines intervenant dans le métabolisme et le transport des lipides comme les FABPs (Fatty acid binding proteins). Les niveaux protéiques de certaines FABPs sont fortement augmentés dans le tissu adipeux brun et cardiaque de chauve-souris durant la période d'hibernation (Eddy & Storey 2004).

Les hibernants semblent également tirer profit de l'activité à basse température de la triacylglycérol lipase pancréatique (PTL) afin d'hydrolyser les triglycérides durant la période d'hibernation. En effet, la PTL, normalement exprimée au niveau du pancréas, est fortement surexprimée (au niveau ARNm et protéine) dans le tissu cardiaque et adipeux de spermophiles en hibernation (Squire et al. 2003). Les niveaux d'ARNm de la lipase hormono-sensible (HSL), nécessaire pour l'hydrolyse des triglycérides du tissu adipeux et la libération des acides gras, sont augmentés durant la période de torpeur chez la marmotte (Wilson et al. 1992) et retrouvés constants entre les différentes saisons chez les écureuils terrestres (Bauer et al. 2001). De plus, la phosphorylation de l'enzyme HSL semble être augmenté chez les écureuils terrestre en hibernation, ce qui met en évidence une augmentation de son activité (Herinckx et al. 2017).

Des études ont mis en évidence une régulation différentielle des protéines mitochondriales découplantes (UCP), avec un rôle potentiel dans le maintien de l'homéostasie thermique durant l'hibernation, via des mécanismes de thermogenèse non régulés par le frissonnement. On retrouve en effet une augmentation des ARNm de UCP2 dans le tissu adipeux blanc et d'UCP3 dans le muscle squelettique d'écureuils terrestre hibernants (Boyer et al. 1998).

Certains facteurs de transcriptions ont été identifiés comme surexprimés durant la période de torpeur, il s'agit notamment de MEF2A et MEF2C, ainsi que de HIF-1 (Tessier & Storey 2012; Storey & Storey 2010; Morin & Storey 2005). La surexpression de MEF2A et MEF2C a été mise en évidence, pendant la période de torpeur, dans le muscle cardiaque d'*Ictidomys tridecemlineatus* (Tessier & Storey 2012), avec une augmentation de la transcription de certains de leur gènes cibles codant pour la desmine, la myomesin 1 et le transporteur de glucose GLUT4, ce qui suggère une implication dans l'adaptation du tissu cardiaque durant l'hibernation.

Le facteur inductible par l'hypoxie (HIF-1) répond également à l'hibernation et son expression est augmentée dans le tissu brun adipeux et le muscle squelettique chez les écureuils hibernants en comparaison avec les animaux en phase active (Morin & Storey 2005). HIF-1 est connu pour réguler la transcription d'un groupe de gènes qui sont impliqués dans la réponse à l'hypoxie, notamment des gènes impliqués dans l'oxygénation des tissus (érythropoïèse, vascularisation). Néanmoins la présence d'un état d'hypoxie chez les animaux hibernants est encore discuté dans la littérature (Drew et al. 2004), et HIF-1 pourrait avoir des rôles alternatifs comme une action inhibitrice sur le cycle cellulaire (Koshiji et al. 2004), étant donné que la division cellulaire et la synthèse de l'ADN sont fortement diminués durant la torpeur (Carey et al. 2003).

Certaines caractéristiques de l'hibernation, comme la température corporelle très basse durant la torpeur et la remontée très rapide durant les périodes de réveil, sont habituellement considérées comme des situations de stress intense. Les données de la littérature mettent en évidence une activation de la réponse UPR (unfolded protein response), avec une augmentation de certaines protéines chaperonnes (protéines de choc thermique ou HSPs) dans le cœur, le muscle squelettique et le tissu adipeux chez les écureuils hibernants (Storey & Storey 2010). Par ailleurs, les niveaux protéiques d'ATF4, un facteur de transcription impliqué dans la transcription de protéines chaperonne et considéré comme un acteur de la réponse UPR, sont fortement augmentés chez les écureuils hibernants, dans les différents organes cités précédemment (Mamady & Storey 2008).

Un autre exemple de protéine qui est régulé d'une façon saison dépendante est l' α 2-macroglobuline, qui est un inhibiteur à large spectre d'enzymes protéolytiques et qui joue un rôle spécifique dans l'inhibition de la coagulation sanguine (Srere et al. 1992; Carey et al. 2003). L'augmentation de l' α 2-macroglobuline pourrait avoir un rôle dans la réduction de la protéolyse d'une manière générale, tout en agissant sur la réduction du temps de coagulation qui a été mise en évidence pendant l'hibernation (Srere et al. 1992; Carey et al. 2003).

2.4.3 Mécanismes d'adaptation au stress cellulaire durant l'hibernation

2.4.3.1 Stress oxydant

Une exposition longue à de basses températures peut être à l'origine d'un stress cellulaire avec des effets sur de nombreux processus tels que la stabilité des protéines, la stabilité des membranes cellulaires, l'activité enzymatique, l'intégrité du cytosquelette, le cycle cellulaire et les mécanismes d'apoptose (Sonna et al. 2002). Les données concernant l'existence d'un stress oxydatif durant l'hibernation, ainsi qu'une régulation à la hausse des mécanismes de défense antioxydants sont contradictoires et les résultats semblent différer en fonction des espèces hibernantes, des tissus ainsi que des différentes phases de la période d'hibernation considérés : début ou fin de l'hibernation, phase de réveil eutherme (interbout arousal) (Page et al. 2009; Yin et al. 2016; Patnaik & Sahoo 2021; Tang et al. 2021; Chazarin et al. 2019; Storey & Storey 2010; Orr et al. 2009; Ohta et al. 2006; Tøien Ø et al. 2001; Ma et al. 2005; Carey et al. 2000; Duffy & Staples 2022; Klichkhanov et al. 2021; Wei et al. 2018). Un certain nombre de données obtenues chez différentes espèces de spermophiles, comme *Urocitellus parryii*, ne démontrent pas d'augmentation du stress oxydatif durant l'hibernation (Orr et al. 2009; Page et al. 2009; Ma et al. 2005).

La diminution de la température corporelle entraîne une réduction de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) chez les animaux capables de torpeur journalière ou saisonnière (Brown & Staples 2015; Brown et al. 2012). En revanche, les épisodes de réveil avec un retour à l'eutherme entraînent une augmentation très importante de la consommation d'oxygène, et la thermogenèse associée au réveil pourrait entraîner un stress oxydatif spécifique dans certains tissus (Orr et al. 2009). Une augmentation du stress oxydatif dans le tissu adipeux

brun a été mis en évidence durant les phases de réveil de *Uroditellus parryii* (Orr et al. 2009). L'augmentation du stress oxydatif a également été mis en évidence chez *Ictidomys tridecemlineatus* au début des phases de réveil par Duffy & Staples, mais avec des données qui suggèrent une réversion des dommages durant la période de réveils euthermiques (Duffy & Staples 2022). Parallèlement il a été suggéré que l'augmentation de certaines enzymes et molécules antioxydantes seraient impliqués dans la protection contre le stress oxydatif généré par les épisodes de réveils euthermiques (Tøien Ø et al. 2001; Ohta et al. 2006).

2.4.3.2 Réponses cellulaires et moléculaires

L'exposition de cellules au froid est capable d'induire l'expression de protéines de stress appelées « HSPs » (Heat Shock Proteins) (Sonna et al. 2002), notamment une protéine de choc thermique de 70 kDa (HSP70). Les études ont montré que les niveaux d'ARNm ou protéiques de HSP70 sont soit non affectés soit réduits chez les écureuils hibernants durant la période de torpeur ou de réveils (interbouts arousals) en comparaison avec les animaux euthermiques, et dans les tissus suivants : cerveau, cœur, foie, rein, muscle squelettique et tissu brun adipeux (Bitting et al. 1999; Carey et al. 1999). L'expression d'une autre protéine de stress thermique, HSP60, n'est pas altérée durant l'hibernation dans les tissus analysés : intestin, rein, foie et muscle (Carey et al. 1999). En revanche GRP75 (glucose-regulated protein 75), un membre de la famille de HSP70 exprimé constitutivement au niveau de la mitochondrie (Mizzen et al. 1989), est retrouvée en quantité plus importante dans le foie, l'intestin et le muscle squelettique des écureuils en état d'hibernation comparé aux animaux actifs durant l'été (Carey et al. 1999).

Un acteur clé du système de défense antioxydant, le facteur de transcription NRF2, contrôle l'expression d'un ensemble de gènes comprenant des protéines de stress, certains cytochromes, des antioxydants ou des enzymes comme la GPx (glutathion peroxydase) et la SOD (superoxyde dismutase) (Ma 2013). L'activité du facteur de transcription NRF2 est notamment régulé par un partenaire appelé MAFK (Katsuoka et al. 2005), et par une protéine inhibitrice nommée KEAP1. Lorsque NRF2 est liée à KEAP1, il reste séquestré dans le cytoplasme, et n'est pas capable d'aller se fixer sur les éléments de réponse de ses gènes cibles (Itoh et al. 1999). De nombreuses études ont montré une augmentation de la transcription de NRF2 et l'accumulation de la protéine dans certains tissus chez des animaux hibernants

(Storey & Storey 2010; Ni & Storey 2010; Tessier et al. 2021; Pier Jr Morin et al. 2008). Chez les écureuils hibernants (*Ictidomys tridecemlineatus*) il a été mis en évidence une augmentation des niveaux protéiques de NRF2 et de son partenaire MAFK dans certains tissus des animaux durant la période de torpeur (Ni & Storey 2010). Cette augmentation était également associée d'une translocation nucléaire accrue des deux protéines. Une diminution de l'interaction entre KEAP1 et NRF2 a également été mis en évidence tout au long du cycle d'hibernation des animaux, ce qui met en avant une augmentation de l'activité de NRF2 (Tessier et al. 2021). Une autre étude a également montré que les niveaux protéiques de NRF2 étaient augmentés durant la torpeur dans le tissu brun adipeux, le cœur et le foie de *Ictidomys tridecemlineatus* (Pier Jr Morin et al. 2008).

Les protéines de liaison à l'ARN (RNA-binding proteins ou RBPs) jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. Les RBPs vont réguler les processus de transcription, de transport et de dégradation des ARNm ainsi que leur traduction (Oliveira et al. 2017). Certaines RBPs sont exprimées en réponse au froid, comme CIRP et RBM3, et pourraient réguler la stabilité et la traduction d'ARNm chez les mammifères hibernant (Williams et al. 2005; Logan & Storey 2020). Concernant la protéine RBM3, une analyse transcriptomique a été faite sur plusieurs tissus (cerveau, cœur, foie) d'*Ictidomys tridecemlineatus* et met en évidence une régulation similaire (augmentation des transcrits de RBM3 durant la torpeur) dans tous les tissus étudiés (Williams et al. 2005). L'étude de Logan & Storey n'a pas démontré de changement des niveaux protéiques de RBM3 dans le foie, le muscle et le tissu adipeux brun d'*Ictidomys tridecemlineatus* entre la période active et d'hibernation (Logan & Storey 2020), cependant certains tissu, comme le cœur et le cerveau, n'ont pas été analysés dans cette étude. Dans le même article, la protéine CIRP a été retrouvée en plus grande quantité dans le tissu hépatique, le muscle squelettique et le tissu brun adipeux.

3. L'hibernation chez l'ours

3.1 Caractéristiques générales de l'hibernation chez l'ours

Les ours sont des mammifères faisant partie de la famille des Ursidés (*Ursidae*) et de la sous-famille des Ursinés (*Ursinae*) (Kitchener et al. 2020). Au sein des Ursinés on retrouve 6 espèces d'ours : l'ours brun (*Ursus arctos*), l'ours noir américain (*Ursus Americanus*), l'ours polaire

(*Ursus maritimus*), l'ours noir d'Asie (*Ursus thibetanus*), l'ours malais ou ours des cocotiers (*Helarctos malayanus*), l'ours lippu (*Melursus ursinus*) [voir Figure 6]. Les ours situés dans des zones de climats chaud comme l'ours malais ou l'ours lippu n'entrent pas en hibernation, ce qui est également le cas pour l'ours polaire malgré le fait qu'il vive en climat froid, à l'exception des femelles gestantes (Robbins et al. 2012).

Les données de la littérature qui seront présentées dans la suite du manuscrit porteront sur 3 espèces d'ours hibernants majoritairement étudiés qui sont : l'ours brun (*Ursus arctos*), l'ours noir américain (*Ursus Americanus*) et l'ours noir d'Asie (*Ursus thibetanus*).

L'hibernation chez *Ursus arctos* et *Ursus Americanus* s'étale d'Octobre-Novembre jusqu'à Avril-Mai en fonction des conditions climatiques (González-Bernardo et al. 2020; Evans et al. 2016; Tøien et al. 2011; Manchi & Swenson 2005). L'entrée en hibernation ainsi que sa durée dépend de différents facteurs environnementaux : neige, température extérieure et disponibilité de la nourriture (González-Bernardo et al. 2020).

A la différence des petits mammifères hibernants tels que l'écureuil et la marmotte, les ours hibernants ne présentent pas d'interruptions de la phase de torpeur, par des épisodes de retour au métabolisme de base. Les ours vont hiberner dans leur tanière jusqu'à une durée qui peut atteindre 5 à 7 mois, et il s'agit d'une période de totale inactivité physique durant laquelle ils ne mangent pas, ne boivent pas, n'urinent pas et ne défèquent pas (Manchi & Swenson 2005; Watts et al. 1981; Hissa et al. 1994; Tøien et al. 2011; Evans et al. 2016; Folk et al. 1980; González-Bernardo et al. 2020).

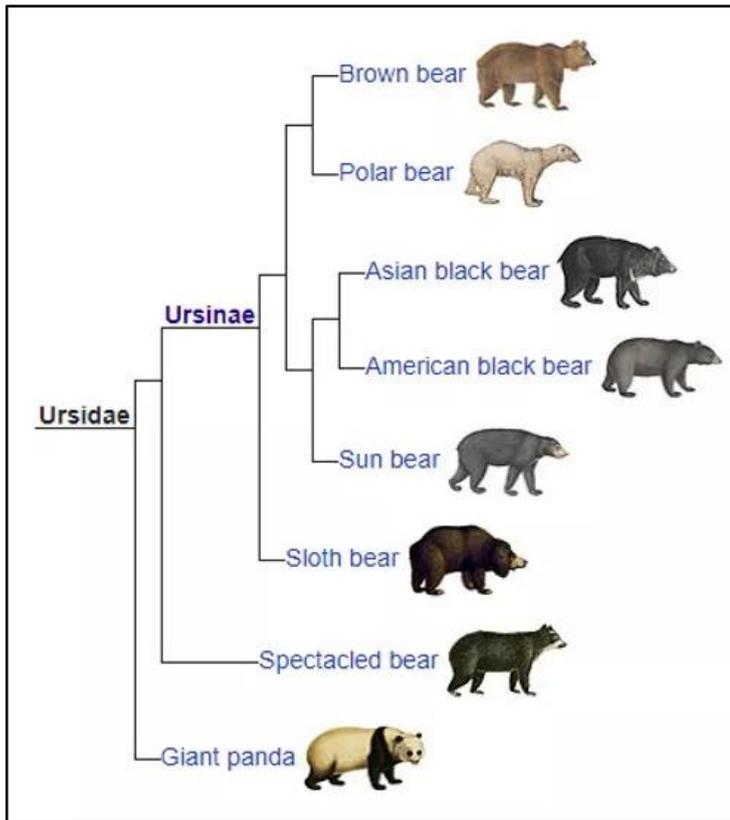


Figure 6 : Dendrogramme de la famille des Ursidés (Ursidae) et de la sous-famille des Ursinés (Ursinae) (Source : <https://www.ursidaeanalytics.com/about>)

Les ours appartiennent à la famille Ursidae et à la sous-famille Ursinae. Au sein des Ursinés, on retrouve 6 espèces d'ours : l'ours brun (Brown bear), l'ours noir américain (American Black Bear), l'ours polaire (Polar Bear), l'ours noir d'Asie (Asian Black Bear), l'ours malais ou ours des cocotiers (Sun bear), l'ours lippu (Sloth bear).

Au sein de la famille des Ursidés on retrouve également l'ours à lunettes (Spectacled bear) ou *Tremarctos ornatus*, et le Panda géant (Giant Panda) ou *Ailuropoda melanoleuca*, qui est l'unique représentant du genre *Ailuropoda*.

3.2 Adaptations physiologiques et métaboliques

Bien que les ours hibernants partagent certaines adaptations, comme le stockage et l'utilisation des réserves lipidiques ou encore un hypométabolisme important durant la torpeur, avec les petits hibernants (par exemple les écureuils et les marmottes), on note cependant de nombreux changements physiologiques spécifiques (Hellgren 1998; González-Bernardo et al. 2020; Hissa et al. 1994). Par exemple, durant l'hibernation, les ours ne connaissent qu'une légère baisse de leur température corporelle qui passe de 37-38°C à 32-33°C en moyenne. Par ailleurs, la réduction du métabolisme chez l'ours est principalement médiée par une inhibition métabolique active, indépendante de la température. En effet, les ours sont capables de réduire leur métabolisme jusqu'à 75%, et cela sans hypothermie majeure (Evans et al., 2016; Geiser, 2004; Tøien et al. 2011). Les ours et les petits hibernants réduisent leur rythme cardiaque pendant l'hibernation, mais la diminution est beaucoup plus importante chez ces derniers atteignant une réduction de 97% en comparaison à 75% chez l'ours (Nelson & Robbins 2015). La bradycardie observée chez l'ours durant la période d'hibernation, est accompagnée d'une forte diminution de la circulation sanguine et de la consommation d'oxygène (estimée à 50%) (Folk et al. 1972). Le rythme respiratoire chez l'ours

va également fortement diminuer et peut descendre à seulement 1-2 respirations par minute durant l'hibernation (Evans et al. 2016). En revanche, durant cette période, les ours restent sensibles aux stimuli externes (bruits, lumière, ...) et sont donc capables de sortir de leur torpeur, afin d'enclencher si nécessaire un phénomène de fuite et d'abandon de la tanière (Evans et al., 2016 ; Hissa et al., 1994). Dans l'étude d'*Evans et al.*, il a été mis en évidence que l'activité physique, le rythme cardiaque et la température corporelle de l'ours commencent à diminuer progressivement plusieurs semaines avant l'entrée en hibernation, et que l'entrée en hibernation est dirigée par des facteurs environnementaux, et particulièrement la température ambiante (Evans et al. 2016). L'étude a également mis en avant que la température corporelle commençait à remonter 2 mois avant la sortie de l'hibernation, et que l'activation du système nerveux sympathique, afin de restaurer le métabolisme euthermique n'a lieu que beaucoup plus tardivement, environ 2 semaines avant la sortie de la tanière.

Le cycle annuel chez les ours, au cours duquel se produit une forte variation de masse corporelle, peut se découper en 3 phases majeures : (i) gain de masse maigre au printemps, (ii) augmentation des réserves adipeuses à la fin de la période estivale, (iii) perte de masse corporelle (principalement la masse grasse) durant la phase de torpeur (revue dans González-Bernardo et al. 2020). L'augmentation de la masse corporelle est d'environ 40% durant la phase d'hyperphagie pre-hibernation chez les ours brun scandinaves, et la perte de masse corporelle durant la torpeur varie notamment en fonction du sexe de l'animal, et elle se situe en moyenne à 18% chez les mâles versus 40% chez la femelle (Swenson et al. 2007), différence notamment expliquée par le fait que les femelles mettent bas et élèvent les oursons durant l'hibernation (González-Bernardo et al. 2020). Cette perte de masse corporelle durant l'hibernation a été évaluée en moyenne à 24% dans une autre étude (Tinker et al. 1998).

La mobilisation des réserves lipidiques corporelles chez l'ours et l'oxydation préférentielle des acides gras durant l'hibernation est mise en avant : (i) par l'augmentation des lipides plasmatiques, acides gras et triglycérides qui sont libérés par le tissu adipeux (Welinder et al. 2016; Græslis et al. 2015; Chazarin, Storey, et al. 2019; LeBlanc et al. 2001; Stenvinkel, Fröbert, et al. 2013) (ii) par la valeur du quotient respiratoire (RQ) qui est proche de 0.7 (Hellgren 1998; Nelson 1973). Par ailleurs, même si l'ours hiberne en hypothermie modérée, une mobilisation sélective des lipides se produit également comme chez les petits hibernants, avec une

réretention sélective des acides gras polyinsaturés et une mobilisation des acides gras saturés pour l'oxydation (Giroud et al. 2019).

Les ours ne présentent qu'une faible atrophie musculaire sur la longue période d'immobilité durant l'hibernation, avec une diminution du contenu protéique évalué entre 8 et 10% pour le biceps femoris, respectivement chez des ours noirs américains (*Ursus Americanus*) en captivité et sauvages (Tinker et al. 1998; Hershey et al. 2008). Une autre étude a mis en évidence une perte de 15% du contenu protéique du muscle vastus lateralis chez *Ursus Americanus*, qui a lieu uniquement au début de l'hibernation, et se stabilise ensuite (Lohuis et al. 2007). Grâce à l'utilisation de la 14C-phenylalanine comme traceur, la synthèse et la dégradation protéique a été mesurée dans le muscle squelettique chez l'ours en été et en hiver durant l'hibernation. Les résultats ont mis en évidence que la synthèse et la dégradation protéique sont toutes les deux plus faibles en hiver par rapport à l'été, indiquant que la balance protéique reste équilibrée durant l'hibernation (Lohuis et al. 2007).

3.3 Modifications cellulaires et moléculaires chez l'ours hibernant

Les principales études transcriptomiques ou protéomiques chez l'ours ont été faites chez *Ursus americanus* (Fedorov et al. 2009; Goropashnaya et al. 2021; Fedorov et al. 2011), *Ursus thibetanus* (Shimozuru et al. 2016) et *Ursus arctos* ou *Ursus arctos horribilis* (Mugahid et al. 2019; Jansen et al. 2019; Chazarin, Storey, et al. 2019; Luu et al. 2020). Par ailleurs, les premières données transcriptomiques chez l'ours, publiées par Fedorov et al. en 2009 et 2011, proviennent de puces. Depuis la sortie de la première version annotée du génome d'*Ursus arctos* en 2018, les données obtenues par RNA seq sont donc beaucoup plus complètes et représentatives.

Les différences saisonnières dans le transcriptome ou protéome chez l'ours ont été étudiées dans 5 organes / tissus : le foie, le tissu adipeux, le muscle squelettique, le cœur et le tissu osseux. Dans l'étude de *Jansen et al.*, en comparant la période où l'ours n'est pas en hibernation (période active ou hyperphagique) et la période d'hibernation, de nombreux gènes ont été identifiés comme étant différentiellement exprimés (DE) (Jansen et al. 2019).

Le tissu adipeux a le pourcentage de gènes DE le plus important (20% de tous les gènes, 6139 gènes), suivi du foie (16.3%, 5010 gènes) et du muscle (7.8%, 2398 gènes).

Les ours noirs américains (*Ursus americanus*) ont une proportion équilibrée de gènes surexprimés (52%) et sous-exprimés (48%), parmi ceux qui sont différentiellement exprimés dans le foie durant l'hibernation (Fedorov et al. 2011). A l'opposé, chez les écureuils (*Ictidomys tridecemlineatus*), 90% des gènes différentiellement exprimés dans le foie, durant l'hibernation, sont sous-exprimés (Williams et al. 2005). L'hypothèse avancée dans la littérature pour expliquer cette différence est en rapport avec les caractéristiques de l'hibernation chez l'ours, qui hiberne avec une température corporelle et une activité métabolique plus élevée que chez les petits mammifères (Williams et al. 2005). La proportion des gènes différentiellement exprimés dans le cœur des ours en hibernation est de 75% pour les gènes surexprimés, ce qui se rapproche des observations chez les écureuils (*Ictidomys tridecemlineatus*) avec 48% de gènes surexprimés (Fedorov et al. 2011). Il a également été mis en évidence par Jansen et al. et Fedorov et al., qu'un programme transcriptionnel coordonné est mis en place durant l'hibernation, avec un grand nombre de groupes de gènes DE de manière similaire dans les tissus étudiés chez l'ours : muscle, foie, tissu adipeux, cœur ; en particulier ceux impliqués dans le processus de traduction, le métabolisme du glucose, la voie de signalisation de l'insuline et la synthèse des acides gras (Jansen et al. 2019; Fedorov et al. 2011).

3.3.1 Synthèse protéique générale

Une surexpression coordonnée de nombreux gènes impliqués dans la synthèse protéique est une caractéristique spécifique au transcriptome de l'ours hibernant, et ce, dans tous les tissus qui ont été étudiés à ce jour (cœur, foie, muscle) (Fedorov et al. 2011; Fedorov et al. 2009).

Il a été identifié, durant la période l'hibernation, dans le foie d'*Ursus Americanus*, une surexpression de 28 (Fedorov et al. 2009) et de 14 gènes (Fedorov et al. 2011) qui sont impliqués dans la synthèse protéique (Gene Ontology G0:0006412 – Protein Biosynthesis). De manière similaire au foie, il a été mis en évidence une surpression de 16 gènes et 32 gènes, respectivement dans le muscle squelettique et le cœur d'*Ursus Americanus*, durant la période d'hibernation. Selon la classification de Gene Ontology (GO), la catégorie associée aux

protéines de liaison à l'ADN (GO:0003723 – RNA Biding) est significativement enrichie dans le foie et le cœur d'*Ursus Americanus*, durant la période d'hibernation (Fedorov et al. 2011). L'induction coordonnée de la transcription de groupes de gènes impliqués dans la synthèse protéique dans différents organes de l'ours hibernant n'est pas retrouvée chez les petits hibernants, où les données suggèrent plutôt une suppression de la synthèse protéique durant la torpeur, dans le foie et le tissu adipeux brun (Fedorov et al. 2009; Williams et al. 2005; Yan et al. 2006). On retrouve en revanche une induction coordonnée de gènes impliqués dans la synthèse protéique et la biogenèse ribosomale durant l'hibernation, dans le muscle squelettique d'*Urocyon parryi* (Goropashnaya et al. 2020).

3.3.2 Catabolisme et anabolisme protéique – Cycle de l'urée

L'ours hibernant est capable de résister à une atrophie musculaire et à une perte de masse osseuse malgré une période de jeûne et d'inactivité physique prolongée (Fröbert et al. 2019). En plus d'une synthèse protéique active dans différents tissus, suggérée par les données transcriptomiques, on retrouve également une induction commune chez l'ours et les petits hibernants du gène RBM3 (RNA Binding Motif protein 3) durant la période d'hibernation dans les différents tissus étudiés, notamment le foie et le cœur (Fedorov et al. 2011; Williams et al. 2005; Yan et al. 2006; Yan et al. 2008). Il a été par ailleurs mis en évidence que la protéine RBM3 était capable de faciliter la synthèse protéique dans des conditions d'hypothermie modérée (32°C) par son interaction avec la sous-unité ribosomale 60S (Dresios et al. 2005), et qu'elle pourrait jouer un rôle dans la préservation du muscle dans des situations d'atrophie musculaire (Dupont-Versteegden et al. 2008). Une réduction coordonnée de l'expression de gènes impliqués dans le catabolisme des acides aminés (comme l'arginase et la leucine aminopeptidase) et des transaminases hépatiques (ALAT1 et ALAT2), a lieu durant l'hibernation (Fedorov et al. 2011; Jansen et al. 2019). En parallèle, une réduction de l'expression des gènes impliqués dans le cycle de l'urée (CPS1, OTC, ASS1, ASL, ARG1) est mise en évidence durant la période d'hibernation, en lien avec la diminution de l'urémie dans le sérum de l'ours hibernant (Stenvinkel, Fröbert, et al. 2013). Une réduction coordonnée de la transcription des gènes impliqués dans le cycle de l'urée a également été mise en évidence chez des petits hibernants (Yan et al. 2008; Williams et al. 2005).

Une sous-expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'autophagie et le système UPS (Ubiquitin-Proteasome System) est retrouvée durant l'hibernation chez *Ursus arctos horribilis* (Jansen et al. 2019), comme MAP1LC3A impliqué dans la formation de l'autophagosome, et ZFAND5 un activateur du protéasome 26S. La diminution de l'expression de SERPINF1 (Serpin Family F Member 1) a également été mise en évidence dans le muscle d'*Ursus arctos horribilis* durant l'hibernation, et pourrait jouer un rôle dans la préservation de la masse musculaire (Mugahid et al. 2019).

Dans le muscle de l'ours brun hibernant une signature myogénique de miARN favorisant la maintenance de la masse musculaire a été mise en évidence durant l'hibernation (Luu et al. 2020). Des niveaux plus élevés d'ARNm de MEF2A, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de nombreux gènes dans le muscle squelettique, ont été détectés dans le muscle de l'ours en hibernation. Il s'agit d'un phénomène qui a également été mis en évidence dans le tissu cardiaque de petits hibernants (Tessier & Storey 2012). Les mi-ARN miR-1, miR-206 et miR-133 dont l'expression est notamment contrôlée par MEF2A (Liu et al. 2007; Rao et al. 2006), sont retrouvés en quantité plus importante dans le muscle de l'ours hibernant. Les mi-ARN miR-1 et miR-206 sont notamment impliqués dans les processus de prolifération, de différenciation et de régénération des cellules musculaires (Horak et al. 2016).

3.3.3 Homéostasie du tissu osseux

Une analyse transcriptomique a été réalisée sur l'os trabéculaire de *Ursus Americanus*, échantillonné sur des animaux en période active (été) et durant l'hibernation (hiver) (Goropashnaya et al. 2021). Bien que des gènes clés (BSALP, RUNX2, BGLAP) impliqués dans l'activité ostéoblastique et la formation osseuse sont régulés à la baisse pendant l'hibernation, il n'y a pas de changements coordonnés significatifs dans la transcription des gènes impliqués dans la formation osseuse (ossification) et les voies de signalisation ostéoblastes-dépendantes. Il y a cependant une régulation transcriptionnelle à la baisse d'un ensemble de gènes impliqués dans le processus de résorption osseuse et dans les voies de signalisation ostéoclastes-dépendantes. De manière identique à la résorption osseuse, les sets de gènes impliqués dans l'apoptose (impliquant les caspases) sont significativement régulés à la baisse durant la période d'hibernation. L'étude de Goropashnaya et al, conclue que la suppression

transcriptionnelle coordonnée de la résorption osseuse, des voies de signalisation liées aux ostéoclastes et de la diminution de l'apoptose cellulaire, contribuent à une préservation de la masse et de la structure osseuse, durant la longue période d'immobilité à laquelle l'ours est soumis pendant l'hibernation.

3.3.4 Métabolisme et fonction mitochondriale

Des changements dans l'expression de gènes et dans l'abondance de protéines impliqués dans le métabolisme cellulaire (glycolyse et néoglucogenèse, lipogenèse et lipolyse, β -oxydation, respiration cellulaire, ...) ont été mis en évidence dans les différents tissus étudiés chez *Ursus arctos*, *Ursus Americanus* et *Ursus thibetanus* (Fedorov et al. 2011; Fedorov et al. 2009; Jansen et al. 2019; Chazarin, Storey, et al. 2019; Shimozuru et al. 2016).

3.3.4.1 Lipolyse, lipogenèse et β -oxydation des lipides

En adéquation avec l'utilisation préférentielle des réserves lipidiques chez l'ours sur toute la durée de l'hibernation, il a été mis en évidence une induction coordonnée de gènes impliqués dans la lipogenèse et la synthèse de triglycérides dans le tissu adipeux, durant la phase d'hyperphagie précédant l'entrée en torpeur. Les enzymes ACL (ATP citrate lyase), ACACA (acetyl-CoA carboxylase), FASN (fatty-acid synthase) impliqués dans la synthèse d'acides gras *de novo* et GPAT (Glycerol-3-phosphate acyltransférase) et DGAT2 (diacylglycérol O-acyltransferase 2) impliqués dans la synthèse des triglycérides, sont surexprimées dans le tissu adipeux durant la période d'hyperphagie (Shimozuru et al. 2016). En revanche, durant la période d'hibernation, les gènes impliqués dans la lipogenèse tels que ACACA et FASN sont régulés à la baisse dans le tissu adipeux alors que les gènes impliqués dans la lipolyse comme HSL (Hormone-sensitive lipase) ou dans le catabolisme des acides gras (β -oxydation mitochondriale) comme CPT1A et CPT1B sont régulés à la hausse dans le tissu adipeux et/ou le muscle squelettique (Jansen et al. 2019; Shimozuru et al. 2016). L'augmentation de l'expression du gène codant pour l'albumine (ALB) durant l'hibernation, le principal transporteur d'acides gras dans les fluides extracellulaires (van der Vusse 2009), est observée parallèlement à une augmentation de l'albumine circulante (Stenvinkel, Fröbert, et al. 2013; Græsli et al. 2015).

Une augmentation dans le foie de l'expression de ACADVL, ACADM, HADHA, impliqués dans la β -oxydation des lipides, a été mis en évidence chez l'ours hibernant (Fedorov et al. 2011). De manière similaire, une augmentation du catabolisme des lipides est suggéré par des changements transcriptomiques et protéomiques, chez les écureuils hibernants (Williams et al. 2005; Yan et al. 2008; Shao et al. 2010). La diminution de la synthèse de lipides au niveau hépatique (triglycérides et cholestérol) durant la torpeur est supportée : par la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de triglycérides (DGAT2), et du cholestérol, comme FDPS (farnesyl diphosphate synthase) et DHCR7 (7-dehydrocholesterol reductase). L'expression diminuée de 2 gènes de la famille du cytochrome P450, impliqués dans la métabolisation du cholestérol en acides biliaires, a également été mis en évidence dans le foie d'ours en hibernation.

3.3.4.2 Métabolisme du glucose (glycolyse et néoglucogénèse)

La réduction de l'utilisation du glucose, observée en parallèle d'un maintien de la néoglucogénèse durant l'hibernation, est fortement suggéré par les analyses transcriptomiques dans le foie et le tissu adipeux d'ours hibernant (Jansen et al. 2019; Fedorov et al. 2011; Fedorov et al. 2009). L'expression de GCK (glucokinase) et HK1 (hexokinase), enzymes clés de la glycolyse, sont diminués dans le foie et le tissu adipeux de l'ours en hibernation. On retrouve également une diminution de l'expression de PDHB (pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta) et TKT (Transketolase) dans le foie, qui sont respectivement impliqués dans l'étape terminale de glycolyse et la voie des pentoses phosphates. L'expression de PDHA (pyruvate dehydrogenase R1 component subunit alpha) est également diminuée dans le tissu adipeux de l'ours hibernant. Le maintien de la néoglucogénèse durant l'hibernation est supporté par la surexpression de plusieurs gènes hépatiques comme la pyruvate carboxylase (PC), qui est responsable de la première étape dans la voie de la néoglucogénèse. Il est également mis en évidence un maintien de l'expression de FBP1 (fructose-bisphosphatase 1) et G6PC (glucose-6-phosphatase), ainsi qu'une régulation à la hausse de PCK1 (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1) et de FBP1 (fructose-1,6-bisphosphatase 1), dans le foie de l'ours hibernant (Jansen et al. 2019; Fedorov et al. 2011).

Concernant le maintien de l'activité glycolytique dans le muscle squelettique de l'ours brun hibernant, les données de la littérature disponibles sont contradictoires, qu'il s'agisse de données transcriptomiques ou protéomiques. Les données transcriptomiques, mettent en évidence une expression réduite de plusieurs gènes glycolytiques dans le muscle de l'ours, durant la période d'hibernation (Shimozuru et al. 2016; Fedorov et al. 2014). Les données protéomiques récentes montrent une augmentation globale de l'abondance de toutes les enzymes glycolytiques dans le muscle squelettique des ours bruns hibernants, à l'exception de GLUT4 et de l'hexokinase (qui n'ont pas été détectées dans l'analyse) et de la PKFM (6-phosphofructokinase ATP-dépendante) dont l'abondance reste identique entre les saisons (Chazarin, Storey, et al. 2019). Les auteurs de l'étude ont émis l'hypothèse que la capacité glycolytique du muscle squelettique de l'ours était au moins maintenue, si ce n'est augmentée durant l'hibernation. Cependant ils concluent également que compte tenu l'augmentation de PDK4 (et de la diminution de la PDH), la conversion du pyruvate en acétyl-CoA est fortement réduite, ce qui pourrait orienter préférentiellement la glycolyse vers la production de lactate (Chazarin, Storey, et al. 2019).

3.3.4.3 Cycle de Krebs – Fonction mitochondriale

Comme présenté dans la partie 2.3.4 Fonction mitochondriale du manuscrit **[voir page 24]**, un ralentissement du fonctionnement du cycle de Krebs et de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale a lieu durant la phase de torpeur des animaux hibernants.

Une sous-expression coordonnée de nombreux gènes impliqués dans la respiration cellulaire a lieu dans le foie de *Ursus Americanus* pendant la période de torpeur (Fedorov et al. 2011). On retrouve une sous-expression de gènes clés du cycle de Krebs comme SDHC (Succinate Dehydrogenase Complex Subunit C) et ACO1 (Aconitase 1), et de plusieurs gènes intervenant dans le transport d'électrons comme CYCS (Cytochrome C), COQ5 (Coenzyme Q5, Methyltransferase) et NDUFS1 (NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit S1).

En ce qui concerne le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale, il a également été observé une diminution des niveaux protéiques de la citrate synthase (CS ; 2 fois) et des sous-unités des complexes mitochondriaux I, II, IV et V, dans le muscle squelettique des ours hibernants, ce qui reflète une diminution du contenu mitochondrial (Chazarin, Storey, et al. 2019).

PARTIE B : Matériel et Méthodes

MATERIEL ET METHODES

1. Matériels

1.1 Echantillons collectés lors des captures d'ours sauvages

Parmi les ours bruns sauvages (*Ursus arctos*) capturés par le Scandinavian Brown Bear Research Group (SBBRG) chaque année dans les comtés de Dalarna et de Gävleborg (Suède), entre 4 et 8 animaux sont inclus dans nos programmes de recherche. Ces animaux seront prélevés à deux périodes, en février pendant l'hibernation des animaux, et en juin au début de la phase active. Le choix d'animaux subadultes (âgés de 2 ou 3 ans), avant la maturité sexuelle est justifié : (i) pour la sécurité des animaux mêmes ainsi que du personnel (ii) pour le transport et la manipulation des animaux (iii) pour supprimer le risque de capturer une femelle gravide.

Le nombre d'ours femelles (F) est plus important (d'environ 3 fois) que le nombre d'ours mâles (M) [voir Tableau 1 et 2]. Les jeunes mâles ont tendance à quitter plus souvent la zone de naissance, alors que les femelles restent plus souvent à proximité de leur zone de naissance (et donc de leur mère). La capture d'un plus grand nombre d'animaux femelles est justifié vis-à-vis des contraintes de distance(s) par rapport au camp de base scientifique.

Les procédures de collecte des échantillons de sang, de tissu adipeux sous-cutané et de tissu musculaire (*vastus lateralis*) ont été décrites précédemment (Chanon et al. 2018a; Chazarin, Storey, et al. 2019). Tous les échantillons et les données ont été recueillis, dans le cadre de protocoles approuvés par le Comité suédois d'éthique de l'expérimentation animale (demandes Dnr C3/2016 et Dnr C18/2015), l'Agence suédoise de protection de l'environnement (NV-00741-18) et le Conseil suédois de l'agriculture (Dnr 5.2.18-3060/17). Les échantillons de sang ont été prélevés à partir de la veine jugulaire dans des tubes secs pour le sérum (Vacuette® Z serum Sep Clot Activator, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Autriche) ou dans des tubes contenant de l'EDTA (BD Vacutainer®, FisherScientific, Illkirch, France) pour le plasma. Tous les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à ce que les analyses soient effectuées simultanément sur des échantillons appariés hiver et été.

Pour de très rares cas, les prélèvements ont été effectués sur les mêmes animaux 2 années consécutives [voir Tableaux 1 et 2].

1.2 Lignées cellulaires et myoblastes primaires

Les lignées cellulaires CCL136 (ATCC, USA), un modèle cellulaire de rhabdomyosarcome humain, sont cultivées dans un milieu DMEM 4.5 g/L de glucose (Gibco, USA) contenant 1% penicilline-streptomycine (Gibco, USA), 5% de glutamine (GlutaMAX, Gibco, USA) et 10% de sérum de veau fœtal (FBS) (Gibco, USA).

La lignée cellulaire HFF-1 de fibroblastes humains (ATCC, USA), est cultivée dans les mêmes conditions que les cellules CCL136.

La lignée cellulaire de cancer prostatique PC3 (ATCC, USA), est cultivée dans un milieu RPMI 1640 4.5 g/L de glucose (Gibco, USA) contenant 1% penicilline-streptomycine (Gibco, USA), 5% de glutamine (GlutaMAX, Gibco, USA) et 10% de sérum de veau fœtal (FBS) (Gibco, USA).

Les cellules musculaires humaines ont été dérivées de biopsies de muscles (vastus lateralis) obtenues à partir de donneurs témoins sains (biobanque Diomedé). Toutes les procédures pour la constitution et l'utilisation de la banque de cellules musculaires humaines ont été approuvées par le comité d'éthique français SUD EST IV (accord #12/111 A 13-02) et réalisées conformément à la législation française (loi de Huriet).

Les myoblastes humains prolifèrent dans un milieu Ham's F10 1 g/L de glucose (Gibco, USA), contenant 1% penicilline-streptomycine (Gibco, USA), 5% de glutamine (GlutaMAX, Gibco, USA) et 15% de sérum de veau fœtal (FBS) (Gibco, USA). A 80-90% de confluence, la différenciation en myotubes est induite avec un milieu DMEM 1 g/L de glucose (Gibco, USA) contenant 1% penicilline-streptomycine (Gibco, USA), 5% de glutamine (GlutaMAX, Gibco, USA) et 2% de sérum de veau fœtal (FBS) (Gibco, USA). La formation de myotubes est contrôlée par une observation au microscope durant toute la durée de cette étape.

Le comptage de cellules est réalisé à l'aide d'un compteur de cellules (Z Series Coulter Counter, Beckman Coulter). Les cellules sont décollées du puits par ajout d'une solution de trypsine-EDTA (0.25%/0.02%), puis 20µL de la suspension cellulaire est diluée dans 10 mL de solution isotonique (Beckman Coulter™ ISOTON™ II) pour comptage.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes lignées cellulaires et conditions de culture

Lignées cellulaires	Fournisseur	Référence	Milieu de culture
PC3	ATCC	CRL-1435	RPMI 1640 10% FBS
CCL136	ATCC	CCL-36	DMEM 10% FBS
HFF-1	ATCC	SCRC-1041	DMEM 10% FBS
Myotubes humains	Collection interne	Banque de cellules interne (approbation comité éthique, accord #12/111 A 13-02)	Milieu de prolifération : HAM'S F-10 low glucose 10% FBS Milieu de différenciation : DMEM low glucose 2% FBS

2. Méthodes

2.1 Préparation des mix de sérum

Pour le traitement des cellules, les sérums individuels de 16 animaux ont été réparti en 4 groupes homogènes (âge, sexe, année de capture) pour réaliser 4 mix de sérums natifs nommés M1, M2, M3 et M4. La préparation des mix de sérum est réalisée de la même manière pour le mix S (été) et W (hiver) avec des échantillons appariés [voir Tableau 2 et 3]. Les mix sont préparés dans une ambiance réfrigérée (4°C), afin de prévenir tout phénomène de dégradation protéique, en mélangeant un volume équivalent de sérum d'été ou d'hiver de chaque animal. Les mix sont aliquotés dans des tubes de différents volumes puis conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 2 : Liste des caractéristiques des 16 animaux utilisés pour la fabrication des 4 mix (M1-M4)

	Identifiant (animal)	Sexe	Age	Année de capture
M1	W1813	F	3	2020
	W1509	F	2	2017
	W1701	F	2	2018
	W1814	M	2	2019
M2	W1604	F	3	2018
	W1610	M	2	2017
	W1710	F	2	2018
	W1803	F	2	2019
M3	W1601	M	2	2017
	W1709	F	3	2019
	W1813	F	2	2019
	W1909	F	2	2020
M4	W1707	F	3	2019
	W1608	F	2	2017
	W1806	F	2	2019
	W1812	M	2	2019

De la même façon, les sérums individuels de 19 animaux ont permis l'obtention des Mega-Mix

Tableau 3 : Liste des caractéristiques des 19 animaux utilisés pour la fabrication des Mega-Mix.

Identifiant (animal)	Sexe	Age	Année de capture
W1806	F	3	2020
W1813	F	3	2020
W1909	F	2	2020
W1910	M	2	2020
W1707	F	3	2019
W1709	F	3	2019
W1802	M	2	2019
W1803	F	2	2019
W1806	F	2	2019
W1812	M	2	2019
W1813	F	2	2019
W1814	M	2	2019
W1604	F	3	2018
W1701	F	3	2018
W1709	F	2	2018
W1710	F	2	2018
W1509	F	3	2017
W1304	F	3	2015
W1305	F	3	2015

2.2 Préparation des fractions de sérum

Les fractions de sérum ont été réalisées à l'IPHC de Strasbourg par Alexandre Geoffroy à partir des Mega-Mix réalisés pour les sérums d'été et d'hiver. La réalisation de 7 fractions a été mise en œuvre avec différentes procédures :

F0 : Sérum non fractionné

F1 : Sérum chauffé à 50°C pendant 20 minutes

F2 : Sérum chauffé à 65°C pendant 20 minutes

F3 : Sérum soumis à 3 cycles de décongélation-recongélation

F4 : Fraction déplétée en lipides. Le sérum est délipidé selon le protocole *de Cham & Knowles* (Cham & Knowles 1976). 100µL de Mega-Mix hiver ou été additionné de 200 µL d'un mélange Butanol/DIPE (40/60 v/v), suivi d'une agitation lente durant 1h et d'une centrifugation (2 min, 2000g). La phase organique N°1 est récupérée et réservée. Un volume de DIPE de 100% est ajouté à la phase aqueuse, suivi d'une centrifugation (2 min, 2000g). La phase organique N°2 est récupérée et mélangée avec la N°1. La phase aqueuse correspond au sérum délipidé.

F5 : Fraction lipidique (phase organique) issue de la délipidation du sérum (F3)

F6 : Fraction déplétée en albumine. La déplétion en albumine a été réalisée selon le protocole de *Cioloboc et al.* (Cioloboc et al. 2013). L'éthanol absolu (refroidi à 4°C sur glace) est ajouté dans 100 µL de Mega-mix, afin d'obtenir une concentration finale de 42% (soit 72.6µL pour 100 µL de sérum). Les tubes sont mis à agiter à 4°C durant 1h, puis centrifugés (45 min, 16 000g, 4°C). Le surnageant obtenu contient l'albuminome (Faction F7), et le culot obtenu est constitué du reste des protéines sériques. Le culot de protéines est solubilisé dans 100 µL de tampon Tris HCl 10mM (pH 7.5), et constitue la fraction déplétée en albumine

F7 : Fraction albuminome (surnageant), issue de la déplétion en albumine

Après obtention, les fractions sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

2.3 Dosages des lipides circulants

La quantification des lipides circulants a été réalisée à partir de 50µl de plasma provenant de des prélèvements collectés en été et en hiver sur les animaux des saisons 2015, 2016 et 2017. Les dosages ont été réalisés à la plateforme de lipidomique de l'INSA de Lyon (INSERM, INRAE, INSA, Functional Lipidomic Plateforme, Lyon, France)

2.4 Dosages des endocannabinoïdes circulants et tissulaires

La quantification des endocannabinoïdes circulants a été réalisé à partir de 500µl de plasma provenant de 8 ours prélevés en hiver et été lors des saisons 2018 et 2019. La quantification des endocannabinoïdes a également été réalisée sur 50 µg de tissu adipeux et musculaire, respectivement, sur 6 et 5 échantillons été et hiver d'animaux collectés ces mêmes années. Le dosage des endocannabinoïdes 2-AG (2-Arachidonoylglycerol) , AEA (anandamide) et OEA (N-oleoylethanolamide) a été réalisée par la plateforme de lipidomique de Dijon (INSERM UMR1231, Université de Bourgogne, France).

2.5 Traitement des cellules au sérum d'ours

Les différentes lignées cellulaires (PC3, CCL136, HFF-1) et les myotubes humains sont traités durant 48h avec le milieu de culture correspondant (voir paragraphe 1.2) additionné de 5% FBS (Foetal Bovine Serum) ou 5% WBS (Winter Bear Serum) ou 5% SBS (Summer Bear Serum), et incubés à 37°C et 5% CO₂.

Pour le traitement des cellules avec les fractions de sérum (voir paragraphe 1.3 et **Tableau 3**) la fraction de sérum est ajoutée au FBS 5%. Les cellules sont donc soit traitées avec 5% FBS soit avec 5% FBS additionné de 5% fraction WBS ou de 5% fraction SBS.

2.6 Mesure de l'activité NADH-déshydrogénase (test MTT)

Le test MTT est un test colorimétrique permettant d'estimer l'activité de la NADH déshydrogénase mitochondriale (complexe I) (Huet et al. 1992). Le composé MTT (jaune) est métabolisé par la NADH déshydrogénase et va former un composé appelé formazan (violet). Une lecture de la DO à 570 nm permet de mesurer la présence du formazan et d'apprécier l'activité MTT exprimée en ΔDO / min.

Le substrat de la réaction est préparé à partir de MTT ou 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, USA) dissous dans du PBS préchauffé à 37°C afin de réaliser une solution stock à 5mg/mL. La solution stock est homogénéisée par retournement durant 30 min, jusqu'à complète dissolution des cristaux jaunes. La solution stock est ensuite aliquotée en tubes de 1mL qui sont seront stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

Tableau 4 : Réactifs chimiques MTT : Mesure de l'activité NADH-déshydrogénase

Produit	Fournisseur	Référence
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich	M5655
PBS pH 7.4	Gibco	10010056
DMSO (Molecular Biology Grade)	Sigma-Aldrich	D8418
Roténone (> 95%)	Sigma-Aldrich	R8875

Le test MTT est effectué dans des plaques de culture 96 puits. La solution stock de MTT (5 mg/mL) est ajoutée dans le milieu afin d'obtenir une concentration finale de 0.5 mg/mL. La plaque est mise à incuber 35 min à 37°C, 5% CO₂ pour les cellules PC3, HFF-1 et CLL136. Le milieu est ensuite éliminé par retournement de la plaque, et 150 µL de DMSO pur (Sigma-Aldrich, USA) est ajouté dans chaque puits afin de lyser les cellules et solubiliser instantanément les cristaux de formazan. La plaque est laissée à 37°C au repos durant 10 min puis agitée durant 5 min. La lecture de la plaque 96 puits est réalisée à 570 nm dans un lecteur de plaque.

2.7 Extraction des protéines

La lyse des cellules est effectuée dans du tampon de lyse IGEPAL additionné d'un cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma-Aldrich, USA) et d'un mélange d'inhibiteur de phosphatase (tampon PHIC : 1mM Na₃VO₄, 10mM NaF, eau *Milli-Q*). Après centrifugation (15 min, 12 000 G), la concentration en protéine a été déterminé par un dosage Bradford.

La quantification des protéines a été réalisée également avec le Kit Pierce 660 nm Protein Assay (Thermo Scientific). Dans une microplaque 96 puits, 10 µL d'une gamme étalon de BSA (125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/mL) fournie par le fabricant et 10 µL de chaque échantillon sont additionnés de 150 µL du réactif d'essai. La plaque est ensuite agitée durant 1 min, protégée de la lumière, et une lecture de la DO à 660nm est effectuée. La quantité de protéine dans les échantillons est calculée grâce à l'équation de la droite obtenue avec la gamme étalon corrigée par la moyenne des blancs (150 µL réactif + 10 µL H₂O ultra pure).

Tableau 5 : Liste des produits et solutions utilisées pour l'extraction de protéines

Produits et Solutions	Fournisseur - Référence	Composition (Concentration finale dans échantillons)
Protease Cocktail inhibitor	Sigma-Aldrich P8340	<i>FABRICANT</i>
Tampon Laemmli 1X	Préparé (Labo)	Tris Hcl 33mM pH = 6.8, glycérol 8.3% SDS 1.3%, bleu de bromophénol 0.4%
Tampon Igepal	Préparé (Labo)	Tris Hcl 10mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, Triton X100 1%, IGEPAL CA630 0.5%

2.8 Western blot

Les échantillons protéiques sont additionnés d'un tampon Laemmli et de DTT (60 mM), puis dénaturés 8 min à 95°C, à l'exception des échantillons destinés à la quantification des complexes de la chaîne respiratoire (oxphos) qui sont mis à dénaturer 15 min à 50°C.

Pour la détection de la citrate synthase (CS), 30 µg de protéines sont déposés dans un gel TGX FastCast 10% Acrylamide (Biorad, Marnes-la-Coquette, France), le transfert est ensuite réalisé sur membrane PVDF par transfert semi-sec (Trans-Blot Turbo Transfer System, Biorad), en utilisant le protocole Standard (30 min, 1.0 A, 25V constant).

Pour la détection des complexes de la chaîne respiratoire (OXPHOS) ; la migration est réalisée dans un gel 10% Acry/Bis préparé au laboratoire, suivi d'un transfert liquide 1H-100V à 4°C

Après transfert semi-sec ou liquide, les membranes PVDF sont ensuite bloquées dans une solution TBS-Tween 0.5% et 4 % BSA 1h à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées durant la nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires appropriés OXPPOS (ab 110413, Abcam, Cambridge, UK) et CS (#sc390693, Santa Cruz Biotechnology, Nanterre, France), tous les 2 dilués à 1/1000^e. Les anticorps secondaires goat anti-mouse IgG-HRP sont dilués à 1/10 000^e pour CS et 1/3000^e pour OXPPOS. Pour la visualisation de la chemiluminescence, un analyseur G:BOX (Syngene) a été utilisé.

L'intensité des bandes du Western blot est quantifiée par analyse d'image (ImageJ, NIH), et normalisée par la quantification totale de protéines grâce au TGX contenu dans les gels (Biorad).

Tableau 6 : Liste des Anticorps primaires et secondaires utilisés

Anticorps	Fournisseur - Référence	Dilution
Anticorps primaire Citrate synthase	Santa Cruz Biotechnology (#sc390693)	1/1000
Anticorps primaire Total OXPPOS Rodent WB Antibody Cocktail	Abcam, Cambridge, UK (ab 110413)	1/1000
Anticorps secondaire goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology (#sc2005)	1/10 000 (CS) 1/3000 (OXPPOS)

2.9 Mesure de la respiration mitochondriale

2.9.1 Respiration mitochondriale - SEAHORSE

La mesure de la respiration mitochondriale (OCR = oxygen consumption rate) a été réalisée sur la plateforme de l'ENS (Lyon, France) à l'aide d'un SEAHORSE XFe24 Analyser (Agilent, Les Ulis, France).

Les cellules ont été cultivées au laboratoire, puis transférées à Lyon à J+3 jours post-différentiation. Le traitement des cellules avec le sérum d'ours est effectué sur place à J+5 et les mesures de respiration à J+7. Les cellules ont été lavées deux fois et incubées pendant 1 h dans du XF DMEM (103575-100, Agilent) préchauffé pH = 7.4 à 37°C dans un incubateur sans admission de CO₂. Le Mito Stress Test est réalisé selon le protocole du fabricant.

Le taux de consommation d'oxygène (OCR) a été mesuré dans un milieu XF DMEM ph = 7.4 avec 10mM de glucose, 2mM de glutamine et 1mM de pyruvate, puis après injections successives de 1.5µM d'oligomycine, 0.5µM de FCCP et 0,5µM Roténone/Antimycine A. L'OCR est exprimé en pmol min⁻¹.

Les données ont été normalisées par la mesure du nombre de noyaux présents dans chaque puits. Le comptage des noyaux a été réalisé grâce au Cytation (Biotek, Winoski, VT, USA) après fixation au paraformaldéhyde 4% et coloration au DAPI.

En parallèle, pour plusieurs plaques, la quantité de protéines présentes dans chaque puits a été mesurée après lyse dans du tampon de lyse IGEPAL [voir Tableau 6], et quantification à l'aide du Kit Pierce 660 nm Protein Assay (Thermo Scientific).

La respiration basale correspond à la consommation d'oxygène nécessaire aux besoins en ATP de la cellule et à la consommation d'oxygène résultant de la fuite de protons. L'oligomycine inhibe l'ATP synthase (complexe V), et la diminution de l'OCR après l'injection d'oligomycine est corrélée à la **respiration mitochondriale associée à la production d'ATP cellulaire**, qui est obtenue par la différence entre l'OCR basale et l'OCR après l'addition d'oligomycine. Le FCCP est un agent découplant qui va perturber le gradient de protons et le potentiel de membrane mitochondriale. Par conséquent, le flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire n'est pas inhibé, et l'oxygène est consommé au maximum par le complexe IV. L'OCR obtenu après injection du FCCP, qui correspond à la **respiration maximale**, peut alors être utilisé pour calculer la **capacité respiratoire de réserve**, définie comme la différence entre la respiration maximale et la respiration basale. La capacité respiratoire de réserve est une mesure de la capacité de la cellule à répondre à une demande énergétique accrue. La troisième injection est un mélange de roténone, un inhibiteur du complexe I, et d'antimycine A, un inhibiteur du complexe III. Cette combinaison bloque la respiration mitochondriale et permet d'apprécier la consommation d'oxygène non mitochondriale, qui est le reflet de la consommation d'oxygène par des processus extérieurs à la mitochondrie. Le calcul de la **fuite de protons (proton leak)** est défini comme la différence entre l'OCR après ajout d'oligomycine et l'OCR obtenu après addition de la roténone et de l'antimycine A.

L'efficacité de couplage (CE) représente la proportion d'O₂ consommée pour former de l'ATP. Elle est calculé par la formule suivante : **CE % = [respiration couplée à l'ATP/(basal – fuite de protons) x 100]**

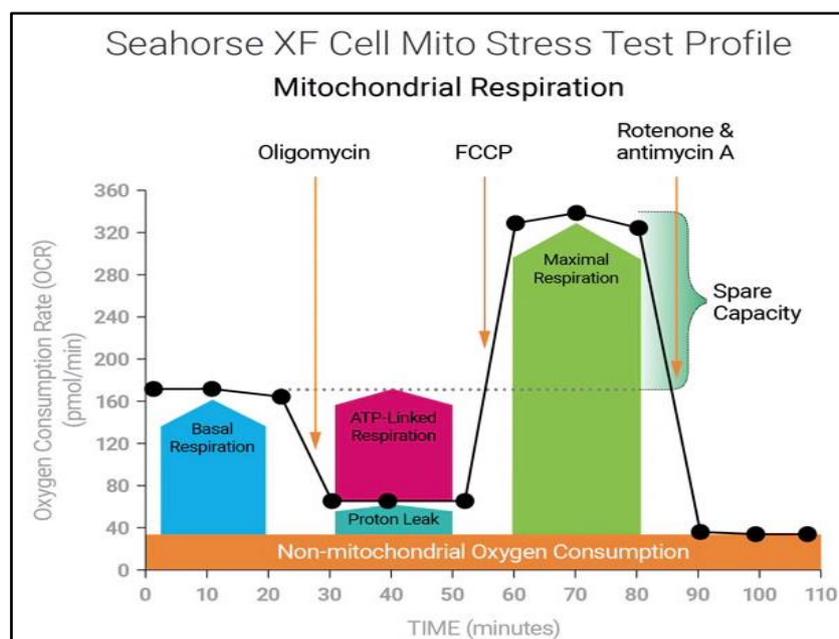


Figure 7 : Profil Mito Stress des principaux paramètres de la respiration mitochondriale mesuré avec un appareil Seahorse.

Le test Seahorse XF Cell Mito Stress Test utilise des modulateurs de la respiration qui ciblent les composants de la chaîne de transport d'électrons (ETC) dans les mitochondries pour analyser les paramètres clés de la respiration mitochondriale. Des composés (oligomycine, FCCP, et un mélange de Roténone et d'Antimycine A) sont injectés de manière séquentielle afin de mesurer la respiration liée à la production d'ATP, la respiration maximale, et la fraction de la consommation d'oxygène indépendant de la respiratoire mitochondriale. La fuite de protons et la capacité respiratoire de réserve sont ensuite calculées à l'aide de ces paramètres et de la respiration basale. L'OCR pour Oxygen Consumption Rate est exprimé en pmol min^{-1} .

2.9.2 Respiration mitochondriale – Oroboros

La mesure de la respiration mitochondriale a été effectuée au sein du laboratoire CARMEN (Lyon, France). Les cellules PC3 ont étéensemencées et cultivées à Lyon. Les cellules sont perméabilisées avec de la digitonine (30 minutes, 10 $\mu\text{g/ml}$), puis après rinçage la suspension est ajoutée dans une cuve de 2ml d'un Oxygraphe 2K (Oroboros Inc, Innsbruck, Austria) pour analyse. La consommation d'oxygène est mesurée en présence de Pyruvate/malate (PM) (respectivement 5 mM et 2 mM), puis en ajoutant l'ADP (2 mM). L'addition successive de roténone (0.5 μM), succinate (10 mM), TTFA (40 μM), TMPD/ascorbate (respectivement 0.3 mM and 3 mM), permet la détermination des vitesses de phosphorylation oxydative au travers des substrats des complexes I, II, et IV. La consommation d'oxygène est mesurée et normalisée en $\text{nmol min}^{-1} \text{mg de protéines}^{-1}$.

Le **RCR (respiratory control ratio)** est le rapport entre le taux de consommation d'oxygène des mitochondries à l'état 3 et le taux de consommation d'oxygène à l'état 4. Le RCR est un indice de la façon dont la respiration est couplée à la phosphorylation de l'ADP. Dans cette expérience, l'état 4 correspond à la consommation d'O₂ après injection de PM et l'état 3 à la consommation d'O₂ après ajout de (PM) + ADP.

2.10 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism. Les données sont représentées par la valeur de la moyenne \pm SEM (erreur standard de la moyenne). Les tests statistiques utilisés sont détaillés dans les légendes des figures et comprennent des test t de Student pour données appariées, afin de comparer les différences entre le sérum été SBS ou hiver WBS, ou encore pour comparer les ratios W/S. Des test ANOVA à 1 voie ont été utilisés pour comparer les différences entre les 3 conditions : FBS, SBS et WBS.

PARTIE C : Présentation du sujet de thèse

Les ours bruns (*Ursus arctos*) hibernent sur une période pouvant aller jusqu'à 5 à 7 mois, sans manger, boire ou déféquer, sans uriner et avec une absence totale d'activité physique. Durant cette période les ours ne développent pas d'atrophie musculaire, d'ostéoporose, de coagulopathies ou d'altérations de la fonction cardio-vasculaire. L'utilisation du modèle de l'ours brun hibernant pour lutter contre les maladies cardiovasculaires, l'insuffisance rénale, la sarcopénie et l'ostéoporose, chez l'homme, a été suggéré par de nombreuses publications (Bertile et al. 2021; Fröbert et al. 2019; Stenvinkel, Jani, et al. 2013).

La possibilité de transférer certaines caractéristiques présentes chez l'ours brun vers l'homme, et l'existence d'un **effet trans-espèce(s) du sérum d'ours hibernant**, a été mis en avant par différentes publications :

- En 2007, un article de *Fuster et al.*, a démontré un effet anti-protéolytique du plasma d'ours hibernant sur des muscles de rat (EDL ou extensor digitorum longus). L'hypothèse avancée dans l'article est que, durant l'hibernation, l'ours serait capable de produire un **inhibiteur protéolytique** qu'on retrouve **en circulation dans le sérum** (Fuster et al. 2007).
- En 2018, l'article de Chanon et al., a démontré que le sérum d'ours hibernant (mais pas le sérum d'ours prélevé en été) était capable de promouvoir une hypertrophie, lorsqu'il est appliqué sur des myotubes humains en culture. L'effet d'hypertrophie observé passerait par une **inhibition de la dégradation protéique** impliquant les voies de dégradation lysosomale et protéasome-dépendante (Chanon et al. 2018).
- En 2020, l'article de Nasoori et al., a mis en avant un effet différentiel du sérum d'ours sur l'ostéoclastogénèse. L'incubation de PBMCs d'ours (cellules mononucléées sanguine périphérique) avec du sérum d'ours d'été ou d'hiver, a montré que le sérum d'ours hibernant était capable d'inhiber fortement la différenciation des PBMCs en ostéoclastes, en comparaison au sérum d'ours prélevé en été. L'hypothèse avancée est que l'effet observé pourrait être dû soit à **l'absence d'un ou de facteur(s) de différenciation** ou à **la présence d'un composé inhibiteur de l'ostéoclastogénèse dans le sérum d'ours hibernant** (Nasoori et al. 2020).

L'accès au modèle animal de l'ours brun (*Ursus arctos*) et aux échantillons de sang et de tissus (tissu adipeux et musculaire) est possible grâce au projet de recherche de l'ours brun

scandinave (*Scandinavian Brown Bear Research Project* ou *SBBRP*), créé au début des années 1980 ; et qui accueille depuis 2011 des chercheurs, qui souhaitent utiliser l'ours brun comme modèle d'étude pour des applications en santé humaine.

Les objectifs principaux du « projet ours » sont : (i) caractériser l'ensemble des effets biologiques du sérum d'ours brun hibernant sur des modèles cellulaires, (ii) identifier et caractériser les composés circulants actifs et responsables des effets biologiques observés.

De l'existence d'un effet différentiel du sérum d'ours d'été ou d'hiver, observé sur des cellules humaines, découle l'objectif de ma thèse qui est **d'étendre l'exploration des effets biologiques du sérum sur des modèles cellulaires *in vitro***, sur des paramètres encore non étudiés, tels que **des effets sur le métabolisme cellulaire et la respiration mitochondriale**. L'exploration de nouveaux effets biologiques du sérum est réalisée sur différents modèles cellulaires comme des cellules PC3, des fibroblastes ou des modèles de cellules musculaires primaires (myotubes humains).

Dans le cadre de la **recherche des composés circulants bioactifs** dans le sérum d'ours hibernant, une **approche ciblée** et **sans a priori** est mise en œuvre. **L'approche ciblée** se focalise sur l'investigation des **changements de composés circulants dans le sérum de l'ours** entre l'été et l'hiver, comme **les lipides**, et des dérivés lipidiques bioactifs tels que les **endocannabinoïdes**.

L'approche sans à priori repose sur la base du fractionnement du sérum. Pour développer cette approche sans à priori et tester les fractions de sérum, la première étape consiste dans la recherche d'un readout facilement mesurable et permettant de tester les fractions de sérum. Le fractionnement du sérum, réalisé par différentes techniques (dénaturation, délipidation, désalbuminisation, ...), permet de simplifier l'investigation et la recherche de la nature des composés actifs.

PARTIE D : Données expérimentales

1. Publication

Specific shifts in the endocannabinoid system in hibernating brown bear

Christian Boyer¹, Laura Cussonneau¹, Charlotte Brun², Christiane Deval¹, Jean Paul Pais de Barros³, Stéphanie Chanon⁴, Nathalie Bernoud-Hubac⁴, Patricia Daira⁴, Alina L. Evans⁵, Jon M. Arnemo^{5,6}, Jon E. Swenson^{7,8}, Guillemette Gauquelin-Koch⁹, Chantal Simon⁴, Stéphane Blanc², Lydie Combaret¹, Fabrice Bertile², Etienne Lefai^{1*}

*Corresponding author

1 Université d'Auvergne, INRAE, UNH, Clermont-Ferrand, France

2 Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, Strasbourg, France

3 Plateforme de Lipidomique, INSERM UMR1231, Université de Bourgogne, Dijon, France

4 Université de Lyon, INSERM, INRAE, INSA, Lyon, France – Functional Lipidomics Platform

5 Department of Forestry and Wildlife Management, Inland Norway University of Applied Sciences, Campus Evenstad, NO-2480 Koppang, Norway.

6 Department of Wildlife, Fish, and Environmental Studies, Swedish University of Agricultural Sciences, SE-901 83 Umeå, Sweden.

7 Faculty of Environmental Sciences and Natural Resource Management, Norwegian University of Life Sciences, NO-1432 Ås, Norway.

8 Norwegian Institute for Nature Research, NO-7485 Trondheim, Norway.

9 Centre National d'Etudes Spatiales, CNES, F-75001 Paris, France

Contexte :

Les endocannabinoïdes sont des médiateurs lipidiques capables de se lier aux récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2, et de les activer. Ces lipides bioactifs appartiennent principalement à deux classes de composés : les N-acyléthanolamines (NAEs) et les 2-acylglycérols (2-AcGs), dont le N-arachidonoyléthanolamine (AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG) sont respectivement les principaux représentants, qui dérivent de l'acide arachidonique (AA) (Fezza et al. 2014). Le système endocannabinoïde est impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques comme la signalisation neuronale, la réponse au stress, les rythmes circadiens, la prise alimentaire ou encore la régulation du métabolisme et des réserves adipeuses (Vaughn et al. 2010a). L'implication du système endocannabinoïde (ECS) dans la régulation des rythmes circannuels est fortement suggéré par de nombreuses données (Vaughn et al. 2010a). L'ECS pourrait notamment intervenir dans la période de préparation à l'hibernation, lorsque les animaux constituent leurs réserves lipidiques, en favorisant une augmentation de la prise alimentaire; ainsi que durant l'hibernation, en contribuant

notamment au switch métabolique de la glycolyse vers l'oxydation des acides gras (Vaughn et al. 2010a).

Dans le sérum d'ours hibernant, plusieurs publications ont mis en évidence une augmentation des acides gras circulants et des triglycérides provenant de la lipolyse du tissu adipeux (Chazarin, Storey, et al. 2019; Ahlquist et al. 1984; Græsli et al. 2015). Il a également été mis en évidence qu'une modification importante dans les proportions des acides gras circulants avait lieu durant l'hibernation (Hissa et al. 1998). Les modifications quantitatives et qualitatives des acides gras circulant chez l'ours en hiver, pourraient (i) altérer la composition des membranes cellulaires, et (ii) modifier la synthèse de dérivés lipidiques tels que les eicosanoïdes et les endocannabinoïdes (eCBs). L'étude des changements du métabolisme des eicosanoïdes a déjà été publiée chez l'ours brun, en comparant les différences saisonnières (été et hiver), avec la conclusion que l'hibernation chez l'ours est associée avec une suppression générale dans la synthèse de ces composés (Giroud, Evans, et al. 2018). Des données concernant la composition tissulaire et/ou circulante en endocannabinoïdes (eCBs) ont déjà été publiées chez la marmotte (*Marmota monax et flaviventris*) et les écureuils (*Spermophilus richardsonii*) (Mulawa et al. 2018; Stewart et al. 2002; Vaughn et al. 2010a). La quantification des principaux endocannabinoïdes dans le sérum a été réalisée chez l'ours noir (*Ursus americanus*), néanmoins sans montrer de changements significatifs majeurs (sauf pour le 2-AG) dans les mesures effectuées à différents moments de l'année (Kirkwood et al. 2016).

Question(s) scientifique(s) :

Considérant les variations saisonnières importantes des lipides circulants, est-ce que ces changements sont capables d'impacter le système endocannabinoïde et la disponibilité de ses ligands ?

Parmi les variations saisonnières des composés circulants qui ont pu être identifiées, quelles hypothèses peuvent être formulées sur les possibles effets biologiques / physiologiques ?

Stratégie mise en oeuvre :

Dans le cadre de l'approche ciblée, et en tenant compte des données de la littérature, j'ai orienté mes investigations sur les changements saisonniers (été et hiver) des lipides et

endocannabinoïdes (eCBs) circulants chez *Ursus arctos*. La mesure des eCBs a également été mise en œuvre sur les 2 tissus disponible au laboratoire : le tissu adipeux et musculaire. La mesure de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse et le catabolisme de ces composés a également été réalisée dans les tissus mentionnés ci-dessus.

Article :

RESEARCH

Open Access



Specific shifts in the endocannabinoid system in hibernating brown bears

Christian Boyer¹, Laura Cussonneau¹, Charlotte Brun², Christiane Deval¹, Jean-Paul Pais de Barros³, Stéphanie Chanon⁴, Nathalie Bernoud-Hubac⁴, Patricia Daira⁴, Alina L. Evans⁵, Jon M. Arnemo^{5,6}, Jon E. Swenson⁷, Guillemette Gauquelin-Koch⁸, Chantal Simon⁴, Stéphane Blanc², Lydie Combaret¹, Fabrice Bertile^{2†} and Etienne Lefai^{1*†} 

Abstract

In small hibernators, global downregulation of the endocannabinoid system (ECS), which is involved in modulating neuronal signaling, feeding behavior, energy metabolism, and circannual rhythms, has been reported to possibly drive physiological adaptation to the hibernating state. In hibernating brown bears (*Ursus arctos*), we hypothesized that beyond an overall suppression of the ECS, seasonal shift in endocannabinoids compounds could be linked to bear's peculiar features that include hibernation without arousal episodes and capacity to react to external disturbance. We explored circulating lipids in serum and the ECS in plasma and metabolically active tissues in free-ranging subadult Scandinavian brown bears when both active and hibernating. In winter bear serum, in addition to a 2-fold increase in total fatty acid concentration, we found significant changes in relative proportions of circulating fatty acids, such as a 2-fold increase in docosahexaenoic acid C22:6 n-3 and a decrease in arachidonic acid C20:4 n-6. In adipose and muscle tissues of hibernating bears, we found significant lower concentrations of 2-arachidonoylglycerol (2-AG), a major ligand of cannabinoid receptors 1 (CB1) and 2 (CB2). Lower mRNA level for genes encoding CB1 and CB2 were also found in winter muscle and adipose tissue, respectively. The observed reduction in ECS tone may promote fatty acid mobilization from body fat stores, and favor carbohydrate metabolism in skeletal muscle of hibernating bears. Additionally, high circulating level of the endocannabinoid-like compound N-oleoylethanolamide (OEA) in winter could favor lipolysis and fatty acid oxidation in peripheral tissues. We also speculated on a role of OEA in the conservation of an anorexigenic signal and in the maintenance of torpor during hibernation, while sustaining the capacity of bears to sense stimuli from the environment.

Keywords: Hibernation, Brown bear, Metabolism, Lipidomic, Docosahexaenoic acid, Endocannabinoid system, Cannabinoid receptor 1, Cannabinoid receptor 2, 2-arachidonoylglycerol, Anandamide, N-oleoylethanolamide

Background

To deal with seasonal cold and food shortage during winter, hibernating mammals show a combination of behavioral and physiological changes. To save energy during hibernation, hibernating animals use periods of torpor characterized by decreased metabolic rate and body

temperature, reduction in respiratory and heart rates, and physical inactivity [1, 2]. Brown bears (*Ursus arctos*) exhibit unique features, as they hibernate at mild hypothermia (32–35 °C) and can stay inside their dens for up to 7 months, without drinking, eating, defecating or urinating, and with no arousal episodes [3–6]. While denning, they reduce their metabolic rate by about 75% [7], and rely primarily on mobilization of fat stores, which is reflected by increased circulating fatty acid concentration and body fat store depletion during winter [8–10].

* Correspondence: etienne.lefai@inrae.fr

†Fabrice Bertile and Etienne Lefai contributed equally to this work.

¹Université Clermont Auvergne, INRAE, UNH, Clermont-Ferrand, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Beyond energy substrates, lipids also have pleiotropic actions in the regulation of metabolism, and changes in membrane fatty acid composition have already been described in hibernating animals [11–14], including the brown bear [9]. Membrane phospholipids can also provide long-chain fatty acids for the synthesis of bioactive lipid mediators, such as endocannabinoids [15–17]. The endocannabinoid system (ECS) was originally described as being composed of G-protein coupled receptors (CB1 and CB2) and their endogenous ligands, of which the main ones are derived from arachidonic acid 20:4n-6 (AA) esterified into phospholipids, and called 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) and anandamide (AEA) [15–20]. These two well-characterized compounds clearly show varying affinity for CB1 and CB2 receptors. Indeed, AEA is considered as a high affinity CB1-partial agonist (and weak CB2 agonist), whereas 2-AG is described as a low-to-moderate affinity CB1 and CB2 full agonist [21, 22]. 2-AG and AEA belong to the large family of 2-acylglycerols (2-AcGs) and N-acylethanolamines (NAEs), respectively [17, 19]. N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D (NAPEPLD) and sn-1-specific diacylglycerol lipase- α and β (DAGLA and DAGLB) are the main enzymes involved in the biosynthesis of NAEs and 2-AcGs, respectively [17, 19]. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) is responsible for NAEs catabolism (and to a lesser extent for 2-AG) [23], and monoacylglycerol lipase (MGLL) specifically catabolizes 2-AcGs [17, 19]. eCBs can also be metabolized by lipoxygenases (LOXs) and by cyclooxygenase-2 (COX-2), an alternative pathway for eCBs catabolism [17].

The ECS includes structurally related compounds like N-oleylethanolamine (OEA), called «endocannabinoids-like compounds» (eCBs-like). The latter are metabolized by the same biosynthetic and catabolic enzymes as eCBs [17]. Although eCBs-like compounds are not able to bind to CB1 and CB2 receptors, they can bind to other G-protein coupled receptors (e.g. GPR119 and GPR55) or nuclear receptors, like peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARA) [17].

Endogenous cannabinoids are involved in the regulation of many physiological processes, including neuronal signaling [24], stress response [25], metabolism [25–27], feeding behavior and energy storage [25, 28]. Evidence supports the fact that the ECS could be involved in sleep cycles [29], circadian and potentially circannual rhythms [30]. At the central level (e.g. hypothalamus), CB1 is able to promote food intake and reduce energy expenditure [25, 31]. In addition, CB1 activation in adipose tissue leads to fatty acid and glucose uptake, and to upregulation of lipogenesis [25]. In liver, CB1 signaling leads to increased expression of genes involved in the synthesis of fatty acids [32], and in skeletal muscle tissue, CB1 activation triggers a decrease in glucose uptake and insulin sensitivity [25]. The CB2 receptor is well known to be widespread over immune cells and

to have numerous immunomodulatory roles [33]. CB2 has also been detected in metabolic tissues, like adipose tissue and skeletal muscle [34, 35] and CB2 pharmacological or genetic inactivation in murine obesity models promote insulin-mediated glucose uptake in skeletal muscles, reduce adipose tissue inflammation, and thus improves insulin sensitivity [36, 37]. Finally, the eCB-like OEA promotes lipolysis, fatty acid oxidation in skeletal muscle and liver, and triggers an anorexigenic signal, notably through the nuclear receptor PPARA [38, 39]. Considering the pleiotropic roles of ECS in neuronal signaling, regulation of feeding behavior, energy metabolism and circannual rhythms, important changes are expected during hibernation. Several ECS circulating compounds have been quantified in hibernating black bears, during and around the torpor phase [40], with no major changes observed except a slight increase in 2-AG in the period of metabolic drop before torpor. Although a decrease in ECS tone has been observed in hibernating marmots (*Marmota monax and flaviventris*) and ground squirrels (*Spermophilus richardsonii*) [30, 41, 42], we hypothesize that a similar decrease should occur in hibernating bears, not excluding specific changes due to their unique features during hibernation (mild hypothermia, no periodic arousal, and maintenance of alertness). Therefore, we explored here seasonal variations in fatty acid composition and ECS tone, in both circulating compartment and in muscle and adipose tissues, in winter-hibernating and summer-active brown bears.

Results

Seasonal differences in serum lipids

We explored the fatty acid (FA) composition of winter-hibernating (WBS) and summer-active (SBS) bear serum (see supplementary Table S1). From the lipidomic data, we compared both the summer and winter concentrations and proportions of fatty acids (see supplementary Table S2 and S3 for detailed lipidomic results). As shown in Fig. 1a, the total concentration of FAs was about twofold higher in WBS relative to SBS (28.82 ± 1.71 vs. 15.99 ± 1.09 mmol/L). All but two quantified lipid species were higher in concentration in hibernating bears, i.e. saturated fatty acids (SFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs), and n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Supplementary Table S2). Only concentrations of alpha-linolenic acid C18:3 n-3 (ALA) (0.49 -fold, non-significant) and eicosa-pentaenoic acid C20:5 n-3 (EPA) (0.26-fold) were lower in WBS (Supplementary Table S2).

Meanwhile, the molar percent of total n-6 species were found to be lower in WBS compared to SBS (Fig. 1b). Lipid species with the highest molar percent are presented in Fig. 1c (see Supplementary Table S3). Among SFAs, palmitic acid C16:0 (PA) was found in higher proportion, whereas stearic acid C18:0 (SA) was in lower proportion in winter serum. Similar proportions of oleic acid 18:1n-9 (OA),

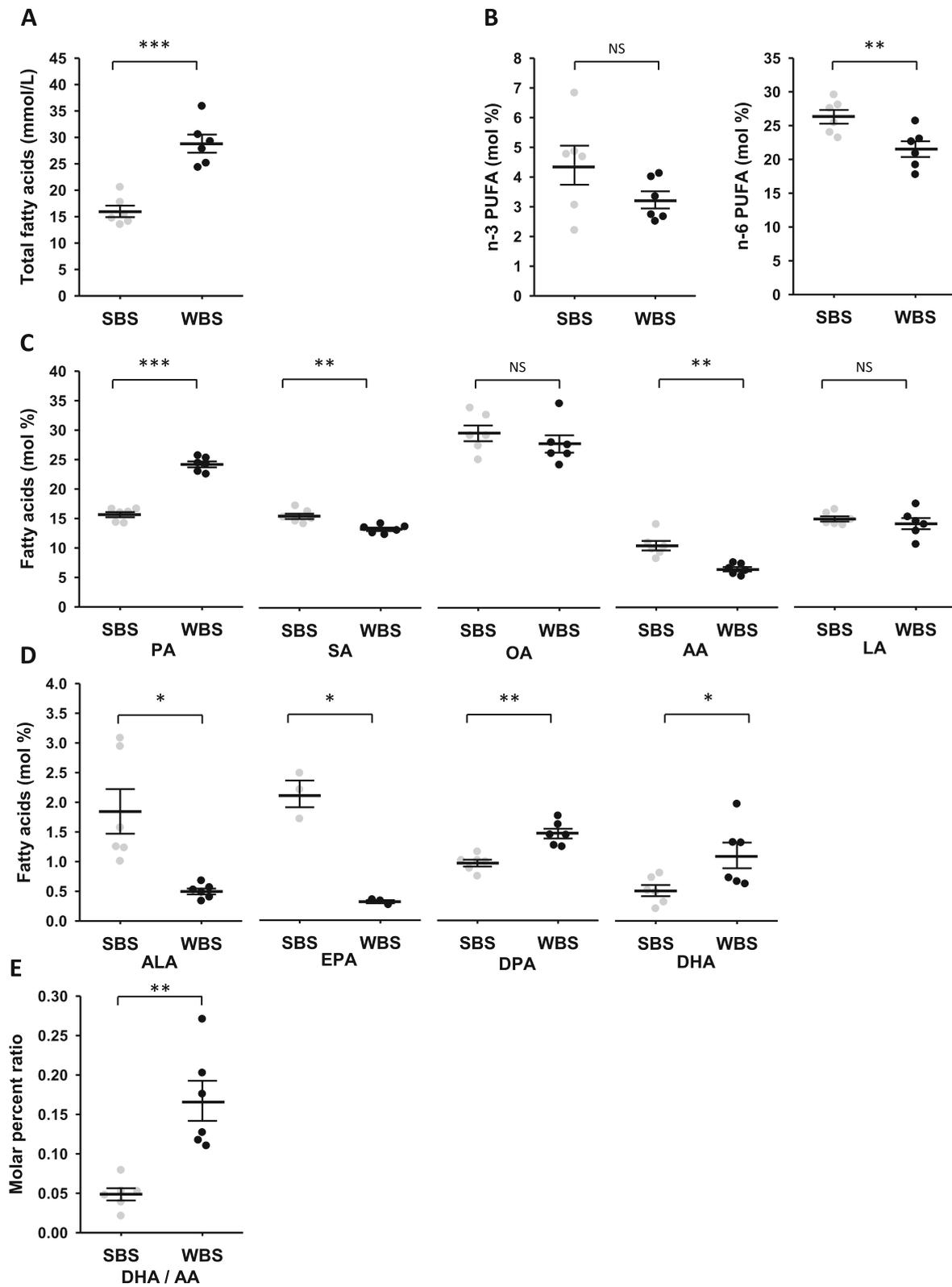


Fig. 1 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 1 Lipidomic from summer and winter brown bear serum. The winter and summer bear serum mixes were prepared as described (Supplementary Table S1). **a:** Total fatty acid (FA) concentration. **b:** Total n-6 and n-3 FA relative proportions of total lipids. **c:** Highest molar percent lipid species D: Molar percent of the n-3 family lipid species. **e:** Molar ratios of DHA/AA in summer and winter serum. Detailed lipidomic results are presented in Supplementary Tables S2 and S3. Data are expressed in mmol/L for total FAs concentration, or molar percentage of total lipids and are represented as mean \pm SEM of separate extractions and quantifications from the twelve mixes (six summer and six winter serum mixes, except for EPA with data from only three summer and three winter mixes). Paired Student t-test were used to compare wummer and winter data and Benjamini-Hochberg correction was applied for multiple comparisons. * indicates BH adjusted p value < 0.05 when comparing seasons, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$, NS: non significant. AA: arachidonic acid, ALA: alpha-linolenic acid, DHA: docosahexaenoic acid, DPA: docosapentaenoic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, LA: linoleic acid, OA: oleic acid, PA: palmitic acid, SA: stearic acid, SBS: summer bear serum, WBS: winter bear serum

belonging to the n-9 MUFAs, were found in winter and summer bear serum. Concerning n-6 PUFAs, the proportion of arachidonic acid C20:4 n-6 (AA) was lower during winter, whereas proportion of linoleic acid C18:2 n-6 (LA) remained unchanged (Fig. 1c). For individual species of the n-3 family (Fig. 1d and Supplementary Table S3), docosapentaenoic acid C22:5 n-3 (DPA, 1.5-fold) and docosahexaenoic acid C22:6 n-3 (DHA, 2.2-fold) were found in higher proportions.

The proportion of C20:5 n-3 (EPA) was found much lower (0.15-fold) in winter serum, as well as the alpha-linolenic acid C18:3 n-3 (ALA, 0.27-fold), a precursor of the EPA, DPA and DHA species.

From molar percent values, the DHA/AA ratio was 3.2-fold higher in winter (Fig. 1e).

Changes in plasma endocannabinoids and endocannabinoids-like compounds

We next assessed circulating eCBs and eCBs-like in bear plasma. Paired samples were collected in winter and in summer from eight bears (Supplementary Table S1) and quantification of AEA, 2-AG and OEA are presented in Fig. 2 and supplementary Table S5. Lower concentrations were observed for AEA (0.63-fold) in winter compared to summer, whereas the reverse was observed for OEA (3.3-fold). No difference was found for 2-AG plasma concentration.

Changes in endocannabinoid concentrations in muscle and adipose tissues

Quantification of endocannabinoids was then performed in bear muscle and adipose tissues. Paired tissues samples were collected from bears in winter and in summer (Supplementary Table S1) and quantification of AEA, 2-AG and OEA are presented in Fig. 3 and supplementary Table S5. AEA concentration was lower in both muscle and adipose tissues during winter versus summer, close to the statistical threshold ($p = 0.064$ and $p = 0.069$, respectively). 2-AG concentration was significantly lower in muscle and adipose tissues samples during winter, by about 1.6- and 9-fold, respectively. By contrast, no seasonal changes were found in OEA concentrations in both muscle and adipose tissues.

Changes in endocannabinoid pathway-related gene expressions in muscle and adipose tissues

To explore tissue metabolism of endocannabinoids, we quantified gene expression in muscle and adipose tissue of the eCBs membrane receptors CB1 and CB2, and several enzymes involved in the synthesis and catabolism of eCBs. For muscle tissue, paired samples were from 8 bears at the two time points, while for adipose tissue, data are coming from 5 bears in summer and 13 bears

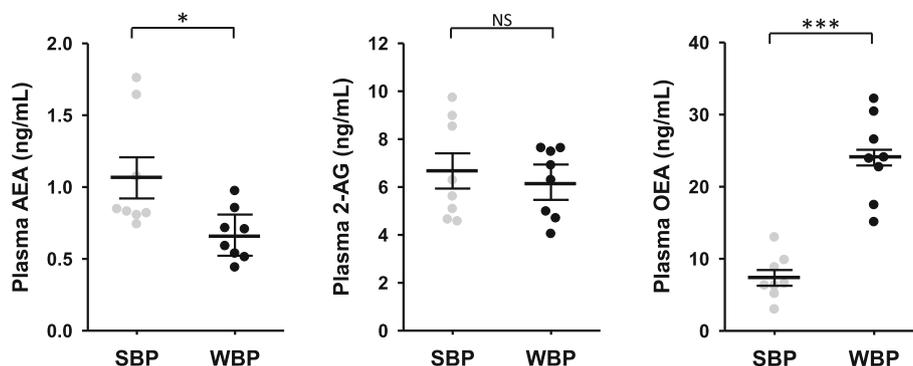
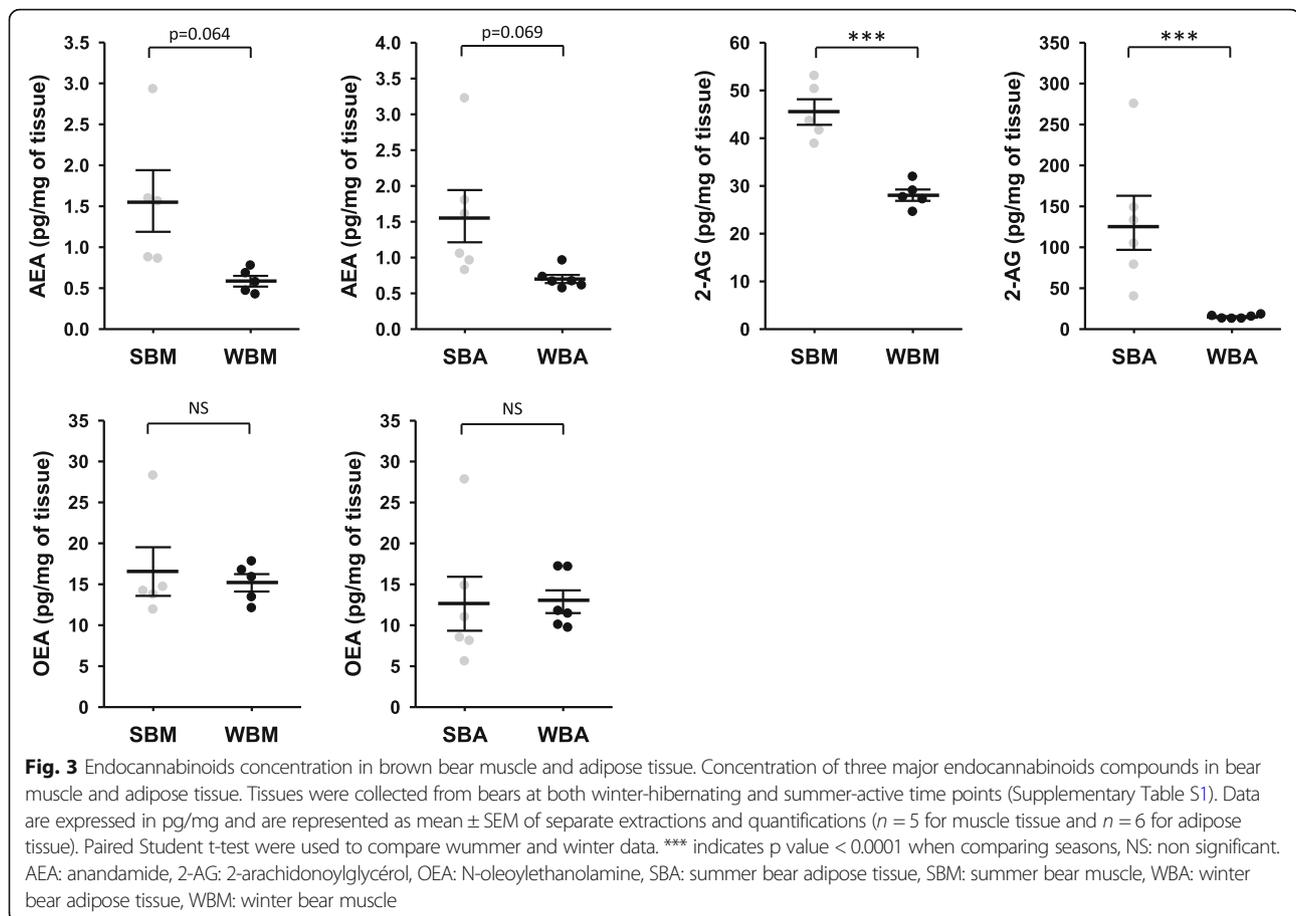


Fig. 2 Circulating endocannabinoids concentration in brown bear plasma. Concentration of three major endocannabinoids compounds in bear plasma. Plasma were collected from bears at both winter-hibernating and summer-active time points (Supplementary Table S1). Data are expressed in ng/mL and are represented as mean \pm SEM of separate extractions and quantifications ($n = 8$). Paired Student t-test were used to compare wummer and winter data. * indicates p value < 0.05 when comparing seasons, *** for $p < 0.001$, NS: non significant. AEA: anandamide, 2-AG: 2-arachidonoylglycérol, eCBs: endocannabinoids, OEA: N-oleoylethanolamine, SBP: summer bear plasma, WBP: winter bear plasma



in winter (Supplementary Table S1). Data are presented in Fig. 4 and Supplementary Table S5.

For genes that encode the membrane receptors CB1 and CB2 in muscle tissue, CNR1 mRNA level, but not CNR2, was decreased (0.63-fold) in winter (Fig. 4). Concerning enzymes that catabolize AEA and 2-AG, mRNA level of FAAH was induced (2.3-fold) in winter, but MGLL gene expression did not change. For genes encoding enzymes of the biosynthetic pathway, DAGLA mRNA level was strongly reduced in muscle tissue during winter (0.40-fold), whereas DAGLB mRNA level was increased (1.53-fold). Finally, gene expression of NAPEPLD did not change in muscle (Fig. 4).

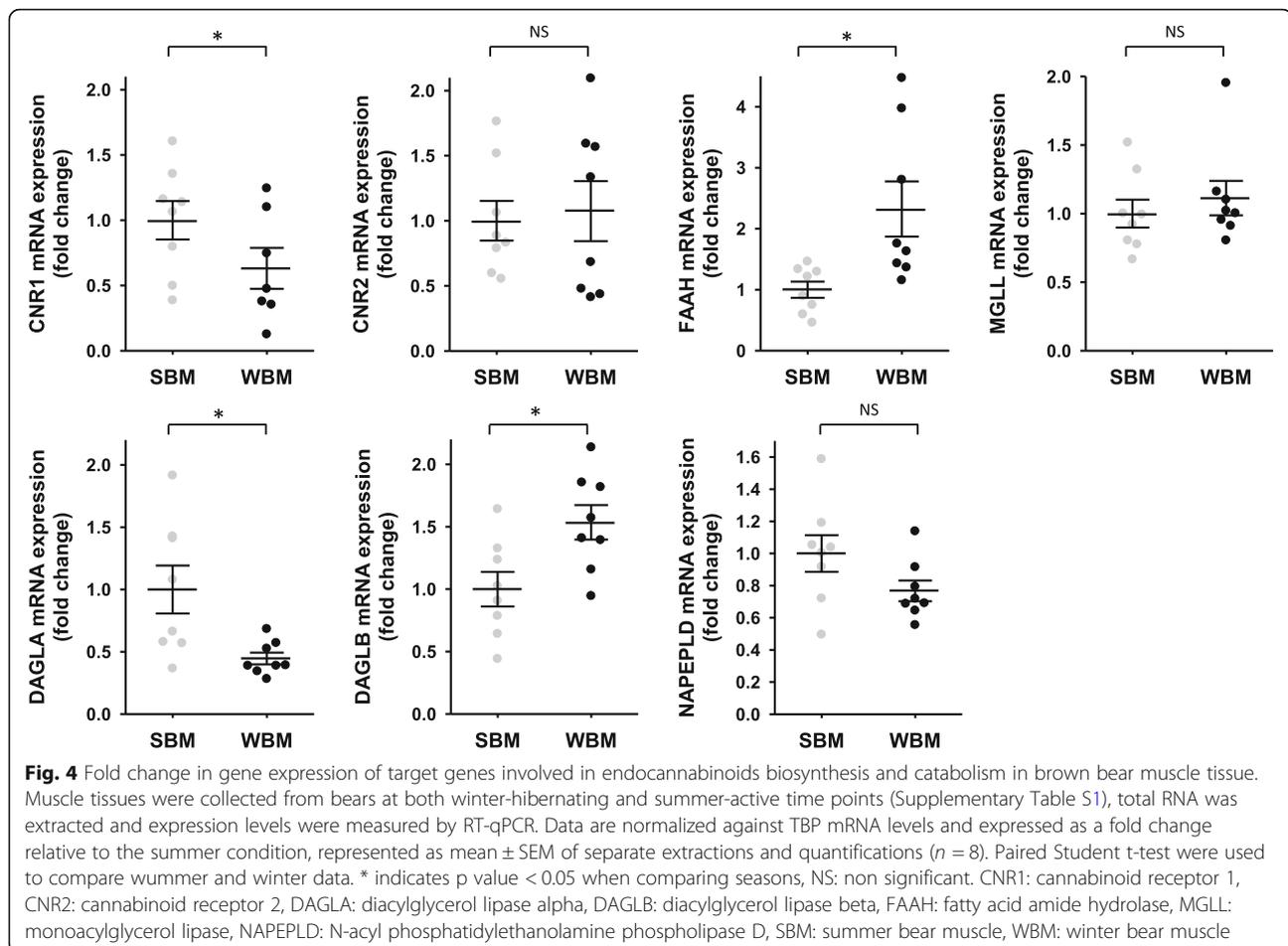
Conversely, in adipose tissue (Fig. 5), no significant changes in CNR1 gene expression were reported whereas CNR2 expression was strongly decreased in winter (0.42-fold). For gene expression of catabolic enzymes (FAAH and MGLL), did not change in adipose tissue between seasons. Finally, for genes encoding biosynthetic enzymes, mRNA levels of DAGLB and NAPELD were respectively found higher (1.44-fold) and lower (0.75-fold) in winter.

Discussion

Thanks to repeated capture sessions, we were able to gather samples of serum, plasma and tissues from high number of

free-living brown bears (*Ursus arctos*). From the 28 bears included in this study, samples were collected both in February during winter hibernation and in June during summer active period. Due to limited amount of available biological material, the analyses were performed on samples coming from different subsets of the 28 bears. In all but adipose tissue, analyses were performed on winter and summer paired samples (Supplementary Table S1). We examined circulating lipid and ECS compounds in both summer-active and winter-hibernating brown bears to explore the extent to which regulation of the ECS reflects bear hibernation peculiarities, including survival due to lipid oxidation, maintenance of muscle glycolysis, and maintained alertness during dormancy. The seasonal shift we highlighted in serum FAS composition, together with a decrease in tissue AEA and 2-AG, and a three-fold increase in circulating OEA during winter, could contribute to the behavioral and metabolic changes that occur in hibernating bears.

Hibernators experience extended periods of food shortage during hibernation and primarily rely on mobilization of fat stores from white adipose tissue [1]. Accordingly, we found that the concentration of total circulating fatty acids was elevated in hibernating bears, a finding in line with previous studies [5, 43]. Considering both the amount and

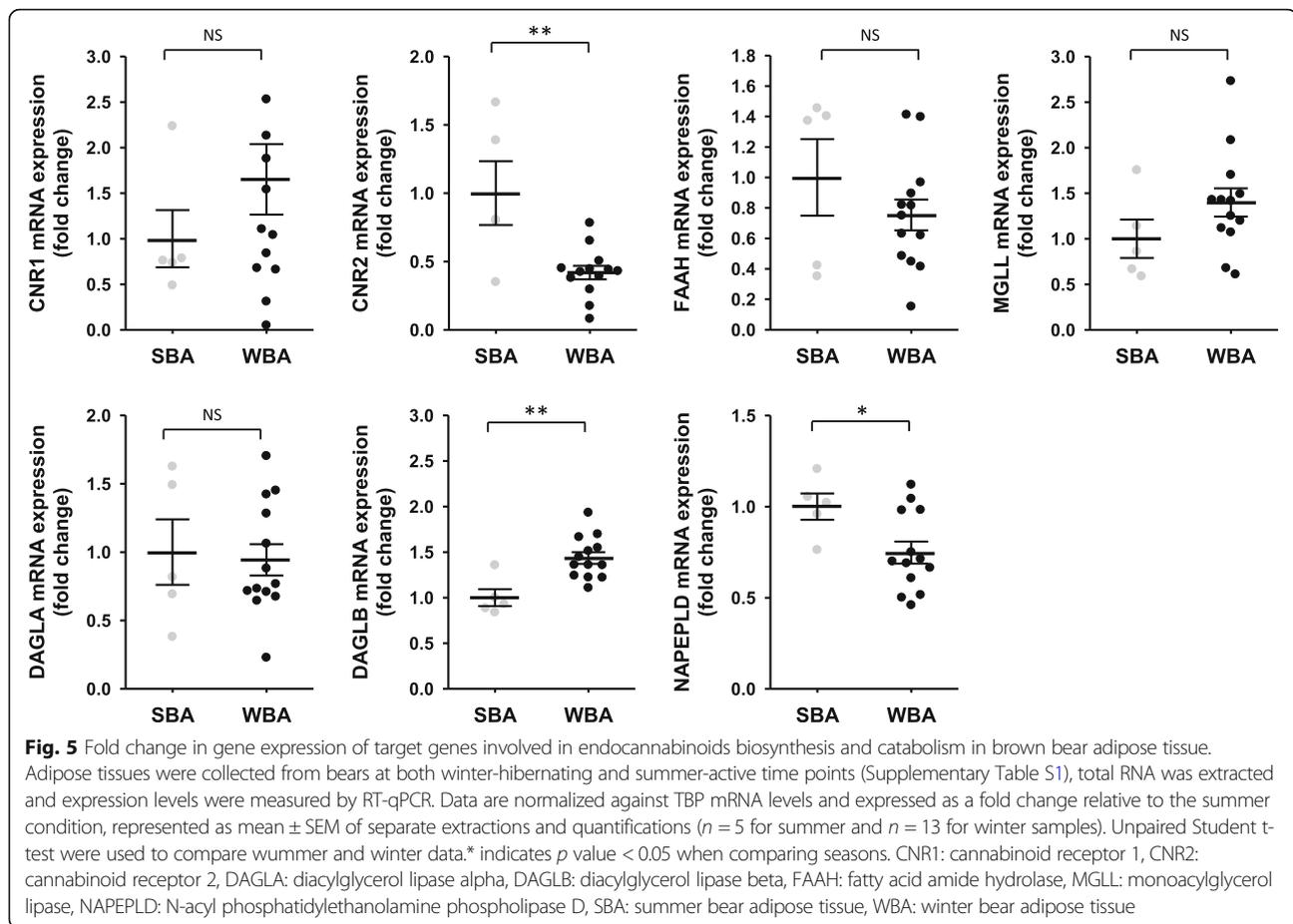


relative proportions of circulating lipids, our results are consistent with changes in serum and plasma lipid profiles during hibernation that have been previously published [5, 9, 10], notably an enrichment in DHA C22:6 n-3 and depletions in ALA C18:3 n-3 and EPA C20:5 n-3, during winter compared to summer. Whether the depletion in the ALA and EPA precursor species could be directly linked to the observed DHA increase remains to be elucidated.

Here, the DHA serum enrichment that we observed in hibernating bears is actually not coming from dietary FAs intake but rather due to lipid stores mobilization. The health benefits that have been attributed to n-3 PUFAs (e.g. DHA), essentially triggered by DHA dietary intervention studies, could potentially be transposed in the context of hibernation. Indeed, it has already been hypothesized that DHA could be involved in the bear's resistance to muscle atrophy during hibernation [10]. DHA appears to prevent muscle atrophy in fasting mice, and increases muscle glycogen stores [44]. Strikingly, in parallel to DHA serum enrichment, hibernating bears have more than a 3-fold higher glycogen muscle content compared to summer-active animals [10]. In addition to its anti-inflammatory effects, DHA

is also known to exert a positive effect on protein balance by decreasing expression of factors involved in protein breakdown [45] and enhancing protein synthesis, notably by promoting mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) activation [46].

Concomitantly to serum DHA enrichment, we observed a drop in AA proportion, thus leading to a sharp increase in the DHA/AA ratio. Omega-3/omega-6 ratio is known to have an impact on global health [47], and the balance of this ratio could also impact the endocannabinoid system [48], notably because AA is a precursor of the two main eCBs 2-AG and AEA. Indeed, n-6 PUFAs-enriched diets have been shown to increase the level of 2-AG or AEA in the brain, plasma, and peripheral tissues in non-hibernating animal models [49–52]. It is noteworthy to mention that, in response to DHA supplementation, an enrichment of this fatty acid in phospholipids of cell membranes occurs in parallel with a decrease in AA content [38, 49, 53, 54]. By remodeling the amount of AA-containing phospholipids, DHA is able to reduce the synthesis of AEA and 2-AG [49, 54]. Further studies on bears, focusing on fatty acid membrane composition in tissues at different time points, will be helpful to characterize the



remodeling of membrane lipids that could affect the availability of FAs precursors for eCBs biosynthesis. Data on eCBs compounds from experimental short fasting in non-hibernating mammals are very divergent, depending on the tissue considered (e.g. brain or peripheral tissues) and the duration of food deprivation, but tissue levels of eCBs are mainly regulated by the availability of their membrane phospholipid precursors and by the activity of biosynthetic and catabolic enzymes [28, 49, 55, 56].

We hypothesized that drastic reduction in metabolic activity, lack of intake of dietary PUFAs, significant increase in the serum DHA/AA ratio, and perhaps reduction in tissue AA-phospholipids concentration, could lead to a global reduction in ECS tone during the hibernation period. The reduction in ECS tone has already been documented in hibernating marmots [30, 41], but not confirmed in large-bodied hibernators.

Comparing active and hibernation states in brown bears, we reported here a decrease in plasma concentration of AEA, and an unexpected 3-fold increase in OEA circulating levels in hibernating bears. In both muscle and adipose tissues, 2-AG and AEA (close to statistical threshold) were found lower in winter, while OEA did not change. Quantification of winter serum eCBs was

previously reported in black bears during and around the topor phase, but summer active bears were not investigated [40]. Nutritional status of the captured animals and diet were not specified. These elements strongly limit comparison between the two studies.

Taken together, our data allowed us to make several hypotheses about possible mechanisms by which ECS could contribute to the metabolic and behavioral changes that occur in bears during hibernation. First, considering that AEA and 2-AG CB1 agonists favor food intake and stimulate lipogenesis [25], CB1 signaling is expected to be upregulated during the active summer period in order to promote energy storage, and downregulated during winter hibernation to stimulate lipolysis and FAs oxidation. The tissue concentration drops in 2-AG and AEA observed during winter could be due to a decrease in tissue AA-phospholipids concentration, as we hypothesized above. The degradation of AEA could also be increased in muscle tissue during hibernation, as reflected in the higher mRNA levels of FAAH, the main hydrolase that degrades AEA [19, 23]. In adipose tissue, lower NAPEPLD mRNA level content during hibernation may support a decrease in AEA synthesis, and ultimately content. The tissue content in 2-AG is decreased in winter with no changes in mRNA levels

of the catabolic enzyme MGLL. Furthermore, opposite changes in DAGLA and DAGLB gene expression do not allow to speculate on the biosynthetic/degradation balance. One limitation of our study is that gene expression could not reflect biological activity. Moreover, we only focused on main biosynthetic and catabolic enzymes involved in eCBs metabolism, and investigation on alternative degradation route as endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases and lipoxygenases would bring new insights.

During hibernation, lower 2-AG (and AEA close to statistical threshold) tissue content and the reduction of CNR1 and CNR2 mRNA levels in muscle and adipose tissue, respectively, strongly support reduced ECS tone in both tissues. In non-hibernating mammals, pharmacological inhibition of CB1 leads to a decrease in PDK4 expression [25, 57]. PDK4 is a major negative regulator of PDH activity, that in turn regulates the whole body oxidative carbohydrate metabolism. In hibernating bear muscle, recent studies have shown that PDK4 is upregulated compared to summer active state [10, 58] and expression of PDK4 during hibernation appear thus to be disconnected from direct regulation by CB1. CB1 receptor antagonism also leads to an increased uptake of glucose in muscle via PI3K signaling [59], and glycolysis appears preserved in bear skeletal muscle during hibernation, as suggested by an overall increase in the protein abundance of all glycolytic enzymes [10]. As proposed by Chazarin et al. and Vella et al., bears still oxidize glucose and produce lactate in skeletal muscle during hibernation [10, 60].

Overactivation of the ECS is a hallmark of obesity [61, 62], and 2-AG is predominantly found in higher concentration in tissues of obese people [61, 63]. Interestingly, in murine models of obesity, gain of adipose tissue often leads to increased fat inflammation [36, 37]. Genetic or pharmacological inactivation of CB2 receptor contribute to reduce adipose tissue inflammation, increase insulin sensitivity and skeletal muscle glucose uptake [36, 37]. Strikingly, insulin resistance has been described in hibernating bears adipocytes [64]. As bears don't experience health consequences of circannual high body fat storage [65], a reduced CB2 signaling in adipose tissue could dampen adipose tissue inflammation. Lower amounts of 2-AG and AEA could also reduced CB1 signaling in adipose tissue, thus limiting lipogenesis and promoting lipolysis during hibernation in bears, as also suggested for hibernating marmots [30].

OEA is a high-affinity agonist for peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARA), regulating food intake and stimulating fat catabolism [38, 39, 53, 66, 67]. The eCB-like OEA is generally synthesized in response to dietary oleic acid intake by enterocytes of the small intestine [49, 54], and inhibits food intake. It has already been shown in rodents that food deprivation inhibits OEA synthesis in the small intestine, but stimulates its synthesis in

liver [38, 53, 68, 69]. Therefore, during bear hibernation, circulating OEA could originate from tissue synthesis (probably hepatic) and be released in the blood flow. The high OEA level that we found in hibernating bears, not triggered by food intake, could participate in a sustained anorexigenic signal during the hibernation state.

Consequences of high levels of circulating OEA have been studied in non-hibernating rodents. Intraperitoneal OEA administration in rats notably impairs locomotor activity, which is supported by a decrease in ambulation, an increase of the time spent in inactivity, and the presence of signs of catalepsy [66, 70]. We thus can hypothesize that a higher amount of plasma OEA during bear hibernation can participate in the maintenance of prolonged physical inactivity. It has also been shown that intracerebroventricular injections of OEA promote alertness, with the observation of enhanced dopamine and c-Fos expressions in wake-related brain areas [71]. Bears are known to stay sensitive to disturbance during hibernation [72–74]. High circulating amounts of OEA might thus participate in alertness to external stimuli from the environment in hibernating bears. OEA during winter possibly also favors body fat mobilization for energy needs, with stimulation of FA and glycerol release from adipocytes [38, 39]. Finally, a potential role for OEA in the promotion of fasting-induced ketogenesis during hibernation could also be considered, as OEA has been demonstrated to increase 3-hydroxybutyrate production in in vivo rodent models [38, 39].

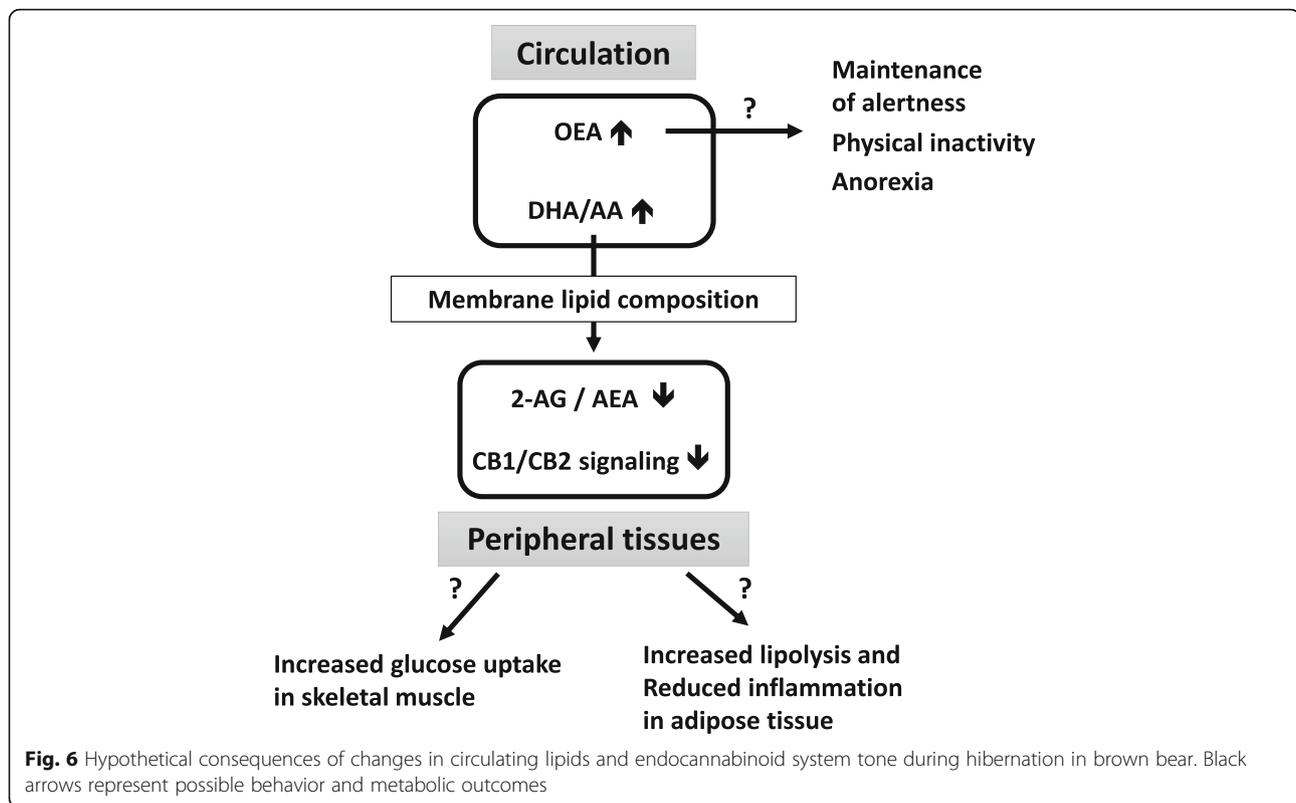
Conclusions

In conclusion, our results show a reduction in ECS tone in hibernating bears and suggest a coordinated downregulation of CB1 and CB2 signaling in skeletal muscle and adipose tissue. As summarized in Fig. 6, these features could favor energy mobilization through lipolysis, and optimization of glucose uptake by skeletal muscles. Despite high fat stores in winter, bears do not exhibit features of ECS overactivation, and decrease in CB2 signaling could dampen adipose tissue inflammation. The observed increase in circulating OEA level may participate in the behavioral and physiological adaptations during bear hibernation state, like maintenance of an anorexigenic signaling pathway, and promotion of lipolysis and fatty acid β -oxidation. We also speculated about OEA involvement in torpor maintenance and in motor activity reduction, as well as a role in conservation of alertness at the level of central nervous system.

Methods

Bear sample collection

A total of 28 free ranging subadult brown bears (*Ursus arctos*) from Dalarna and Gävleborg counties, Sweden, were included in this study, including 4 bears captured two consecutive years. All samples and data were collected



under protocols approved by the Swedish Ethical Committee on Animal Experiment (applications Dnr C3/2016 and Dnr C18/2015), the Swedish Environmental Protection Agency (NV-00741-18), and the Swedish Board of Agriculture (Dnr 5.2.18–3060/17). All procedures complied with Swedish laws and regulations.

As described previously [10, 75], blood, subcutaneous adipose tissue, and muscle tissue (vastus lateralis) samples were collected at two time points, in February during winter hibernation (W) and in June during summer-active period (S). Blood samples were collected from the jugular vein into 8 ml dry tubes for serum (Vacuette® Z serum Sep Clot Activator, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria) or into 10 ml EDTA-coated tubes (BD Vacutainer®, FisherScientific, Illkirch, France) for plasma.

The analyses were performed on samples coming from different subsets of bears as described in Supplementary Table S1.

Lipid extraction and analysis

To perform serum lipidomic analysis, serum mixes were prepared as followed: for a given year, 50 µl of summer serum from each bear of the year was pooled to obtain the summer mix. In parallel, 50 µl of winter serum from the same bears was pooled to obtain the winter mix. A total of 6 summer and winter paired mixes were obtained (Supplementary Table S1). Lipids were extracted and analyzed

as previously described [76]. After addition of an internal standard (tri-17:0 triacylglycerol), total lipids were extracted twice from bear serum mixes with ethanol/chloroform (1:2, v/v). The organic phases were dried under nitrogen and lipids were transmethylated. Briefly, samples were treated with toluene-methanol (1:1, v/v) and boron trifluoride in methanol (14%). Transmethylation was carried out at 100 °C for 90 min in screw-capped tubes. Then 1.5 mL K₂CO₃ in 10% water was added and the resulting fatty acid methyl esters were extracted by 2 mL of isooctane and analyzed by gas chromatography (GC) with a HP6890 instrument equipped with a fused silica capillary BPX70 SGE column (60 × 0.25 mm). The vector gas was hydrogen. Temperatures of the Ross injector and the flame ionization detector were set to 230 °C and 250 °C, respectively. Data were expressed in mmol/L for total or individual fatty acids (FAs) concentration or molar percentage of total lipids for individual FAs. Detailed lipidomic results are presented in supplementary Table S2 (serum fatty acid concentrations) and S3 (serum fatty acid relative proportions).

Endocannabinoid quantification

For quantification of circulating endocannabinoids, analysis was performed on 500 µl of plasma collected at the two time points (S and W) from 8 individual animals (see supplementary Table S1). Standard endocannabinoids

(eCBs), i.e.- PEA, PEA-d5, OEA, OEA-d4, AEA, AEA-d4, 2AG, and 2AG-d5, were purchased from Cayman (Bertin BioReagent, Saint-Quentin en Yvelines, France). Mass spectrometry quality grade solvents were purchased from Fischer Scientific (Illkirch, France). Tissue samples (adipose and muscle tissues); c.a 100 mg) were crushed in an Omni Bead Ruptor 24 apparatus (Omni International, Kennesaw, USA) with circa twenty 1.4 mm OD zirconium oxide beads ($S = 6.95$ m/s, $T = 30$ s, $C = 3$; $D = 10$ s) and 900 μ l of methanol/Tris-buffer (50 mM, pH = 8) 1/1 containing 20 ng of PEA-d5, 2 ng OEA-d4, 10 ng AEA-d4, and 20 ng 2AG-d5. Then, each homogenate was added with 2 mL of $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) and 500 μ L of Tris (50 mM, pH = 8), vortexed and centrifuged 10 min at 3000 g. The organic layer was recovered and the upper aqueous phase was extracted twice with chloroform (1 mL). Finally, organic phases were pooled and evaporated under vacuum.

Plasma (500 μ L) were mixed with 500 μ L cold methanol containing 11 ng AEA. After protein precipitation at -20°C for 2 h, endocannabinoids were extracted with methanol/chloroform (1:1, v/v) (5 ml) and saline (1.25 mL). The organic phase was recovered and the aqueous phase was extracted twice with chloroform (3 mL). Organic phases were finally pooled and evaporated under vacuum.

Dried extracts were solubilized with methanol (200 μ L) and centrifuged for 5 min at 20,000 g. Four microliters of the supernatant were injected into a 1200 LC system coupled to a 6460-QqQ MS/MS system equipped with an ESI source (Agilent technologies). Separation was achieved on Zorbax SB-C18 2.1×50 mm, 1.8 μ m column (Agilent technologies) at a flow rate of 0.4 mL/min, 40°C , with a linear gradient of (solvent A) water containing 0.1% formic acid and (solvent B) methanol containing 0.1% formic acid as follows: 10% of B for 1 min, up to 85% of B in 8 min, and then 100% B for 4.5 min. Acquisition was performed in positive Selected Reaction Monitoring (SRM) mode (source temperature: 350°C , nebulizer gas flow rate: 10 L/min, 40 psi, sheath gas flow 10 L/min, sheath gas temperature 350°C , capillary 4000 V, nozzle 1000 V).

Transitions used were: 2AG-d5 384.3 \rightarrow 91.1 (frag 120 V, CE 62 V), 2AG 379.1 \rightarrow 91 (frag 120 V, CE 62 V), AEA-d4 352.2 \rightarrow 66.1 (frag 115 V, CE 14 V), AEA 348.2 \rightarrow 62 (frag 120 V, CE 14 V), OEA-d4 330.2 \rightarrow 66.1 (frag 120 V, CE 14 V), OEA 326.2 \rightarrow 62 (frag 115 V, CE 14 V), PEA-d5 305.2 \rightarrow 62 (frag 124 V, CE 14 V), and PEA 300.2 \rightarrow 62 (frag 124 V, CE 14 V).

Endocannabinoids quantification in tissues was performed on tissue samples collected at the two time points (S and W) from 5 (muscle tissue) and 6 (adipose tissue) bears (Supplementary Table S1). eCBs from tissues were quantitated according to the isotope dilution method. Results are expressed as pg per mg of wet weight of tissue. eCBs from plasma were quantitated using calibration curves obtained with authentic standards extracted by the

same method used for plasma samples. Linear regression was applied for calculations. Results are expressed as ng of endocannabinoid per mL of plasma.

Quantification of mRNAs by real-time RT-PCR

For mRNA quantification using RT-qPCR, total RNAs were obtained from muscle and adipose tissues collected at the two time points (S and W). For the muscle tissue, RNAs were extracted from 8 bears in summer and winter, while for adipose tissue, RNAs were extracted from 5 bears in summer and 13 bears in winter (Supplementary Table S1).

Muscle and adipose tissue total RNA was isolated using the TRIzol reagent (Invitrogen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNAs were synthesized from 1 μ g of total RNA using the PrimeScript RT kit (Ozyme, saint Quentin en Yveline, France) with a mixture of random hexamers and oligo(dT) primers, and treated with 60 units of RnaseH (Ozyme). Real-time PCR assays were performed with Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Courtaboeuf, France). The primers and real-time PCR assay conditions are listed in supplementary Table S4. The results were normalized by using TBP (TATA box binding protein) mRNA concentration, measured as reference gene in each sample.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the R software environment v3.0.2 [77]. For each set of values, distribution of the data was tested using the Shapiro-Wilk normality test, and using the $p = 0.01$ threshold normal distribution was considered in all cases. Differences between summer and winter data were tested using paired Student t-test for lipidomic, endocannabinoid quantification in plasma and tissues, and mRNA level in muscle tissue. For mRNA level in adipose tissue, differences between summer and winter data were tested using unpaired Student t-test. For multiple comparison (lipidomic data), the Benjamini-Hochberg correction using the p.adjust function (Package *stats* version 4.0.0 of R studio) was applied. Data are presented as means \pm SEM and individual values are plotted as grey and black dots for respectively summer and winter values. Means, SEM, fold change and associated p -values are reported in supplementary Tables S2 to S5. Statistical significance was considered with p values or adjusted p values lower than 0.05.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12983-020-00380-y>.

Additional file 1 Table S1. Characteristics of brown bears included in the study. **Table S2.** Serum fatty acid concentrations (mmol/L) in winter hibernating (WBS) and summer active (SBS) bears. **Table S3.** Serum fatty acid relative proportions (mol %) in winter hibernating (WBS) and summer active (SBS) bears. **Table S4.** List of primers used for RT-qPCR.

Table S5: Endocannabinoids (eCBs) and mRNA quantification in plasma and tissues in winter hibernating (W) and summer active (S) bears.**Abbreviations**

AA: Arachidonic acid; 2-AcG: 2-acylglycerol; AEA: Anandamide; 2-AG: 2-arachidonoylglycerol; ALA: Alpha-linolenic acid; AMPK: AMP-activated protein kinase; CNR1: Cannabinoid receptor 1 (gene); CB1: Cannabinoid receptor 1; CNR2: Cannabinoid receptor 2 (gene); CB2: Cannabinoid receptor 2; DAGLA: Diacylglycerol lipase α ; DAGLB: Diacylglycerol lipase β ; DPA: Docosapentaenoic acid; DHA: Docosahexaenoic acid; eCB: Endocannabinoid; eCB-like: Endocannabinoid-like compound; ECS: Endocannabinoid system; EPA: Eicosapentaenoic acid; FA: Fatty acid; FAAH: Fatty acid amide hydrolase; GPR55: G protein-coupled receptor 55; GPR119: G protein-coupled receptor 119; LA: Linoleic acid; MGLL: Monoacylglycerol lipase; mTOR: Mammalian target of rapamycin; MUFA: Monounsaturated fatty acid; NAE: N-acyl-phosphatidylethanolamine; NAPEPLD: N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D; OA: Oleic acid; OEA: N-oleoylethanolamide; PA: Palmitic acid; PDH: Pyruvate dehydrogenase; PDK4: Pyruvate dehydrogenase kinase 4; PPARA: Peroxisome proliferator-activated receptor α ; PUFA: Polyunsaturated fatty acid; SA: Stearic acid; SBA: Summer bear adipose tissue; SBM: Summer bear muscle; SBP: Summer bear plasma; SBS: Summer bear serum; SFA: Saturated fatty acid; WBA: Winter bear adipose tissue; WBM: Winter bear muscle; WBP: Winter bear plasma; WBS: Winter bear serum

Acknowledgments

The authors wish to thank the field capture team (D Ahlqvist, A Friebe, H Nordin, H Blomgren, S Persson), and are grateful to Hélène Choubley and Victoria Bergas from the lipidomic platform of the university of Bourgogne-Franche-Comt e for their valuable technical assistance. This is scientific paper no. 296 from the SBBRP.

Authors' contributions

EL, and FB conceived the study; CBo, CBr, LCu, CD, JPB, IC, NBH, PD, AE, JMA, SB, EL, and FB performed the experiments and analyzed the data; CBr, FB and EL wrote the original draft; LCo, GG-K, CS, JS, FB, and EL reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the French Space Agency (CNES), iSITE Challenge 3 Mobility program (UCA), CNRS and Strasbourg University (H2E project; MyoBears project of the PEPS ExoMod program), French Proteomic Infrastructure (ProFI; ANR-10-INBS-08-03, and MetaHUB (French infrastructure in metabolomics & fluxomics; ANR-11-INBS-0010). CBo was supported by a grant from the MESRI, LCu by grants from the INRAE and Clermont M etropole and CBr by a grant from French space agency (CNES). The long-term funding of Scandinavian Brown Bear Research Project (SBBRP) has come primarily from the Swedish Environmental Protection Agency, the Norwegian Environment Agency, the Austrian Science Fund, and the Swedish Association for Hunting and Wildlife Management.

Availability of data and materials

The datasets generated during and/or analyzed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval

All samples and data were collected under protocols approved by the Swedish Ethical Committee on Animal Experiment (applications Dnr C3/2016 and Dnr C18/2015), the Swedish Environmental Protection Agency (NV-00741-18), and the Swedish Board of Agriculture (Dnr 5.2.18-3060/17). All procedures complied with Swedish laws and regulations.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

¹Universit e Clermont Auvergne, INRAE, UNH, Clermont-Ferrand, France.

²Universit e de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, Strasbourg, France.

³Plateforme de Lipidomique, INSERM UMR1231, Université de Bourgogne, Dijon, France. ⁴Universit e de Lyon, INSERM, INRAE, INSA, Functional Lipidomic

Platform, Lyon, France. ⁵Department of Forestry and Wildlife Management, Inland Norway University of Applied Sciences, Campus Evenstad, NO-2480 Koppang, Norway. ⁶Department of Wildlife, Fish, and Environmental Studies, Swedish University of Agricultural Sciences, SE-901 83 Umeå, Sweden. ⁷Faculty of Environmental Sciences and Natural Resource Management, Norwegian University of Life Sciences, NO-1432  s, Norway. ⁸Centre National d'Etudes Spatiales, CNES, F-75001 Paris, France.

Received: 16 May 2020 Accepted: 20 October 2020

Published online: 23 November 2020

References

- Carey HV, Andrews MT, Martin SL. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev.* 2003;83:1153–81.
- Geiser F. Hibernation. *Curr Biol.* 2013;23:R188–93.
- Folk GE, Hunt JM, Folk MA. Further evidence for hibernation of bears. *Bears Their Biol Manag.* 1980;4:43.
- Hellgren EC. Physiology of hibernation in bears. *Ursus.* 1998;10:467–77.
- Hissa R, Hohtola E, Tuomala-Saramaki T, Laine T, Kallio H. Seasonal changes in fatty acids and leptin contents in the plasma of the European brown bear (*Ursus arctos arctos*). *Ann Zool Fenn.* 1998;35:215–24.
- Manchi S, Swenson JE. Denning behaviour of Scandinavian brown bears *Ursus arctos*. *Wildl Biol.* 2005;11:123–32.
- Toien O, Blake J, Edgar DM, Grahn DA, Heller HC, Barnes BM. Hibernation in black bears: independence of metabolic suppression from body temperature. *Science.* 2011;331:906–9.
- LeBlanc PJ, Obbard M, Battersby BJ, Felskie AK, Brown L, Wright PA, et al. Correlations of plasma lipid metabolites with hibernation and lactation in wild black bears *Ursus americanus*. *J Comp Physiol B.* 2001;171:327–34.
- Giroud S, Chery I, Bertile F, Bertrand-Michel J, Tascher G, Gauquelin-Koch G, et al. Lipidomics reveal seasonal shifts in large-bodied hibernator, the brown bear. *Front Physiol.* 2019;10:389.
- Chazarin B, Storey KB, Ziemianin A, Chanon S, Plumel M, Chery I, et al. Metabolic reprogramming involving glycolysis in the hibernating brown bear skeletal muscle. *Front Zool.* 2019;16:12.
- Aloia RC, Raison JK. Membrane function in mammalian hibernation. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Biomembr.* 1989;988:123–46.
- Munro D, Thomas DW. The role of polyunsaturated fatty acids in the expression of torpor by mammals: a review. *Zool Jena.* 2004;107:29–48.
- Ruf T, Arnold W. Effects of polyunsaturated fatty acids on hibernation and torpor: a review and hypothesis. *Am J Physiol-Regul Integr comp Physiol.* American Physiological Society. 2008;294:R1044–52.
- Arnold W, Ruf T, Frey-Roos F, Bruns U. Diet-Independent Remodeling of Cellular Membranes Precedes Seasonally Changing Body Temperature in a Hibernator. *PLOS ONE. Public Libr Sci.* 2011;6:e18641.
- Battista N, Di Tommaso M, Bari M, Maccarrone M. The endocannabinoid system: an overview. *Front Behav Neurosci.* 2012;14:6–9.
- De Petrocellis L, Di Marzo V. An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23:1–15.
- Fezza F, Bari M, Florio R, Talamonti E, Feole M, Maccarrone M. Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Mol Basel Switz.* 2014;19:17078–106.
- Aizpurua-Olaizola O, Elezgarai I, Rico-Barrio I, Zarandona I, Etxebarria N, Usobiaga A. Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies. *Drug Discov Today.* 2017;22:105–10.
- Di Marzo V. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17:623–39.
- Ligresti A, Petrosino S, Di Marzo V. From endocannabinoid profiling to 'endocannabinoid therapeutics'. *Curr Opin Chem Biol.* 2009;13:321–331.
- Zou S, Kumar U. Cannabinoid receptors and the Endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. *Int J Mol Sci.* 2018;19:833.
- Di Marzo V, De Petrocellis L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2012;367:3216–28.
- Di Marzo V, Maccarrone M. FAAH and anandamide: is 2-AG really the odd one out? *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29:229–33.
- Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science.* 2002;296:678–82.
- Piazza PV, Cota D, Marsicano G. The CB1 receptor as the cornerstone of exostasis. *Neuron.* 2017;93:1252–74.

26. Shrestha N, Cuffe JSM, Hutchinson DS, Headrick JP, Perkins AV, McAinch AJ, et al. Peripheral modulation of the endocannabinoid system in metabolic disease. *Drug Discov Today*. 2018;23:592–604.
27. Silvestri C, Di Marzo V. The Endocannabinoid system in energy homeostasis and the Etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab*. 2013;17:475–90.
28. Matias I, Bisogno T, Marzo VD. Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. *Int J Obes Nature Publishing Group*. 2006;30:57–12.
29. Prospéro-García O, Amancio-Belmont O, Becerril Meléndez AL, Ruiz-Contreras AE, Méndez-Díaz M. Endocannabinoids and sleep. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;71:671–9.
30. Vaughn LK, Denning G, Stuhr KL, de Wit H, Hill MN, Hillard CJ. Endocannabinoid signalling: has it got rhythm? *Br J Pharmacol*. 2010;160:530–43.
31. Cardinal P, Bellocchio L, Clark S, Cannich A, Klugmann M, Lutz B, et al. Hypothalamic CB1 cannabinoid receptors regulate energy balance in mice. *Endocrinology*. 2012;153:4136–43.
32. Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pachec P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 2005;115:1298–305.
33. Turcotte C, Blanchet M-R, Laviolette M, Flamand N. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73:4449–70.
34. Cavuoto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Janovská A, Game P, Wittert GA. The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;364:105–10.
35. Starowicz KM, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izzo AA, et al. Endocannabinoid Dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity*. 2008;16:553–65.
36. Agudo J, Martin M, Roca C, Molas M, Bura AS, Zimmer A, et al. Deficiency of CB2 cannabinoid receptor in mice improves insulin sensitivity but increases food intake and obesity with age. *Diabetologia*. 2010;53:2629–40.
37. Deveaux V, Cadoudal T, Ichigotani Y, Teixeira-Clerc F, Louvet A, Manin S, et al. Cannabinoid CB2 Receptor Potentiates Obesity-Associated Inflammation, Insulin Resistance and Hepatic Steatosis. *PLOS ONE*. *Public Libr Sci*. 2009;4:e5844.
38. Bowen KJ, Kris-Etherton PM, Shearer GC, West SG, Reddivari L, Jones PJH. Oleic acid-derived oleoylethanolamide: a nutritional science perspective. *Prog Lipid Res*. 2017;67:1–15.
39. Guzmán M, Verme JL, Fu J, Oveisi F, Blázquez C, Piomelli D. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR- α). *J Biol Chem*. 2004;279:27849–54.
40. Kirkwood JS, Broeckling CD, Donahue S, Prenni JE. A novel microflow LC-MS method for the quantitation of endocannabinoids in serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016;1033–1034:271–7.
41. Mulawa EA, Kirkwood JS, Wolfe LM, Wojda SJ, Prenni JE, Florant GL, et al. Seasonal changes in Endocannabinoid concentrations between active and hibernating marmots (*Marmota flaviventris*). *J Biol Rhythm*. 2018;33:388–401.
42. Stewart JM, Boudreau NM, Blakely JA, Storey KB. A comparison of oleamide in the brains of hibernating and non-hibernating Richardson's ground squirrel (*Spermophilus richardsonii*) and its inability to bind to brain fatty acid binding protein. *J Therm Biol*. 2002;27:309–15.
43. Græsli AR, Evans AL, Fahlman Å, Bertelsen MF, Blanc S, Arnemo JM. Seasonal variation in haematological and biochemical variables in free-ranging subadult brown bears (*Ursus arctos*) in Sweden. *BMC Vet Res*. 2015;11:301.
44. Deval C, Capel F, Laillet B, Polge C, Béchet D, Taillandier D, et al. Docosahexaenoic acid-supplementation prior to fasting prevents muscle atrophy in mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016;7:587–603.
45. McGlory C, Calder PC, Nunes EA. The influence of Omega-3 fatty acids on skeletal muscle protein turnover in health, disuse, and disease. *Front Nutr*. 2019;6:144.
46. Wei H-K, Zhou Y, Jiang S, Tao Y-X, Sun H, Peng J, et al. Feeding a DHA-enriched diet increases skeletal muscle protein synthesis in growing pigs: association with increased skeletal muscle insulin action and local mRNA expression of insulin-like growth factor 1. *Br J Nutr*. 2013;110:671–80.
47. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 2002;56:365–79.
48. Bosch-Bouju C, Layé S. Dietary Omega-6/Omega-3 and Endocannabinoids: implications for brain health and diseases. 2016; in "cannabinoids in health and disease", (Meccariello R. and Chianese R. eds). IntechOpen (Rijeka).
49. Naughton SS, Mathai ML, Hryciw DH, McAinch AJ. Fatty acid modulation of the Endocannabinoid system and the effect on food intake and metabolism. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:361895.
50. Alveim AR, Torstensen BE, Lin YH, Lillefosse HH, Lock E-J, Madsen L, et al. Dietary linoleic acid elevates the Endocannabinoids 2-AG and Anandamide and promotes weight gain in mice fed a low fat diet. *Lipids*. 2014;49:59–69.
51. Alveim AR, Malde MK, Osei-Hyiaman D, Lin YH, Pawlosky RJ, Madsen L, et al. Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-AG and anandamide and induces obesity. *Obes Silver Spring Md*. 2012;20:1984–94.
52. Ghosh S, O'Connell JF, Carlson OD, González-Mariscal I, Kim Y, Moaddel R, et al. Linoleic acid in diets of mice increases total endocannabinoid levels in bowel and liver: modification by dietary glucose. *Obes Sci Pract*. 2019;5:383–94.
53. Schwartz GJ, Fu J, Astarita G, Li X, Gaetani S, Campolongo P, et al. The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell Metab*. 2008;8:281–8.
54. Walker C, West A, Browning L, Madden J, Gambell J, Jebb S, et al. The pattern of fatty acids displaced by EPA and DHA following 12 months supplementation varies between blood cell and plasma fractions. *Nutrients*. 2015;7:6281–93.
55. Matias I, Carta G, Murru E, Petrosino S, Banni S, Di Marzo V. Effect of polyunsaturated fatty acids on endocannabinoid and N-acyl-ethanolamine levels in mouse adipocytes. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 1781;2008:52–60.
56. DiPatrizio NV, Igarashi M, Narayanaswami V, Murray C, Gancayco J, Russell A, et al. Fasting stimulates 2-AG biosynthesis in the small intestine: role of cholinergic pathways. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2015;309:R805–13.
57. Cavuoto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Cameron-Smith D, Wittert GA. Effects of cannabinoid receptors on skeletal muscle oxidative pathways. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;267:63–9.
58. Mughaid DA, Sengul TG, You X, Wang Y, Steil L, Bergmann N, et al. Proteomic and Transcriptomic changes in hibernating grizzly bears reveal metabolic and signaling pathways that protect against muscle atrophy. *Sci Rep*. 2019;9:19976.
59. Esposito I, Proto MC, Gazzerò P, Laezza C, Miele C, Alberobello AT, et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist Rimonabant stimulates 2-Deoxyglucose uptake in skeletal muscle cells by regulating the expression of Phosphatidylinositol-3-kinase. *Mol Pharmacol*. 2008;74:1678–86.
60. Vella CA, Nelson OL, Jansen HT, Robbins CT, Jensen AE, Constantinescu S, et al. Regulation of metabolism during hibernation in brown bears (*Ursus arctos*): involvement of cortisol, PGC-1 α and AMPK in adipose tissue and skeletal muscle. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2019;240:110591.
61. Engeli S. Dysregulation of the endocannabinoid system in obesity. *J Neuroendocrinol*. 2008;20(Suppl 1):110–5.
62. Nesto RW, Mackie K. Endocannabinoid system and its implications for obesity and cardiometabolic risk. *Eur Heart J Suppl Oxford Academic*. 2008;10:B34–41.
63. Di Marzo V. The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2008;51:1356–67.
64. Rigano KS, Gehring JL, Evans Hutzenbiler BD, Chen AV, Nelson OL, Vella CA, et al. Life in the fat lane: seasonal regulation of insulin sensitivity, food intake, and adipose biology in brown bears. *J Comp Physiol B*. 2017;187:649–76.
65. Frøbert O, Frøbert AM, Kindberg J, Arnemo JM, Overgaard MT. The brown bear as a translational model for sedentary lifestyle-related diseases. *J Intern Med*. 2019;join.12983.
66. Proulx K, Cota D, Castañeda TR, Tschöp MH, D'Alessio DA, Tso P, et al. Mechanisms of oleoylethanolamide-induced changes in feeding behavior and motor activity. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289:R729–37.
67. Sarro-Ramirez A, Sanchez-Lopez D, Tejada-Padron A, Frias C, Zaldivar- Rae J, Murillo-Rodriguez E. Brain Molecules and Appetite: The Case of Oleoylethanolamide. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2013;13:88–91.
68. Fu J, Astarita G, Gaetani S, Kim J, Cravatt BF, Mackie K, et al. Food Intake Regulates Oleoylethanolamide Formation and Degradation in the Proximal Small Intestine. *J Biol Chem*. 2007;282:1518–28.
69. Izzo AA, Piscitelli F, Capasso R, Marini P, Cristino L, Petrosino S, et al. Basal and fasting/refeeding-regulated tissue levels of endogenous PPAR-alpha ligands in Zucker rats. *Obes Silver Spring Md*. 2010;18:55–62.
70. Fedele S, Arnold M, Krieger J-P, Wolfstädter B, Meyer U, Langhans W, et al. Oleoylethanolamide-induced anorexia in rats is associated with locomotor impairment. *Physiol Rep*. 2018;6:e13517.
71. Murillo-Rodríguez E, Palomero-Rivero M, Millán-Aldaco D, Arias-Carrión O, Drucker-Colín R. Administration of URB597, Oleoylethanolamide or

Palmitoylethanolamide Increases Waking and Dopamine in Rats. *PLOS ONE*. 2011;6:e20766.

72. Swenson JE, Sandegren F, Brunberg S, Wabakken P. Winter den abandonment by brown bears *Ursus arctos*: causes and consequences. *Wildl Biol. Nordic Board for Wildlife Research*; 1997;3:35–8.
73. Linnell JDC, Swenson JE, Andersen R, Barnes B. How Vulnerable Are Denning Bears to Disturbance? *Wildl Soc Bull.* 2000;28:400–13.
74. Evans AL, Singh NJ, Fuchs B, Blanc S, Friebe A, Laske TG, et al. Physiological reactions to capture in hibernating brown bears. *Conserv Physiol.* 2016;4: cow61.
75. Chanon S, Chazarin B, Toubhans B, Durand C, Chery I, Robert M, et al. Proteolysis inhibition by hibernating bear serum leads to increased protein content in human muscle cells. *Sci Rep.* 2018;8:5525.
76. Lefils J, Gélœn A, Vidal H, Lagarde M, Bernoud-Hubac N. Dietary DHA: time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice. *Br J Nutr.* 2010;104:1304–12.
77. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2008; ISBN 3–900051–07-0. Available from: <https://www.r-project.org/>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Supplementary Table S1: Characteristics of brown bears included in the study

ID_number	Year of collection	Age (year)	Gender	Serum		Plasma		Muscle Tissue		Adipose Tissue		Muscle tissue RNA		Adipose tissue RNA		
				S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	
w0825	2011	4	F			X	X									
w0904		3	F			X	X									
w1004		2	M			X	X									
w1011	2012	3	F	Mix1	Mix1											
w1017		3	F													
w1104		2	F													
w1105		2	F													
w1110		2	F													
w1104	2013	3	F	Mix2	Mix2									X		
w1105		3	F			X	X									
w1110		3	F			X	X									X
w1204		2	M			X	X									X
w1207		2	M			X	X								X	X
w1209		2	F			X	X									X
w1303	2014	2	F	Mix3	Mix3										X	
w1304		2	F									X	X			
w1305		2	F													X
w1316		2	M									X	X			X
w1317		2	M								X	X	X	X		
w1404	2016	3	M	Mix4	Mix4			X	X	X	X	X	X	X	X	
w1407		3	F							X	X	X	X	X	X	
w1509		2	F					X	X			X	X	X	X	
w1511		2	F									X	X		X	
w1512		2	F									X	X			
w1509	2017	3	F	Mix5	Mix5					X	X					
w1601		2	M							X	X	X	X			X
w1608		2	F					X	X							X
w1610		2	M					X	X							X
w1604	2018	3	F	Mix6	Mix6					X	X					
w1701		2	F													
w1709		2	F													
w1710		2	F					X	X							
N = 28		2,4 ± 0,09	Sex ratio : 9M/26F	n = 6	n = 6	n = 8	n = 8	n = 5	n = 5	n = 6	n = 6	n = 8	n = 8	n = 5	n = 13	

A total of 28 bears were included in this study, and all were captured both in February during winter hibernation (W) and in June during summer active period (S). Among them 4 bears (w1104, w1105, w1110 and w1509) were included two consecutive years. Serum mixes were prepared as followed: for a given year, 50 μ l of summer serum from each bear of the year was pooled to obtain the summer mix. In parallel, 50 μ l of winter serum from the same bears was pooled to obtain the winter mix. A total of 6 summer and winter paired mixes were obtained. Plasma was collected at the two time points (S and W) from 8 individual animals. Muscle and adipose tissues collected at the two time points (S and W) from respectively 5 and 6 individual animals. Total RNAs were obtained from muscle and adipose tissues collected at the two time points (S and W). For the muscle tissue, RNAs were obtained from 8 individual animals, while for adipose tissue, RNAs were obtained from 5 bears in summer and 13 bears in winter (only 4 paired samples from individual animals). N: number of bears, n: number of samples.

Supplementary Table S2: Serum fatty acid concentrations (mmol/L) in winter hibernating (WBS) and summer active (SBS) bears.

Fatty acid	WBS	SBS	FC W/S	pvalue	Adjusted p value (BH)
<i>C14:0 (myristic acid)</i>	0.41 ± 0.04	0.16 ± 0.01	2.57	4.31E-04	1.44E-03
<i>C14:1 (myristoleic acid)</i>	0.08 ± 0.01	0.02 ± 0.00	4.80	8.86E-04	2.00E-03
<i>C15:0 (pentadecanoic acid)</i>	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	1.12	1.68E-01	2.19E-01
<i>C16:0 (palmitic acid)</i>	6.99 ± 0.52	2.49 ± 0.17	2.80	1.13E-04	8.63E-04
<i>C16:1 n-9 (hypogeic acid)</i>	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.02	1.04	7.37E-01	7.37E-01
<i>C16:1 n-7 (palmitoleic acid)</i>	0.67 ± 0.06	0.22 ± 0.03	2.98	2.12E-05	6.36E-04
<i>C18:0 (stearic acid)</i>	3.79 ± 0.16	2.45 ± 0.14	1.54	3.91E-04	1.44E-03
<i>C18:1 n-9 (oleic acid)</i>	7.99 ± 0.63	4.70 ± 0.31	1.70	9.35E-04	2.00E-03
<i>C18:1 n-7 (vaccenic acid)</i>	0.89 ± 0.08	0.34 ± 0.03	2.62	3.81E-04	1.44E-03
<i>C18:2 n-6 (linoleic acid)</i>	4.04 ± 0.33	2.38 ± 0.17	1.70	6.74E-04	1.84E-03
<i>C18:3 n-6 (gamma-linolenic acid)</i>	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01	1.10	7.05E-01	7.29E-01
<i>C18:3 n-3 (alpha-linolenic acid)</i>	0.15 ± 0.02	0.30 ± 0.06	0.49	7.35E-02	1.05E-01
<i>C20:0 (arachidic acid)</i>	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.00	1.07	3.00E-01	3.33E-01
<i>C20:1 n-9 (gondoic acid)</i>	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	1.21	2.13E-01	2.56E-01
<i>C20:2 n-6 (eicosadienoic acid)</i>	0.32 ± 0.07	0.17 ± 0.05	1.91	3.00E-01	3.33E-01
<i>C20:3 n-6 (dihomo-gamma-linolenic acid)</i>	0.18 ± 0.01	0.09 ± 0.01	2.02	2.68E-02	4.23E-02
<i>C20:4 n-6 (arachidonic acid)</i>	1.86 ± 0.18	1.70 ± 0.26	1.09	1.94E-01	2.43E-01
<i>C20:5 n-3 (eicosapentaenoic acid)</i>	0.10 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.26	9.32E-03	1.64E-02
<i>C22:0 (behenic acid)</i>	0.10 ± 0.01	0.06 ± 0.00	1.69	3.95E-03	7.90E-03
<i>C22:1 n-9 (erucic acid)</i>	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.32	3.39E-01	3.63E-01
<i>C22:5 n-3 (docosapentaenoic acid)</i>	0.43 ± 0.05	0.16 ± 0.02	2.72	8.56E-04	2.00E-03
<i>C22:6 n-3 (docosahexaenoic acid)</i>	0.32 ± 0.07	0.08 ± 0.02	3.81	7.03E-03	1.32E-02
<i>C24:0 (lignoceric acid)</i>	0.11 ± 0.03	0.08 ± 0.03	1.47	7.37E-02	1.05E-01
<i>C24:1 n-9 (nervonic acid)</i>	0.21 ± 0.03	0.09 ± 0.02	2.48	1.15E-02	1.92E-02
TOTAL	28.82 ± 1.71	15.99 ± 1.09	1.80	1.01E-04	8.63E-04
SFA	11.59 ± 0.70	5.42 ± 0.31	2.14	1.15E-04	8.63E-04
MUFA	10.09 ± 0.71	5.59 ± 0.33	1.80	3.36E-04	1.44E-03
PUFA	7.14 ± 0.63	4.98 ± 0.57	1.43	5.21E-04	1.56E-03
n-3 PUFA	0.94 ± 0.12	0.73 ± 0.14	1.30	8.19E-02	1.12E-01
n-6 PUFA	6.20 ± 0.51	4.25 ± 0.45	1.46	2.09E-04	1.25E-03

Lipidomic analysis were performed in bear serum as described in Material and Methods. Data are expressed in concentrations (mmol/L) of individual fatty acids. Data are represented as mean ± SEM of separate extractions and quantifications from the twelve bear serum mixes. FC W/S : fold change from winter / summer ratios, MUFA : monounsaturated fatty acids, PUFA : polyunsaturated fatty acids, SBS : summer bear serum, SFA : saturated fatty acids, WBS : winter bear serum. Paired Student t-test was used for season comparison and generation of p values. The Benjamini-Hochberg (BH) correction for multiple comparison was used to obtain the adjusted p values (below 0.05 in bold).

Supplementary Table S3: Serum fatty acid relative proportions (mol %) in winter hibernating (WBS) and summer active (SBS) bears.

Fatty acid	WBS	SBS	FC W/S	p value	Adjusted p value (BH)
C14:0 (<i>myristic acid</i>)	1.38 ± 0.07	1.00 ± 0.09	1.38	8.82E-03	1.76E-02
C14:1 (<i>myristoleic acid</i>)	0.27 ± 0.02	0.11 ± 0.02	2.60	1.15E-03	4.93E-03
C15:0 (<i>pentadecanoic acid</i>)	0.24 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.62	3.40E-03	8.50E-03
C16:0 (<i>palmitic acid</i>)	24.18 ± 0.51	15.64 ± 0.45	1.55	1.91E-05	2.87E-04
C16:1 n-9 (<i>hypogeic acid</i>)	0.62 ± 0.06	1.08 ± 0.06	0.57	2.56E-03	6.98E-03
C16:1 n-7 (<i>palmitoleic acid</i>)	2.32 ± 0.13	1.42 ± 0.18	1.63	1.24E-04	1.24E-03
C18:0 (<i>stearic acid</i>)	13.22 ± 0.28	15.41 ± 0.45	0.86	1.71E-03	5.70E-03
C18:1 n-9 (<i>oleic acid</i>)	27.72 ± 1.47	29.52 ± 1.33	0.94	1.47E-01	1.84E-01
C18:1 n-7 (<i>vaccenic acid</i>)	3.12 ± 0.31	2.19 ± 0.27	1.42	8.47E-03	1.76E-02
C18:2 n-6 (<i>linoleic acid</i>)	14.08 ± 0.94	14.89 ± 0.44	0.95	3.66E-01	4.07E-01
C18:3 n-6 (<i>gamma-linolenic acid</i>)	0.18 ± 0.05	0.29 ± 0.03	0.61	2.40E-02	3.79E-02
C18:3 n-3 (<i>alpha-linolenic acid</i>)	0.50 ± 0.05	1.85 ± 0.38	0.27	1.47E-02	2.76E-02
C20:0 (<i>arachidic acid</i>)	0.42 ± 0.02	0.71 ± 0.02	0.59	5.30E-06	1.59E-04
C20:1 n-9 (<i>gondoic acid</i>)	0.19 ± 0.03	0.28 ± 0.05	0.67	1.03E-01	1.34E-01
C20:2 n-6 (<i>eicosadienoic acid</i>)	1.05 ± 0.26	0.91 ± 0.14	1.15	7.85E-01	8.12E-01
C20:3 n-6 (<i>dihomo-gamma-linolenic acid</i>)	0.67 ± 0.04	0.63 ± 0.04	1.07	5.31E-01	5.69E-01
C20:4 n-6 (<i>arachidonic acid</i>)	6.41 ± 0.37	10.36 ± 0.81	0.62	9.45E-04	4.73E-03
C20:5 n-3 (<i>eicosapentaenoic acid</i>)	0.31 ± 0.03	2.14 ± 0.16	0.15	1.65E-02	2.91E-02
C22:0 (<i>behenic acid</i>)	0.35 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.92	9.17E-02	1.31E-01
C22:1 n-9 (<i>erucic acid</i>)	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.78	2.92E-01	3.37E-01
C22:5 n-3 (<i>docosapentaenoic acid</i>)	1.47 ± 0.08	0.97 ± 0.06	1.51	8.96E-04	4.73E-03
C22:6 n-3 (<i>docosahexaenoic acid</i>)	1.11 ± 0.22	0.51 ± 0.09	2.17	2.17E-02	3.62E-02
C24:0 (<i>lignoceric acid</i>)	0.41 ± 0.12	0.54 ± 0.21	0.77	2.89E-01	3.37E-01
C24:1 n-9 (<i>nervonic acid</i>)	0.76 ± 0.13	0.56 ± 0.12	1.35	1.01E-01	1.34E-01
SFA	40.21 ± 0.46	34.08 ± 1.14	1.18	9.31E-04	4.73E-03
MUFA	35.04 ± 1.52	35.22 ± 1.57	0.99	8.75E-01	8.75E-01
PUFA	24.75 ± 1.42	30.70 ± 1.59	0.81	1.62E-03	5.70E-03
n-3 PUFA	3.23 ± 0.29	4.40 ± 0.66	0.73	5.97E-02	8.96E-02
n-6 PUFA	21.52 ± 1.17	26.30 ± 1.02	0.82	2.20E-03	6.60E-03
DHA/AA	0.17 ± 0.03	0.05 ± 0.01	3.44	3.80E-03	8.77E-03

Lipidomic analysis were performed in bear serum as described in Material and Methods. Data are expressed in molar percentage (mol %) of total circulating lipids, reflecting proportions of individual fatty acids. Data are represented as mean ± SEM of separate extractions and quantifications from the twelve bear serum mixes. FC W/S : fold change from winter / summer ratios, MUFA : monounsaturated fatty acids, PUFA : polyunsaturated fatty acids, SBS : summer bear serum, SFA : saturated fatty acids, WBS : winter bear serum. Paired Student t-test was used for season comparison and generation of p values. The Benjamini-Hochberg (BH) correction for multiple comparison was used to obtain the adjusted p values (below 0.05 in bold).

Supplementary Table S4 : List of primers used for RT-qPCR

Gene		Primer
Ua.TBP	Forward	5'- AGACCATTGCACTTCGTGCC -3'
	Reverse	5'- CCTGTGCACACCATTTTCCC -3'
Ua.CNR1	Forward	5'- GTTGCCGAGGGAGCTTCTCC -3'
	Reverse	5'- TGTCGGCAAGGCCATCTAGG -3'
Ua.CNR2	Forward	5'- AACTCAACATGTCGGCAGCC -3'
	Reverse	5'- CCATACCCAGCGTCTCTCC -3'
Ua.NAPEPLD	Forward	5'- TTTGACCTTGCAGCTATTCC -3'
	Reverse	5'- GATTCTCCATGCTTCAAGAC -3'
Ua.FAAH	Forward	5'- AAGCAACATACCCCATGCTC -3'
	Reverse	5'- GGTCACGAAATCACCTTTG -3'
Ua.DAGLA	Forward	5'- CACGTGGTCCACAACCACCC -3'
	Reverse	5'- AGGTGCTCATGCAGCATGGC -3'
Ua.DAGLB	Forward	5'- GTGCTGCTGTGTGCGGAAGG -3'
	Reverse	5'- GGCACCAGATCTGTGTCTGA -3'
Ua.MGLL	Forward	5'- GCGTGCTCTCTCGGAATAAG -3'
	Reverse	5'- TTGCCGAAGCACACCTTCAG -3'

Supplementary Table S5 : Endocannabinoids (eCBs) and mRNA quantification in plasma and tissues in winter hibernating (W) and summer active (S) bears.

eCBs in plasma (ng/mL)				
	WBP	SBP	FC W/S	p value
AEA	0.66 ± 0,06	1,06 ± 0,14	0,63	1,14E-02
2-AG	6,20 ± 0,51	6,67 ± 0,74	0,93	6,10E-01
OEA	24,02 ± 2,06	7,35 ± 1,09	3,27	3,18E-04
eCBs in muscle tissue (pg/mg tissue)				
	WBM	SBM	FC W/S	p value
AEA	0,58 ± 0,07	1,56 ± 0,38	0,37	6,45E-02
2-AG	28,05 ± 1,20	45,46 ± 2,67	0,62	4,87E-03
OEA	15,18 ± 1,06	16,55 ± 2,97	0,92	5,89E-01
eCBs in adipose tissue (pg/mg tissue)				
	WBA	SBA	FC W/S	p value
AEA	0,70 ± 0,06	1,58 ± 0,36	0,44	6,92E-02
2-AG	14,56 ± 0,90	129,89 ± 33,09	0,11	1,69E-02
OEA	12,87 ± 1,39	12,63 ± 3,29	1,02	9,40E-01
Gene expression in muscle tissue (normalized to TBP)				
	WBM	SBM	FC W/S	p value
CNR1	0.63 ± 0.15	1.00 ± 0.15	0,63	3,40E-02
CNR2	1.07 ± 0.23	1.00 ± 0.15	1,07	7,98E-01
FAAH	2.32 ± 0.45	1.00 ± 0.13	2,32	1,23E-02
MGLL	1.11 ± 0.13	1.00 ± 0.10	1,11	5,09E-01
DAGLA	0.41 ± 0.06	1.00 ± 0.23	0,45	2,72E-02
DAGLB	1.54 ± 0.14	1.00 ± 0.14	1,54	1,07E-02
NAPEPLD	0.77 ± 0.06	1.00 ± 0.11	0,77	7,03E-02
Gene expression in adipose tissue (normalized to TBP)				
	WBA	SBA	FC W/S	p value
CNR1	1.65 ± 0.39	1.00 ± 0.31	1,65	3,39E-01
CNR2	0.42 ± 0.05	1.00 ± 0.23	0,42	2,24E-03
FAAH	0.75 ± 0.10	1.00 ± 0.25	0,75	2,85E-01
MGLL	1.40 ± 0.15	1.00 ± 0.21	1,40	1,78E-01
DAGLA	0.94 ± 0.11	1.00 ± 0.24	0,94	8,12E-01
DAGLB	1.43 ± 0.06	1.00 ± 0.09	1,44	2,08E-03
NAPEPLD	0.75 ± 0.06	1.00 ± 0.07	0,75	3,25E-02

Quantification were performed as described in the Methods section. Data are expressed as Mean ± SEM. For gene expression, mRNA levels were normalized to TBP expression then expressed related to the summer values. Season differences were assessed using the Student paired t-test, except for gene expression in adipose tissue where unpaired t-test were used, and p values are reported.

Points clés de l'article :

- Les changements dans la concentration des eCBs dans les tissus (muscle et tissu adipeux) de l'ours brun, mettent en avant une régulation à la baisse de la signalisation du système endocannabinoïde durant l'hibernation.
- La signalisation de CB1 et CB2 semble être diminuée en hiver dans le tissu musculaire et adipeux, respectivement.
- La forte augmentation de l'oleoylethanolamide (OEA) en circulation, durant l'hibernation, est mise en évidence chez l'ours, mais pas chez les petits hibernants (marmottes et écureuils). L'OEA pourrait avoir un rôle dans le métabolisme énergétique (lipolyse) et dans la régulation des changements physiologique et comportementaux de l'ours : inactivité physique, arrêt de la prise alimentaire et maintien d'un signal anorexigène.

Discussion et perspectives :

Le nombre de composés endocannabinoïdes dosés dans le papier n'est que de 3 composés (AEA, 2-AG et OEA) parmi les grandes familles des N-acyléthanolamines (NAEs) et les 2-acylglycérols (2-AcGs). De plus, la quantification des endocannabinoïdes dans les tissus s'est limitée au muscle squelettique et tissu adipeux, 2 tissus dont les échantillons sont disponibles au laboratoire. Une quantification des eCBs dans des tissus métaboliquement actifs chez l'ours durant l'hiver, comme le tissu hépatique, serait d'un grand intérêt pour explorer un rôle potentiel de ces composés dans le métabolisme du glucose ou encore dans l'oxydation des acides gras (Bazwinsky-Wutschke et al. 2019). Néanmoins, à l'heure actuelle, au sein du programme de recherche de l'ours brun scandinave (SBBRP), nous n'avons pas accès à des échantillons de foie. La collaboration avec des parcs animaliers tel que le WSU Bear Center (Pullman, Washington, USA) serait envisageable et pourrait nous permettre d'accéder à des échantillons de tissus chez des ours euthanasiés.

Bien que les récepteurs CB1 et CB2 soient les principaux récepteurs sur lesquels agissent les endocannabinoïdes, le système endocannabinoïde est loin de se limiter à ces seuls récepteurs couplés aux protéines G. En effet, certains composés tels que l'OEA sont également capable d'activer des récepteurs tels que GPR199 ou encore le récepteur nucléaire PPAR- α (Im 2021).

Le séquençage du génome de l'ours brun (Ua) ayant été publié depuis 2018, nous pouvons donc facilement mettre en place le design d'amorces pour quantifier l'expression de gènes d'intérêt. La difficulté réside cependant dans la quantification des protéines, avec une problématique de croisement d'espèces. En effet, il n'existe pas à l'heure actuelle d'anticorps spécifiques aux protéines d'ours, et nous devons donc utiliser des anticorps dirigés contre des épitopes de protéines humaines, ce qui demande une étape préliminaire de validation de chaque anticorps que nous sommes amenés à utiliser.

La quantité limitée de tissus d'ours dont nous disposons, nous a emmené à faire des choix stratégiques. De ce fait, une partie non investiguée dans le papier est la quantification des lipides membranaires, en parallèle de la quantification des lipides circulants. En effet, les endocannabinoïdes sont synthétisés à partir des phospholipides des membrane cellulaires par de multiples enzymes (Muccioli 2010). Bien que l'hypothèse émise dans la publication soit que la libération sélective d'acides gras par le tissu adipeux, et donc la modification des proportions acides gras circulants, puisse modifier la composition membranaire des autres tissus, nous n'avons pas les données à disposition pour étayer cette affirmation. Nous ne disposons pas des outils et des compétences pour l'analyse de la lipidomique membranaire au sein de notre laboratoire, ce qui nécessiterait donc de s'associer avec un partenaire capable de mener l'analyse (association avec une plateforme lipidomique).

2. MTT et fractionnement du sérum

Contexte :

Le profilage du métabolome et lipidome sérique de l'ours noir américain (*Ursus americanus*) ou de l'ours brun (*Ursus arctos*), a révélé qu'il existe de nombreuses différences saisonnières de composés entre la phase active et l'hibernation, ce qui a permis de fournir un aperçu des adaptations physiologiques remarquables qui caractérisent l'hibernation des ursidés (Chow et al. 2013; González-Bernardo et al. 2020; Welinder et al. 2016; Stenvinkel, Fröbert, et al. 2013; Græsli et al. 2015; Hissa et al. 1994; Giroud et al. 2019; Giroud, Evans, et al. 2018). Il a été mis en avant dans les publications, que les changements observés au niveau des métabolites sériques contribuent au maintien du phénotype d'hibernation, et aux mécanismes d'adaptation et de protection durant cette phase.

Dans les précédents travaux menés dans l'équipe, il a été mis en évidence la capacité du sérum d'ours hibernant à transmettre des effets trophiques et métaboliques à des cellules musculaires humaines en culture, des effets comparables à ceux observés dans le muscle d'ours pendant l'hiver (Chanon et al. 2018b). La composition différentielle du sérum entre l'été et l'hiver pourrait expliquer les capacités du sérum d'ours d'hiver à réduire la synthèse et la dégradation protéique, ce qui aboutit à une augmentation du contenu protéique des myotubes humain traités (hypertrophie).

Question(s) scientifique(s) :

Au-delà de l'effet du sérum d'ours hibernant sur le turnover protéique, quels autres effets (métabolisme, énergétique cellulaire, ...) biologiques peuvent être mis en évidence ?

Est-ce que les effets du sérum d'ours hibernant sont reproductibles dans différents modèles cellulaires ?

Quelle est la nature des composés responsables des effet biologiques observés dans des modèles in vitro ?

Stratégie mis en œuvre :

D'après les données de la littérature, la nature des composés circulants dont la concentration varie entre les saisons peuvent être de nature protéique, lipidique ou ionique.

L'approche sans à priori, qui repose sur le fractionnement du sérum, vise à décomplexifier le sérum qui est composé de plusieurs milliers de molécules de nature physico-chimique différente, et avec des gammes de concentrations très différentes, allant de l'état de traces à plusieurs g/L. Le but du fractionnement du sérum est de faciliter l'identification de la nature des composés circulants actifs sur les cellules humaines. Le fractionnement du sérum repose notamment sur une stratégie de délipidation et de déplétion en albumine. La délipidation est un bon exemple de fractionnement basé sur la nature des constituants, en effet, il s'agit d'une méthode qui permet d'éliminer toutes les espèces de nature lipidique. La déplétion en albumine est une méthode permettant d'éliminer un constituant majoritaire (en concentration) du sérum. La déplétion en albumine va également éliminer de manière concomitante toutes les molécules qui sont fixées dessus.

La recherche de composés actifs nécessite la mise en place d'un système rapporteur simple et rapide à mettre en œuvre pour faire une analyse à large échelle (screening) des différentes fractions. J'ai ainsi choisi d'investiguer un effet métabolique du sérum, en utilisant une mesure d'activité enzymatique appelé MTT, facile à mettre en œuvre, et reflétant l'activité de la NADH-déshydrogénase (Huet et al. 1992).

L'investigation des effets biologiques du sérum d'ours a été réalisée sur différents modèles cellulaires (PC3, HFF-1, CCL136) qui permettent (i) un gain de temps et (ii) une meilleure reproductibilité des résultats, par rapport à l'utilisation de myotubes humains qui proviennent de sujets différents, et dont le temps de culture nécessaire afin d'obtenir des myotubes différenciés est conséquent.

Afin de valider la mesure rapportrice (test MTT) le sérum d'ours a été testé en remplacement du sérum de veau fœtal (FBS 5%), qui correspond à la condition de culture standard. Le test des fractions a été réalisé en supplémentation du FBS, car le fractionnement du sérum va enlever un grand nombre de composés et cette déplétion pourrait impacter la viabilité cellulaire, par déprivation par exemple de certains facteurs de croissance.

Résultats :

Estimation de l'activité NADH-déshydrogénase par le test MTT et impact du sérum d'ours sur la viabilité cellulaire

Le test MTT, un test d'activité métabolique simple à mettre en œuvre et dépendant de l'activité (NADH)-déshydrogénase a été utilisé pour évaluer l'impact du sérum d'ours sur différentes lignées cellulaires humaines. L'impact du sérum sur la viabilité cellulaire a été évalué par un comptage de cellules, qui ne met pas en avant de différences significatives dans le nombre de cellules PC3 avec les différentes conditions de traitement (FBS 5% ou SBS 5% ou WBS 5%) [Voir Figure 8]. Des résultats similaires ont été obtenus avec des fibroblastes humains traités au sérum d'ours (données non présentées).

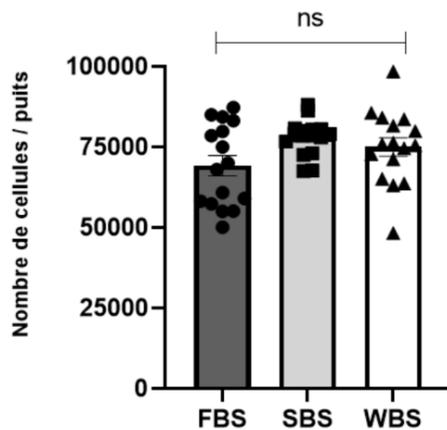


Figure 8 : Comptage du nombre de cellules PC3 par puits après traitement au sérum d'ours

Le nombre de cellules PC3 par puits (plaques 96 puits) est comptabilisé après traitement de 48h dans un milieu de culture avec 5% FBS ou 5% SBS ou 5% WBS. Les données sont représentées par la moyenne (\pm SEM). ns = non significatif

J'ai voulu vérifier que le test MTT reflétait bien l'activité NADH-déshydrogénase. Pour cela, les mesures de l'activité MTT ont été réalisées en présence de Roténone, un inhibiteur spécifique du complexe I de la chaîne respiratoire. Les résultats mettent en évidence une réduction dose-dépendante de l'activité MTT (exprimée en delta DO/min) dans les cellules PC3 traitées avec de la Roténone [Voir Figure 9].

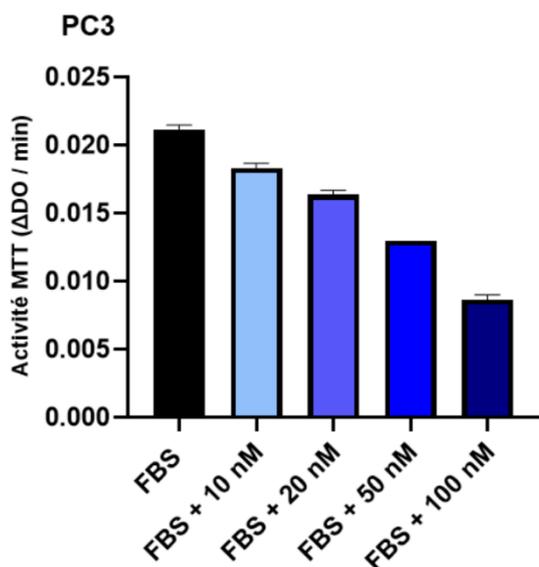


Figure 9 : Effet dose-réponse de la roténone sur l'activité MTT dans des cellules PC3

L'activité MTT est exprimée en $\Delta DO/min$, pour cellules PC3 dans un milieu de culture contenant 5% de FBS après traitement de 30 min avec des concentrations croissantes de roténone (10, 20, 50 et 100 nM). Les données sont représentées par la moyenne (\pm SEM). Pas de statistiques réalisées.

Effet du sérum d'ours sur l'activité MTT dans différentes lignées cellulaires humaines

La quantification de l'activité MTT dans 3 types cellulaires (PC3, HFF-1, CCL136) montre une diminution significative de l'activité MTT entre la condition sérum de veau foetal (FBS) et les deux sérums d'ours (SBS et WBS) [Voir Figure 10a-c]. L'effet différentiel est significatif et reproductible dans différentes lignées cellulaires. En effet, pour les cellules PC3, HFF-1 et CCL136 traitées au WBS en comparaison avec le SBS, on observe respectivement une diminution de 30%, 21% et 17% de l'activité MTT. Nous avons ainsi validé le test MTT comme un outil de screening permettant de différencier le traitement au SBS et WBS, permettant ainsi la poursuite d'investigations : effet dose, mise en évidence de la réversibilité de l'effet, test de fractions de sérum, ...

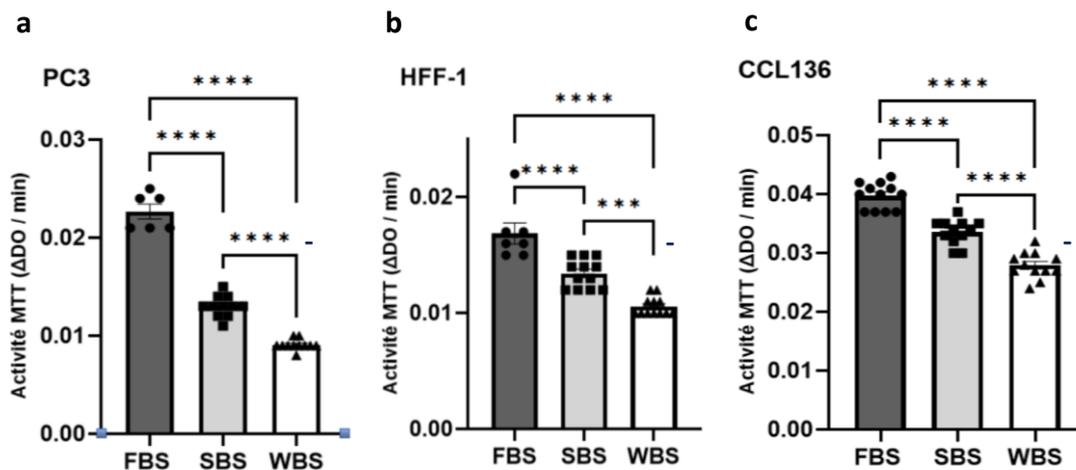


Figure 10 : Mesure de l'activité MTT dans différents types cellulaires traités au sérum d'ours

L'activité MTT est exprimée en ΔDO/min, pour cellules **a)** PC3 **b)** HFF-1 et **c)** CCL136 après traitement de 48h avec 5% FBS ou 5% SBS ou 5% WBS. Les données sont représentées par la moyenne (± SEM). *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

La seconde étape de validation est la mesure d'un effet dose réponse du sérum dans les cellules PC3 traitées au SBS ou au WBS 5% ou 10% [Voir Figure 11]. On note une différence significative sur la réduction du MTT entre les PC3 traitées au SBS 5% et SBS 10%, différence qui est proche du seuil de significativité entre les cellules PC3 traitées au WBS 5% et WBS 10%.

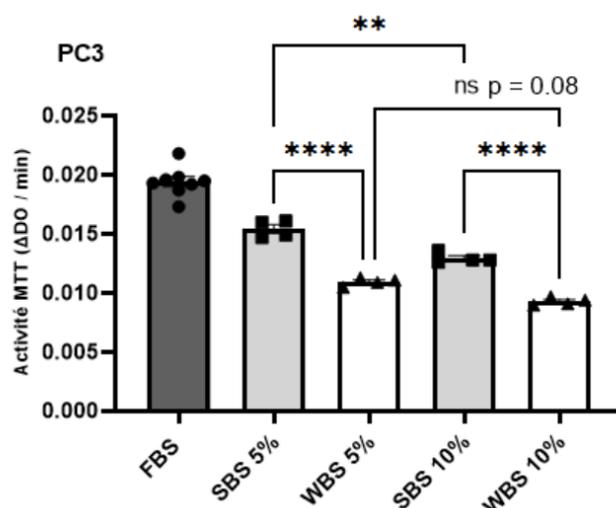


Figure 11 : Effet dose-réponse du sérum d'ours sur l'activité MTT dans des cellules PC3

L'activité MTT est exprimée en ΔDO/min, pour cellules PC3 après traitement de 48h avec 5% FBS ou 5% ou 10% SBS et 5% ou 10% WBS. Les données sont représentées par la moyenne (± SEM). ** p < 0.01, **** p < 0.0001, ns = non significatif.

Nous avons par la suite recherché si l'effet du sérum d'ours était relatif au temps de traitement. L'effet du sérum d'ours a été investigué dans des cellules PC3 sur des traitements court (allant de 30 min à 1h45) [Voir Figure 12]. A 30min, 1h et 1h45 on observe une réduction du FC (fold change) de l'activité MTT entre les cellules PC3 traités au WBS par rapport au SBS, mais cette réduction n'est significative qu'à partir de 1h45. Ce troisième niveau de validation a permis de mettre en évidence que le sérum possède une activité inhibitrice, avec une apparition progressive, mais assez rapide de l'effet.

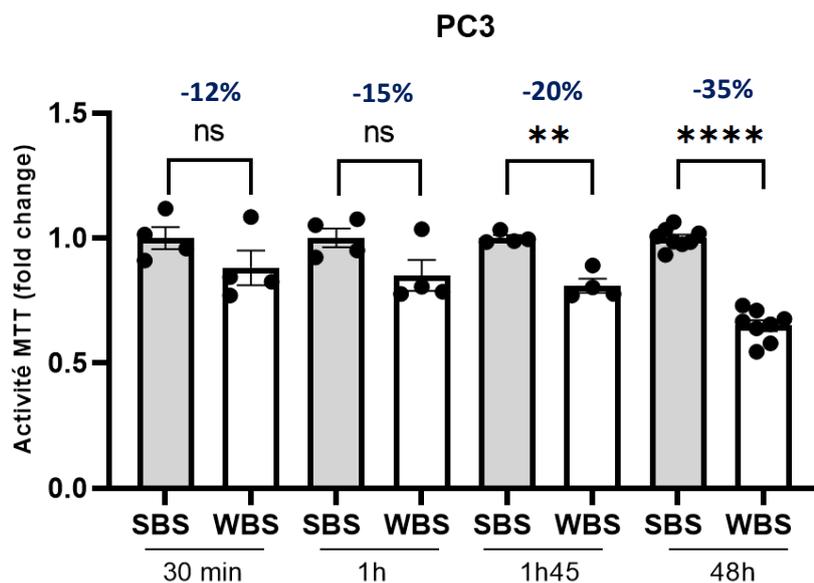


Figure 12 : Mesure de l'activité MTT dans les cellules PC3 en fonction de la durée du traitement

Fold change (activité MTT) par rapport au SBS, pour des cellules PC3 traitées au SBS 5% ou WBS 5% en fonction de la durée de traitement. La mesure de l'activité MTT se réalise 30 min, 1h ou 1h45 après traitement au SBS ou WBS 5%. Les données sont représentées par la moyenne (\pm SEM).

** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, ns : non significatif.

Pour étudier la persistance de l'effet après la disparition du stimulus, des expériences de rinçage par un milieu contenant 5% de FBS ont été réalisés après un traitement de 48h dans du sérum d'ours [Voir Figure 13]. L'activité MTT a été mesurée après 1h, 3h et 6h post-rinçage. La diminution de l'activité MTT est significative et à hauteur d'environ 35% entre les PC3 traitées au SBS et WBS. Cette diminution reste significative pour les 3 temps (1h, 3h et 6h), bien que moindre (entre 13 et 12%), dans les cellules traitées 48h avec du sérum d'ours et ayant subi un rinçage. La diminution de l'ampleur de l'effet inhibiteur du WBS sur l'activité MTT est visible dès 1h, après rinçage du milieu de traitement contenant le sérum d'ours. L'effet inhibiteur du WBS sur l'activité MTT est donc partiellement réversible.

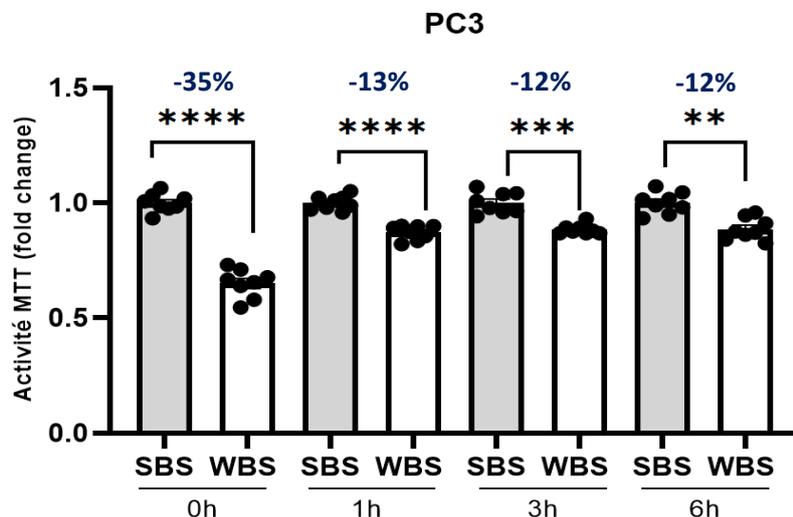


Figure 13 : Mesure de l'activité MTT dans les cellules PC3 après rinçage (wash out)

Fold change (activité MTT) par rapport au SBS, pour des cellules PC3 traitées au SBS 5% ou WBS 5% durant 48h après un rinçage avec un milieu FBS 5%. La mesure de l'activité MTT est réalisée après 48h sans rinçage (0h) ou 1h, 3h ou 6h après un rinçage. Les données sont représentées par la moyenne (\pm SEM). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

L'utilisation du test MTT pour suivre un effet différentiel du SBS/WBS est donc validé, ce qui permet d'envisager le test de fractions de sérum, dans le but d'identifier des composés ou famille(s) de composé(s) responsable de l'effet métabolique observé.

Effets des fractions de sérum sur l'activité MTT

Le second objectif, après avoir identifié un effet métabolique du sérum d'ours, a été de tenter d'identifier les fractions active et responsables de la diminution de l'activité MTT. Les tests de fractions ont été réalisés en supplémentation du sérum de veau foetal (FBS) et les cellules PC3 traitées durant 48h. On notera que l'effet différentiel entre WBS et SBS est conservé lorsque le sérum natif (F0) est ajouté au FBS [Voir Figure 14]. La réalisation de chocs thermiques, cycle décongélation-recongélation (F1), chauffage à 50 ou 65°C (F2 et F3), ne modifient pas significativement l'effet du WBS sur la réduction de l'activité MTT [Voir Figure 14].

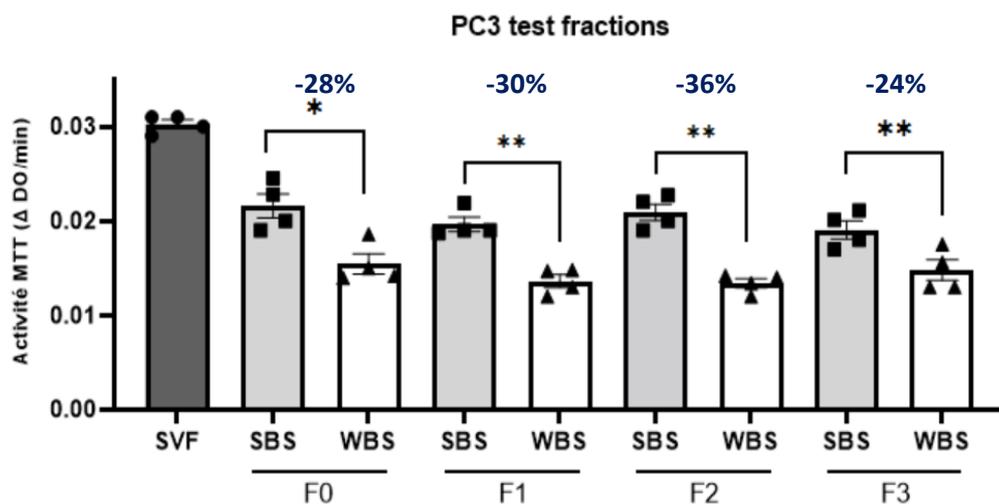


Figure 14 : Mesure de l'activité MTT dans des cellules PC3 traitées avec les fractions de sérum (F0 à F3)

L'activité MTT est exprimée en $\Delta DO/min$, pour cellules PC3 après traitement de 48h avec 5% FBS ou 5% SBS ou 5% WBS additionnées ou non de 5% des fractions F0 à F3. Les données sont représentées par la moyenne (\pm SEM). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. F0 : sérum natif, F1 : sérum dénaturé 50°C, F2 : sérum dénaturé 65°C, F3 : sérum cycle décongélation-recongélation.

On notera une perte de l'effet différentiel entre WBS et SBS lorsque la fraction du sérum délipidée (F4), la fraction contenant la phase organique (F5) ou encore la fraction contenant l'albuminome ou fraction enrichie en albumine (F7) est ajoutée dans le milieu de culture [Voir **Figure 15**]. L'effet différentiel entre WBS et SBS est cependant conservée dans la fraction du sérum déplétée en albumine (F6). On notera cependant la présence d'une certaine mortalité cellulaire pour les cellules traitées avec la fraction contenant la phase organique (F5).

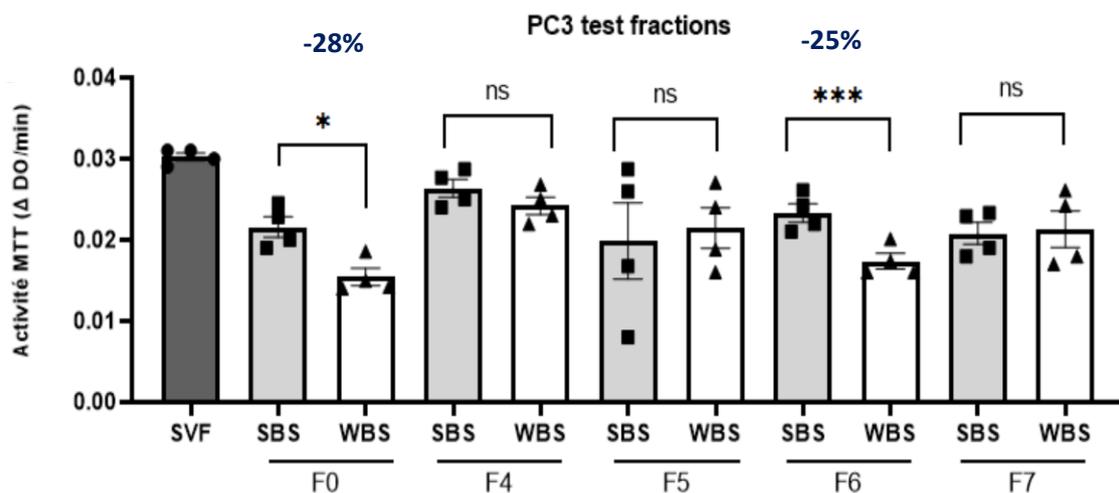


Figure 15 : Mesure de l'activité MTT dans des cellules PC3 traitées avec les fractions de sérum (F0 à F7)

L'activité MTT est exprimée en $\Delta DO/min$, pour cellules PC3 après traitement de 48h avec 5% FBS ou 5% SBS ou 5% WBS additionnées ou non des fractions F0 à F7. Les données sont représentées par la moyenne ($\pm SEM$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ns : non significatif. F0 : sérum natif, F4 : fraction délipidée, F5 : phase organique (avec lipides), F6 : fraction déplétée en albumine, F7 : albuminome.

Points clés des résultats :

- Il a été mis en évidence un effet différentiel entre le WBS et le SBS sur l'activité de la **NADH-déshydrogénase mitochondriale**. Dans différentes lignées cellulaires humaines (PC3, HFF1, CCL136), le WBS entraîne une réduction de l'activité MTT, qui est modèle cellulaire dépendant.
- L'effet du WBS sur la réduction de l'activité MTT est dose-dépendant, à action rapide (mis en place de l'effet au bout de 1h45), et partiellement réversible après seulement 1h de rinçage.
- Le fractionnement du sérum a permis de mettre en évidence, sur l'activité mesurée, que le ou les composé(s) actif(s) ne sont pas thermolabiles, puisque l'effet du sérum sur la réduction du MTT est conservé après dénaturation à 50 ou 65°C. La délipidation du sérum abolit l'effet différentiel observé entre le SBS et le WBS sur l'activité MTT, ce qui met en avant que soit des composés lipidiques, soit des composés affectés par la procédure de délipidation, sont impliqués dans l'inhibition de l'activité NADH-déshydrogénase. Lorsque l'albumine est éliminée du sérum, on continue à observer l'effet différentiel entre le SBS et le WBS sur l'activité MTT, alors que l'effet différentiel est perdu lorsque les cellules sont traitées avec la fraction contenant l'albumine seule. La conclusion est que le ou les composé(s) actif(s) ne semblent pas être des composés liés à l'albumine.

Discussion et perspectives :

Le choix du test MTT, a reposé sur son intérêt dans l'estimation d'une activité métabolique cellulaire, l'activité de la NADH-déshydrogénase mitochondriale (Huet et al. 1992), sa facilité de mise en œuvre ou encore la possibilité d'utiliser ce test pour du screening dans des plaques de culture 96 puits. Le choix d'un test facile à mettre en œuvre et permettant de tester un grand nombre de fractions de sérum simultanément étaient des conditions requises dans notre stratégie.

Etant donné que les cellules sont lysées dans du DMSO pur, nous avons rencontré une problématique pour la normalisation des données (en μg de protéines), de par l'incompatibilité du solvant avec nos protocole de quantification des protéines. Les données

d'activité MTT sont donc exprimées en delta DO/min en fonction du temps d'incubation (35 min) choisi pour les expériences. Nous avons cependant vérifié qu'il n'y avait pas d'impact du traitement au sérum d'ours sur la viabilité cellulaire, en réalisant un comptage de cellules.

Il existe différents tests utilisant des sels de tetrazolium et notamment le test XTT (Roehm et al. 1991), qui a l'avantage de former du formazan qui est hydrosoluble et qui diffuse donc en dehors de la cellule, dans le milieu. L'avantage apporté par le XTT serait donc de permettre la mesure de l'activité NADH-déshydrogénase, suivi d'une lyse des cellules pour quantification du contenu protéique, ce qui permettrait par la suite de normaliser l'activité MTT en delta DO $\text{min}^{-1} \mu\text{g protéines}^{-1}$.

L'effet différentiel observé sur l'activité MTT entre le sérum d'hiver (WBS) et le sérum d'été (SBS) est présent dans toutes les lignées cellulaires étudiées, allant d'une réduction de l'activité MTT d'environ 30% pour les PC3 à 17% pour les cellules CCL136.

Il est possible que le niveau d'activité basal de la NADH-déshydrogénase soit différent en fonction des modèles cellulaires, notamment en fonction du contenu mitochondrial qui diffère entre chaque lignée. Ce paramètre pourrait donc expliquer une amplitude différente des effets du WBS sur l'activité de la NADH-déshydrogénase mitochondriale.

Au cours du processus de fractionnement, il y a génération de sous-fractions qui s'éloignent des conditions de culture standard, avec un sérum complet. Afin d'éviter de trop s'écarter des conditions de culture standard, nous avons donc choisi de réaliser le traitement des cellules en mettant les fractions en supplémentation du sérum de veau fœtal (FBS).

Le test des fractions a également permis de mettre en avant que le ou les composé(s) actifs(s) n'étaient pas thermosensibles. En effet, après chauffage du sérum à 50 et 65°C, l'effet différentiel observé entre le SBS et le WBS est conservé dans les cellules PC3. D'autre part, la fraction contenant l'albumine (et les molécules associées) ne semble pas être impliquée dans l'effet inhibiteur du sérum d'ours d'hiver sur l'activité MTT. Lorsque l'on enlève les lipides du sérum, il y a une perte de l'effet différentiel entre le SBS et le WBS, mais lorsque l'on teste la fraction lipidique seule on n'observe pas non plus l'effet différentiel. Il est possible que le processus de délipidation (au DIPE) ait pu dénaturer certaines protéines actives. L'autre problématique est que l'ajout de la phase organique (contenant les lipides) avec le solvant, provoque une certaine mortalité cellulaire.

Nous pouvons conclure à ce stade que le ou les composé(s) circulant(s) actif(s) sont à priori (i) de nature thermorésistante, (ii) qu'ils sont soit éliminés soit dénaturés avec le protocole de délipidation, (iii) que les composés actifs ne semblent pas liés à l'albumine.

Afin d'améliorer le protocole et de valider les résultats obtenus, nous envisageons de mettre en place à l'avenir un test XTT, avec normalisation des résultats par la quantité de protéines. Nous envisageons également d'autres méthodes de délipidation du sérum, ainsi que l'obtention d'une fraction protéique appauvrie en albumine par d'autres protocoles que celui adapté d'après Cioloboc et al. (Cioloboc et al. 2013).

A partir de la ou les fractions actives identifiées, il sera également possible de réaliser un sous fractionnement, le but étant de décomplexifier au maximum le sérum pour identifier de possibles composés actifs qui peuvent être présents en petites quantités dans le sérum.

3. Fonction et respiration mitochondriale

Contexte :

La suppression du métabolisme durant la torpeur n'est pas simplement une conséquence de la baisse de la température corporelle, mais implique plutôt une inhibition active et régulée (Heldmaier et al. 2004). De nombreuses études (voir revue Staples & Brown 2008) ont investigué le rôle de la suppression active de la respiration mitochondriale dans la diminution du métabolisme chez les hibernants, les mitochondries étant responsables de jusqu'à 90 % de la consommation d'oxygène chez les mammifères (Rolfe & Brown 1997). La respiration mitochondriale est fortement diminuée pendant la torpeur, lorsqu'elle est mesurée *in vitro* dans les mitochondries du foie de *Ictidomys tridecemlineatus*, en présence de succinate.

Malgré une hypothermie modérée, l'ours est capable de diminuer son métabolisme jusqu'à 75% durant la période de torpeur (Evans et al., 2016; Geiser, 2004; Tøien et al. 2011). Une sous-expression coordonnée de nombreux gènes impliqués dans la respiration cellulaire a lieu dans le foie de *Ursus Americanus* pendant la période de torpeur (Fedorov et al. 2011). La diminution générale de l'abondance des protéines des sous-unités des cinq complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que de la citrate synthase, a été mise en évidence dans les muscles des ours bruns en hibernation (Chazarin et al. 2019). Ces régulations suggèrent une altération de la fonction et une diminution du contenu mitochondrial, qui pourraient conduire à une capacité réduite de production d'ATP, dans le muscle squelettique des ours en hibernation.

Question(s) scientifique(s) :

Quels sont les effets du sérum d'ours hibernant sur la fonction et la respiration mitochondriale sur des cellules PC3 et des myotubes humains ?

Stratégie mis en œuvre :

Les effets du sérum d'ours hibernant sur la fonction mitochondriale de cellules humaines ont été investigués par 2 approches : (i) la quantification de protéines mitochondriales (complexes

de la chaîne respiratoire et la citrate synthase) et (ii) la mesure de la respiration mitochondriale par deux techniques différentes.

La respiration mitochondriale a été mesurée sur des PC3 et des myotubes humains traités au sérum d'ours par deux techniques : (i) mesure de la consommation d'oxygène sur des cellules PC3 perméabilisée à l'aide d'un oxygraphe (Oroboros) et (ii) mesure de l'OCR (oxygen consumption rate) sur des myotubes humains en culture, à l'aide d'un analyseur Seahorse XFe24 Analyzer.

Résultats :

Mesure du contenu cellulaire en mitochondries et en complexes de la chaîne respiratoire

La quantification de la citrate synthase, par son activité ou sa quantité de protéines, est un bon reflet du contenu mitochondrial cellulaire. Cette enzyme du cycle de Krebs (la citrate synthase) est localisée dans la matrice mitochondriale, et son abondance est proportionnelle à la quantité de mitochondrie dans la cellule.

La quantification par western blot **[Figure 16 et 17]** montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre le traitement au sérum d'ours d'hiver (WBS) ou d'été (SBS) sur la quantité de citrate synthase dans les 3 lignées cellulaires étudiées : une lignée de cellule cancéreuse PC3, une lignée fibroblastique HFF-1 et une lignée de cellules musculaires CCL136.

On note cependant une augmentation significative de la quantité de citrate synthase entre la condition contrôle FBS (sérum de veau fœtal) et les cellules traitées au WBS, dans les cellules PC3 (1.4 fois) et CCL136 (3.5 fois).

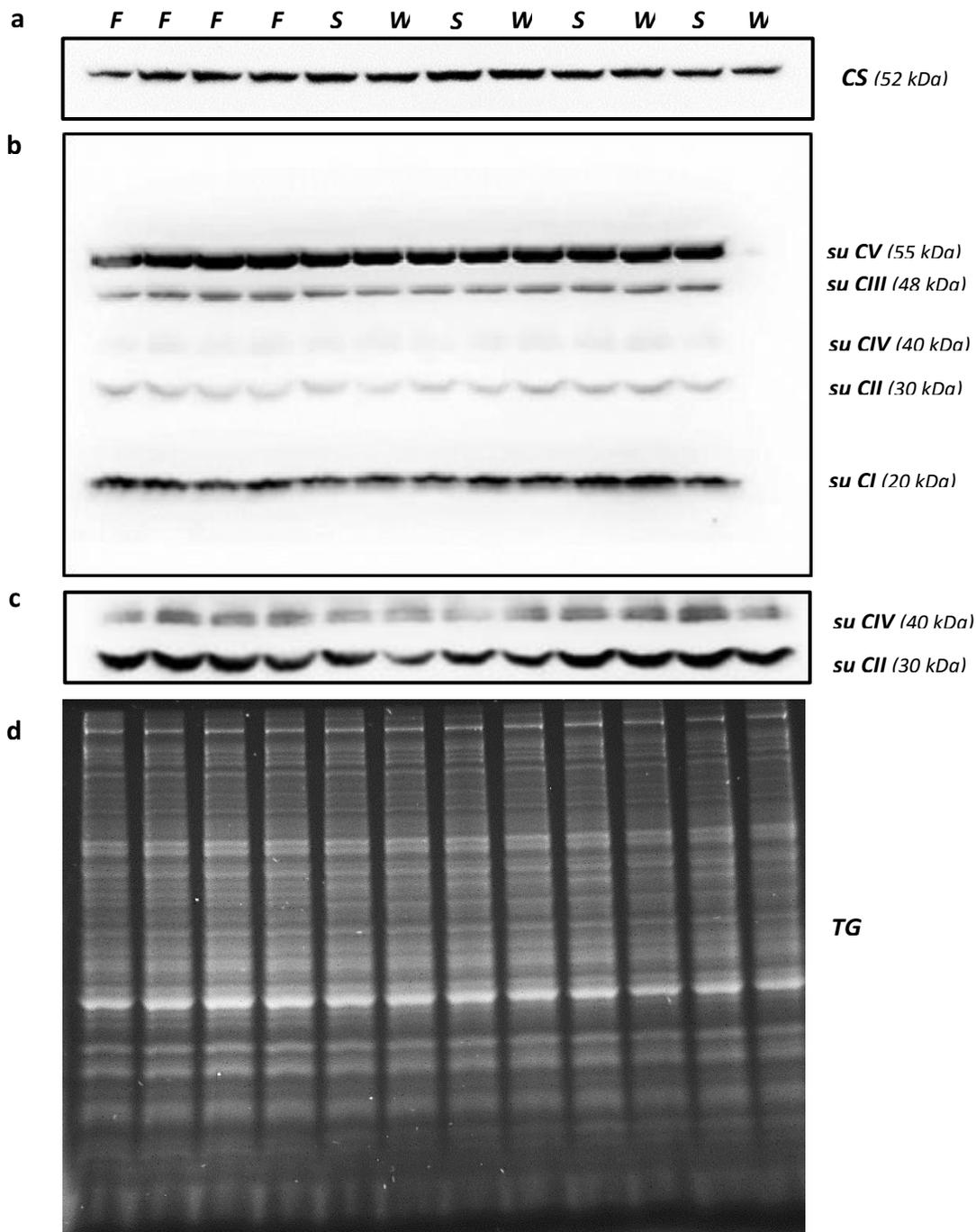


Figure 16 : Quantification de la citrate synthase et de 5 sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire dans des cellules PC3 traitées au sérum d'ours

a) Immunodétection de la citrate synthase (CS) dans des cellules PC3 traitées FBS 5% (F), SBS 5% (S), WBS 5% (W) durant 48h ; **b)** Immunodétection de 5 protéines OXPHOS (5 sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale) dans des cellules PC3 traitées FBS 5% (F), SBS 5% (S), WBS 5% (W) durant 48h ; **c)** surexposition du gel au niveau des bandes correspondant aux complexes CIV et CII ; **d)** Quantification des dépôts de protéines (gel TGX)

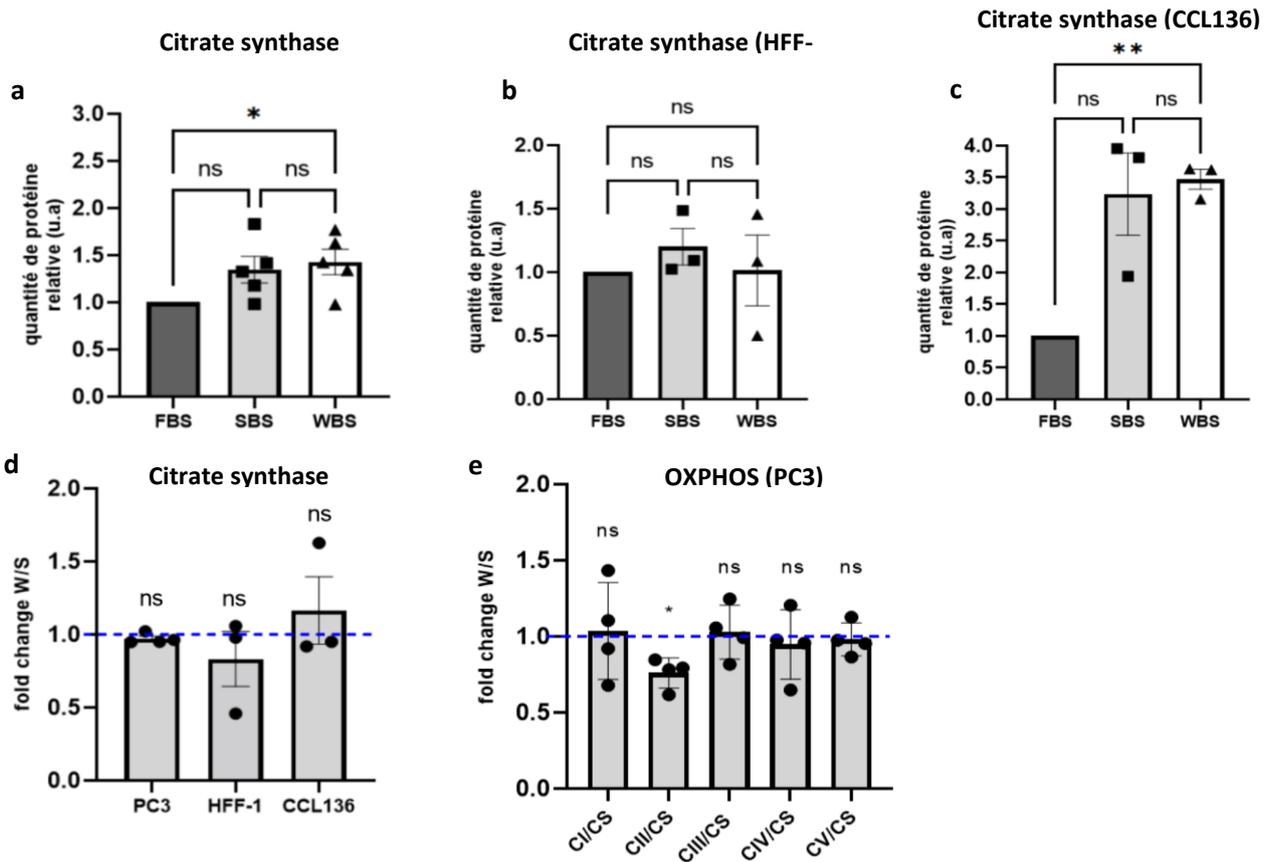


Figure 17 : Quantification de la citrate synthase et de 5 sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire dans des cellules traitées au sérum d'ours

a) Quantité de protéine citrate synthase (CS) normalisée par rapport au FBS pour des cellules PC3 traitées FBS 5%, SBS 5%, WBS 5% durant 48h (n=5) ; **b)** Quantité de protéine citrate synthase normalisée par rapport au FBS pour des cellules HFF-1 traitées FBS 5%, SBS 5%, WBS 5% durant 48h (n=3) ; **c)** Quantité de protéine citrate synthase normalisée par rapport au FBS pour des cellules CCL136 traitées FBS 5%, SBS 5%, WBS 5% durant 48h (n=3) ; **d)** Fold change W/S de la quantité de CS pour les différents types cellulaires (PC3, HFF-1, CCL136) traités sérum hiver (W) / sérum été (S) (n=3/4) ; **e)** Fold change W/S de la quantité des sous-unités des 5 complexes de la chaîne respiratoire (OXPHOS) normalisé par la quantité de citrate synthase (CS), pour des cellules PC3 traités sérum hiver (W) / sérum été (S) (n=4). Les données sont représentées graphiquement par la moyenne (\pm SEM). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns : non significatif

Pour évaluer le contenu cellulaire en complexe de la chaîne respiratoire, une sous-unité des 4 complexes de la chaîne respiratoire plus de l'ATP synthase ont été quantifiées par Western blot [Figure 17]. Comme pour la citrate synthase, il n'y a pas de différences significatives entre le traitement au sérum d'ours d'hiver (WBS) ou d'été (SBS) pour 4 sous-unités (complexe CI, CIII, CIV et CV) mais une diminution significative (FC= 0.64) du complexe CII pour les cellules traitées au WBS par rapport aux cellules traitées au SBS.

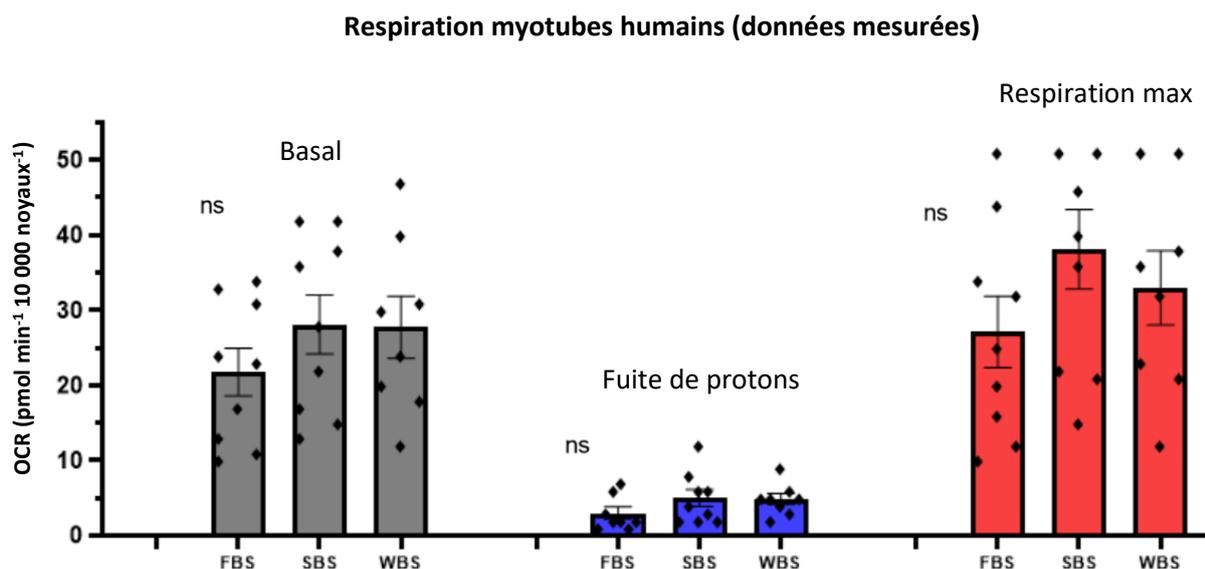


Figure 18 : *Respiration mitochondriale mesurées dans des myotubes humains traités au sérum d'ours*

La respiration basale (en gris), la respiration lors de l'inhibition de l'ATP synthase (en bleu) et la respiration maximale après découplage (en rouge) sont mesurés dans des myotubes humains provenant de 9 sujets différents (n=9) traités 48h avec 5% FBS ou 5% SBS ou 5% WBS. La consommation d'oxygène (OCR, Oxygen Consumption Rate) est mesurée à l'aide d'un Seahorse XFe24 Analyser, exprimées en pmol min⁻¹ et normalisées par 10 000 noyaux. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne (± SEM). ns = non significatif

Mesure de la respiration mitochondriale par le Seahorse

La deuxième approche, plus fonctionnelle, a porté sur la mesure de la respiration mitochondriale dans une lignée primaire de myotubes humains. La mesure de l'OCR (Oxygen Consumption Rate) a été réalisé sur des myotubes traités 48 h au sérum d'ours d'été et d'hiver à l'aide d'un Seahorse XFe24 Analyser.

En première approche, les mesures ont été faites selon la méthode standard (protocole Mito-Stress) qui est un protocole rapide et déjà validé permettant d'obtenir plusieurs paramètres de la respiration mitochondriale cellulaire, comme la respiration basale, la respiration après inhibition de l'ATP-synthase (fuite de protons) et la respiration maximale après ajout d'un découplant (FCCP). Avec des myotubes humains différenciés et traités pendant 48h, il n'y a pas de différences significatives entre les 3 conditions (FBS, SBS, WBS) [Voir figure 18], bien qu'on puisse noter une tendance à la diminution de la respiration maximale dans les cellules traitées au WBS par rapport au SBS.

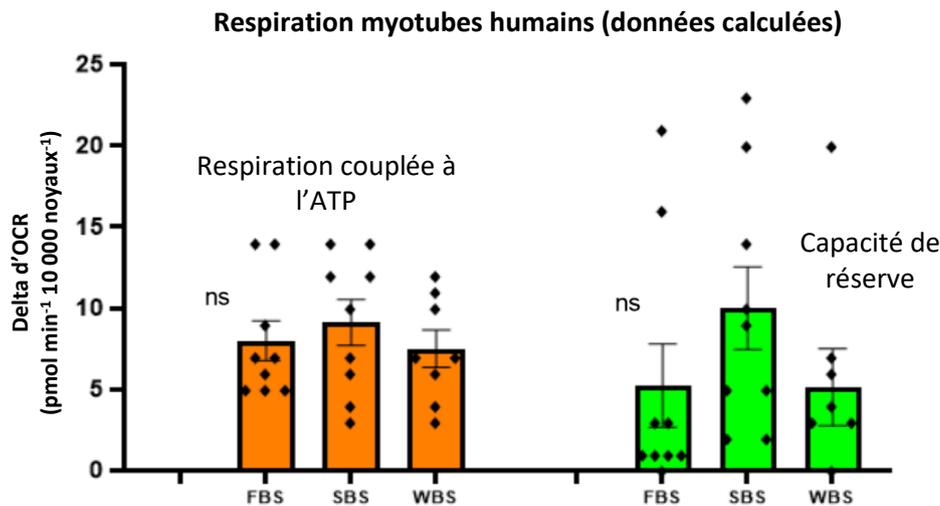


Figure 19 : Part des vitesses de respiration liées à la synthèse d'ATP et estimation de la capacité de réserve à partir des données mesurées dans des myotubes humains traités au sérum d'ours

La respiration couplée à l'ATP (en orange) et capacité de réserve (en vert) sont calculées à partir des paramètres mesurés [voir Figure 10] dans des myotubes humains provenant de 9 sujets différents (n=9) traités 48h avec 5% FBS 5% ou 5% SBS ou 5% WBS. Les données sont exprimées en delta d'OCR (Oxygen Consumption Rate) en pmol min^{-1} et normalisées par 10 000 noyaux. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne (\pm SEM). ns = non significatif

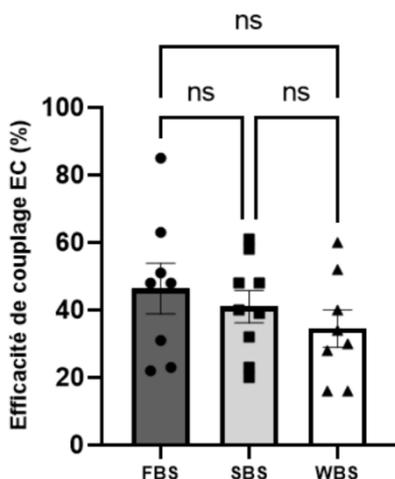


Figure 20 : Efficacité de couplage dans des myotubes humains traités au sérum d'ours

L'efficacité de couplage (EC) est calculée à partir des données de la Figure 10 obtenues sur des myotubes humains provenant de 9 sujets différents (n=9) traités 48h avec 5% FBS ou 5% SBS ou 5% WBS. L'EC est exprimé en pourcentage (%). Les données sont représentées graphiquement par la moyenne (\pm SEM). ns = non significatif

Concernant la part des vitesses de respiration liées à la synthèse d'ATP et l'estimation de la capacité de réserve, il n'y a pas de différences significatives entre les différents traitements [Voir Figure 19]. On note cependant une tendance à la diminution de la respiration couplée à la synthèse d'ATP dans les myotubes humains traités au WBS par rapport au SBS, tendance confirmée par le calcul de l'efficacité de couplage qui tend à être diminué dans les cellules traitées au WBS par rapport au SBS [Voir Figure 20]. On note également une tendance à la diminution de la capacité de réserve, valeur reflétant la capacité à répondre à une demande énergétique, dans les cellules traitées au WBS par rapport au SBS.

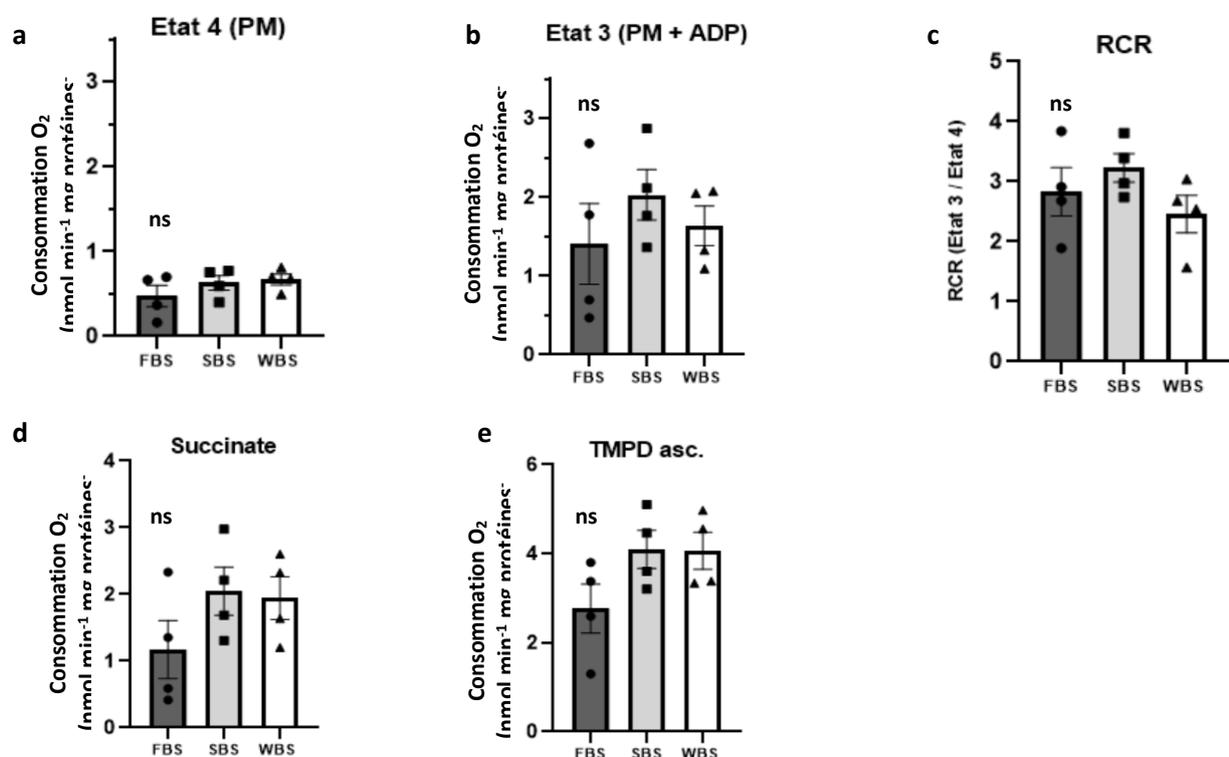


Figure 21 : Respiration mitochondriale mesurée dans des cellules PC3 perméabilisées et traitées au sérum d'ours

Des cellules PC3 sont traités 48h avec 5% FBS ou 5% SBS ou 5% WBS (n=4). La respiration est mesurée à l'aide d'un oxygraphe Oroboros 2K ; **a)** Etat 4 (substrats complexe I pyruvate/malate) ; **b)** Etat 3 (substrats complexe I pyruvate/malate + ADP) ; **c)** Respiratory Control Ratio (Etat 3/Etat 4) ; **d)** Respiration liée au complexe II (succinate) ; **e)** Respiration liée au complexe IV (TMPD + ascorbate). Les données de consommation d'oxygène sont exprimées en nmol/min.mg de protéines. Les données sont représentées par la moyenne (\pm SEM). ns = non significatif.

Mesure de la respiration mitochondriale par l'Oroboros

La respiration mitochondriale a été mesurée par un oxygraphe Oroboros sur des cellules PC3 traitées pendant 48h avec les différents sérums. Le protocole permet avec la séquence d'injection choisie de mesurer la respiration en présence de substrat du complexe I (Etat 4), puis la respiration en présence d'ATP (Etat 3), puis la respiration avec le substrat du complexe II alors que le complexe I est inhibé par la roténone, et enfin la consommation d'oxygène liée directement au fonctionnement du complexe IV. Les résultats sont présentés sur la **Figure 21**.

La consommation d'oxygène mesurée dans des cellules PC3 perméabilisée en présence de substrats du complexe I (pyruvate malate, PM) ne montre pas de différences significatives dans l'Etat 3 et Etat 4 de respiration pour les 3 traitements FBS, SBS, WBS [**Voir Figure 21a et b**]. Le calcul du RCR (respiratory control ratio) ou Etat 3 / Etat 4 est une mesure du couplage de la synthèse d'ATP / flux d'électrons, et montre la capacité des mitochondries à synthétiser de l'ATP. Le RCR n'est pas significativement différent entre les 3 traitements [**Voir Figure 13c**]. On note cependant une tendance à un Etat 3 de respiration et un RCR diminué entre les cellules traitées au WBS par rapport au SBS. Concernant les substrats du complexe II et du complexe IV, respectivement le succinate et le TMPD (+ ascorbate), il n'y a pas de différence significative dans la consommation d'O₂ pour les 3 traitements [**Voir Figure 21d et e**].

Points clés des résultats :

- Les données sont clairement préliminaires, et le nombre d'expérience doit être augmenté pour pouvoir dégager des conclusions solides.
- Le traitement au sérum d'ours augmente significativement la quantité de citrate synthase dans les cellules PC3 et dans la lignée musculaire CLL136, par rapport à la condition de culture standard (5% FBS). Il n'y a pas d'effet différentiel entre le sérum d'ours d'été et d'hiver sur la quantité de citrate synthase dans les 3 lignées étudiées (PC3, HFF-1, CCL136).
- Le traitement des cellules PC3 au sérum d'ours d'hiver diminue significativement une sous-unité du complexe II (succinate déshydrogénase) de la chaîne respiratoire, en comparaison au sérum d'été.
- Il n'a pas été mis en évidence de différences significatives de la respiration mitochondriale dans les myotubes humains et les cellules PC3 traitées au sérum d'ours. Cependant la respiration maximale, la capacité de réserve et l'efficacité de couplage tend à être plus faible dans les myotubes traités au WBS par rapport au SBS. Concernant la respiration mesurée dans les PC3 avec les substrats du complexe I (pyruvate malate), on note également une tendance à une diminution du RCR (Etat 3 / Etat 4) dans les cellules traitées au WBS par rapport à celles traitées avec le SBS.

Discussion et perspectives :

L'effet du sérum d'ours hibernant sur la diminution l'activité MTT [**voir partie 2. MTT et fractionnement du sérum**] suggère une diminution l'activité du complexe I (NADH-déshydrogénase). J'ai donc choisi d'investiguer l'effet du sérum d'ours sur la fonction mitochondriale d'un point de vue quantitatif (quantification de la citrate synthase et des s.u des complexes de la chaîne respiratoire) et fonctionnel (mesure de la respiration mitochondriale).

Des résultats obtenus en 2022 par Hogan et al., ont permis la mise en évidence d'un transfert de phénotype en traitant des adipocytes d'ours prélevé durant la phase active ou hibernation, avec du sérum d'hiver ou d'été (Hogan et al. 2022). Le but de l'étude était de déterminer si le phénotype énergétique cellulaire observé dans les adipocytes d'ours était dû à des facteurs

sériques ou des facteurs cellulaires intrinsèques. La mesure de différents paramètres de la respiration mitochondriale a été effectuée à l'aide d'un analyseur Seahorse. Les adipocytes d'ours traités avec du sérum d'hiver présentaient notamment une respiration maximale plus faible que ceux traités avec le sérum d'ours actif (été). Ces effets ont été inversés avec le sérum de la saison opposée.

J'ai ainsi décidé d'effectuer le même protocole de mesure de l'OCR (oxygen consumption rate) dans des myotubes humains traités au SBS et WBS afin d'investiguer s'il était possible de reproduire ces effets dans différents types cellulaires. Bien que les résultats obtenus ne soient pas significatifs, la tendance à la diminution de la respiration maximale, couplée à la synthèse d'ATP, ainsi que de l'efficacité de couplage (CE) dans les myotubes humains traités au WBS, nous encourage à réfléchir à l'optimisation du protocole utilisé. La problématique principale dans le protocole expérimental était le transport des myotubes cultivés depuis notre laboratoire de Clermont-Ferrand jusqu'à la plateforme de l'ENS de Lyon afin d'effectuer les expériences de mesure de l'OCR avec l'analyseur Seahorse. Il serait judicieux d'envisager dans l'avenir la culture des cellules directement sur place, à l'ENS, afin d'éviter tout transport qui pourrait provoquer un stress pour les cellules.

J'ai dans un premier temps choisi d'utiliser un protocole Mito-Stress standard (d'après la publication de *Hogan et al.*) avec un ajout successif d'oligomycine, de FCCP, et d'un mélange roténone et antimycine dans un milieu standard seahorse XF DMEM ph = 7.4, contenant 10mM de glucose, 2mM de glutamine et 1mM de pyruvate. Il serait intéressant d'effectuer à nouveau le protocole avec un séquence d'injection comprenant en premier lieu l'ajout de pyruvate et malate, substrats du complexe I, compte-tenu de notre hypothèse basée sur la diminution de l'activité du complexe I dans les cellules PC3 traitées au WBS. Il serait également intéressant de mesurer, avec ce protocole, la respiration dans des cellules PC3 traitées au sérum d'ours.

Concernant la respiration mitochondriale, mesurée cette fois ci avec un oxygraphe Oroboros, dans des cellule PC3 traitées au sérum d'ours, le nombre de n (n=4) est insuffisant pour obtenir un résultat significatif. Etant donné la tendance observée avec le traitement au sérum d'hiver, c'est-à-dire une diminution de l'Etat 3 de respiration (avec le substrat pyruvate malate) et du RCR (Respiratory Control Ratio), il serait important de reproduire l'expérience pour confirmer

cette tendance et avoir un nombre n suffisant pour vérifier la présence d'un effet significatif ou non.

En conclusion, bien que les résultats obtenus soient encore préliminaires, nous avons des arguments pour développer de nouveaux protocoles et réitérer certaines expériences, ce qui devrait nous permettre de conclure sur l'effet du sérum d'ours sur la fonction mitochondriale de cellules humaine traitées, notamment concernant l'impact du sérum sur l'activité de la chaîne respiratoire.

Discussion et perspectives :

Les objectifs principaux de mon travail de thèse étaient d'étudier des effets biologiques du sérum d'ours hibernant sur des cellules humaines, ainsi que d'identifier et de caractériser des composés circulants d'intérêt dans le sérum. Deux approches complémentaires, une **ciblée** et une **sans a priori**, ont été mises en œuvre dans le but d'optimiser la recherche de composés actifs circulants. Dans le cadre de l'approche ciblée, j'ai dans un premier temps axé mes recherches autour de dérivés d'acides gras à longue chaîne, les endocannabinoïdes, dont les principaux l'AEA et le 2-AG dérivent de l'acide arachidonique. Les données obtenues ont permis de formuler l'hypothèse que le tonus du système endocannabinoïde était globalement diminué dans les tissus étudiés (muscle et tissu adipeux) chez l'ours hibernant, et en parallèle, j'ai pu mettre en évidence une forte augmentation de l'OEA circulant dans le sérum d'ours hibernant.

L'étude des effets biologiques du sérum d'ours sur des cellules humaines a permis de mettre en avant un effet métabolique, avec une diminution de l'activité NADH-déshydrogénase dans les cellules traitées au WBS. De plus, un effet du WBS sur la fonction mitochondriale est suggéré, avec une diminution de la quantité d'une sous-unité du complexe II (SDH) dans les cellules PC3 traitées au WBS, ainsi qu'une tendance à la réduction de la respiration mitochondriale dans les PC3 et myotubes humains traités au WBS. L'approche sans a priori, basée sur l'étude des effets de fractions de sérum, a été mise en œuvre afin de permettre l'identification et la caractérisation d'un ou de composé(s) actif(s) présent dans le WBS et responsable de l'effet inhibiteur sur la NADH-déshydrogénase. Les données obtenues m'ont permis de mettre en avant une potentielle thermostabilité du ou des composé(s) actif(s). J'ai également pu mettre en évidence que le ou les composé(s) actif(s) n'étaient pas présents dans la fraction du sérum enrichie en albumine, et que les composés lipidiques pourraient être impliqués dans l'activité inhibitrice du WBS sur la NADH-déshydrogénase.

1. Contraintes liées au modèle d'étude

L'ours brun est un modèle d'étude non conventionnel, ce qui représente une problématique dans les procédures expérimentales par rapport aux standards bien définis chez le rongeur de laboratoire. En effet, des outils et des protocoles d'anesthésie et de prélèvements d'échantillons (biopsies) ont dû être adaptés à ce modèle expérimental, la collecte d'échantillons se faisant de plus dans le milieu naturel. L'autre problématique du modèle est liée aux outils de biologie moléculaire et cellulaire, notamment en termes de mesure de l'expression des gènes, ou encore de la quantification de protéines chez ce modèle puisqu'il n'y a pas d'anticorps commerciaux spécifiques à l'ours. Néanmoins, depuis 2018, la publication du génome annoté d'*Ursus arctos* a permis d'accéder à l'étude du transcriptome dans ce modèle animal.

Un avantage de la stratégie qui a été mise en place dans le cadre de ma thèse, est que lorsque l'on étudie le transfert des propriétés du sérum d'ours vers des cellules humaines, le modèle d'étude devient ainsi les cellules receveuses, et on retourne donc sur un modèle humain classique à étudier, avec tous les outils à disposition connus et maîtrisés.

2. Approche ciblée et changements saisonniers dans les endocannabinoïdes circulants

Dans le cadre de l'approche ciblée, nous nous sommes intéressés au système endocannabinoïde, avec les 2 ligands les plus étudiés le N-arachidonoyléthanolamine (AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG), qui pourraient jouer un rôle dans l'hibernation (Vaughn et al. 2010b). Les endocannabinoïdes sont retrouvés dans tous les tissus, organes et fluides corporels étudiés jusqu'à présent. L'AEA et le 2-AG sont tous deux des agonistes endogènes des récepteurs cannabinoïdes, CB1 et CB2, des récepteurs couplés aux protéines G (Hillard 2018).

Les données disponibles dans la littérature indiquent que les endocannabinoïdes circulants proviennent de nombreux organes et tissus : cerveau, foie ou encore du tissu adipeux et musculaire. Certaines hypothèses suggèrent que les endocannabinoïdes sont "relargués" dans la circulation dans un but signal spécifique. A l'opposé, il est également avancé que les

endocannabinoïdes entrent dans la circulation en vertu du fait qu'ils sont hautement lipophiles et peuvent diffuser des organes ou tissus vers la circulation. En d'autres termes, les endocannabinoïdes circulants pourraient être un marqueur indirect de la concentration tissulaire (Hillard 2018).

Chez l'ours, nous avons réalisé la quantification de l'AEA, du 2-AG et de l'OEA dans 2 compartiments : le compartiment circulant (plasma) et tissulaire (muscle et tissu adipeux); parallèlement à une quantification de lipides sériques chez l'ours en hibernation et actif, qui a notamment mis en évidence une diminution de l'acide arachidonique, précurseurs des 2 principaux endocannabinoïdes, le 2-AG et l'AEA. On retrouve ainsi une diminution de l'AEA plasmatique et dans les tissus de l'ours en hibernation (tissu adipeux et muscle). Cependant le niveau de 2-AG qui est fortement diminué dans les tissus, ne diminue pas entre l'hiver et l'été dans le plasma de l'ours brun. Bien que les endocannabinoïdes puissent être mesurés à la fois dans le plasma et le sérum, il a été montré que les concentrations d'AEA sont plus élevées dans le sérum que dans le plasma (Lam et al, 2010) et que les concentrations de 2-AG sont mesurées de manière plus fiable dans le sérum (Hillard et al, 2012). Une partie du 2-AG plasmatique pouvant être relargué par les plaquettes sanguines, il s'agit d'un paramètre à prendre en compte concernant la quantification du 2-AG que nous avons réalisé dans le plasma d'ours, notamment car il a été mis en évidence une réduction du nombre de plaquettes sanguines durant la période d'hibernation (Welinder et al. 2016).

La quantification des principaux endocannabinoïdes circulants et tissulaires, de l'expression des gènes impliqués dans leur biosynthèse et leur dégradation ou encore dans leur signalisation (récepteurs), mettent en évidence une réduction globale du tonus endocannabinoïde durant la période d'hibernation. On retrouve cependant une augmentation très importante de l'OEA (3.3 fois) dans le WBS par rapport au SBS. L'augmentation de ce composé durant une période de jeûne prolongé chez l'ours est particulièrement intéressante, car il est normalement synthétisé par les entérocytes à partir de l'acide oléique apporté par l'alimentation (Brown et al. 2017). Nous avons donc formulé l'hypothèse que l'augmentation de l'OEA durant l'hibernation avait un rôle particulier, potentiellement sur la stimulation de la lipogenèse (Guzmán et al. 2004) ou encore sur le maintien d'un signal anorexigène chez l'ours hibernant.

Les perspectives pouvant être évoquées, portent notamment sur l'élargissement de l'approche ciblée sur d'autres espèces d'endocannabinoïdes comme le palmitoylethanolamide (PEA) ou encore des endocannabinoïdes dérivés des acides gras n-3 comme le docosahexaenylethanolamide (DHEA). L'élargissement de la quantification d'autres espèces d'endocannabinoïdes, permettrait d'identifier des changements saisonniers supplémentaires de ces lipides bioactifs dans la composition du sérum d'ours.

Une stratégie envisageable pour étudier spécifiquement le rôle des composés, dont la concentration circulante diffère entre l'été et l'hiver, serait de tester un sérum d'été complétement ou déprivé en composé d'intérêt, reproduisant ainsi la concentration d'un endocannabinoïde particulier retrouvé dans le sérum d'hiver. Grâce aux données obtenues sur les changements saisonniers dans la composition du sérum, nous pourrions ainsi tester sur des cellules humaines l'implication de certains composés en particulier sur les fonctions métaboliques.

Dans le cadre de l'approche ciblée, la littérature existante a permis d'identifier de nombreux changements saisonniers de composés circulants dans le sérum d'ours. Il a notamment été mis en évidence une augmentation très importante (45 fois) de la Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) dans le sérum d'ours hibernant par rapport au sérum d'ours d'été (Fröbert et al. 2019), avec l'hypothèse que cette protéine pourrait être impliquée dans la régulation de l'hibernation. La SHBG est une protéine qui joue un rôle dans le transport et la biodisponibilité des hormones stéroïdes sexuelles (oestrogènes, testostérone) (Goldštajn et al. 2016). Par ailleurs, la SHBG ursine a récemment été caractérisée et posséderait les mêmes fonctions que la SHBG humaine, notamment la capacité de fixer les stéroïdes (Fröbert et al. 2022). La production d'une SHBG ursine recombinante, déjà réalisé par Fröbert et al., pourrait être utile dans le cadre de l'approche ciblée, afin de compléter le sérum d'été avec une concentration équivalente de SHBG dans le sérum d'hiver. Les effets biologiques que nous pourrions choisir d'explorer, pourraient être liés à la balance protéique dans des myotubes humaines.

3. Approche sans a priori et identification des fractions actives du sérum sur un readout métabolique : l'activité NADH-déshydrogénase

L'approche sans a priori a demandé une mise en œuvre particulière, avec la recherche d'un effet métabolique quantifiable sur les cellules traitées : l'activité NADH-déshydrogénase. L'utilisation du test MTT, pour estimer l'activité de cette enzyme mitochondriale, nous a permis de mettre en évidence un effet inhibiteur du sérum d'ours, qui se produit même lorsque l'on additionne un milieu de culture classique (5% FBS) avec 5% de WBS. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la présence d'un ou de composé(s) circulants bioactifs. L'utilisation de fractions de sérum a été choisie afin de pouvoir identifier plus précisément la nature ou la fraction sérique dans laquelle se retrouve les composés actifs. Nous avons pu mettre en évidence que le ou les composé(s) actifs ne sont pas de nature thermolabile et que la délipidation du sérum entraîne une perte de l'effet inhibiteur du WBS. En revanche, la déplétion de sérum en albumine n'a pas eu d'influence sur ce paramètre. Bien que le protocole doive être amené à évoluer, notamment avec la quantification des protéines dans chaque puits, nous pouvons envisager de multiplier les protocoles de fractionnements, en utilisant d'autres méthodes de déplétion en albumine par exemple, ou encore d'autres méthodes de délipidation. Nous pourrions également rechercher si, parmi les lipides, les endocannabinoïdes ne pourraient pas avoir un effet sur la fonction mitochondriale. En effet, il a été mis en évidence que le récepteur cannabinoïde CB1 était notamment exprimé au niveau mitochondrial, et avait un rôle dans la régulation de la dynamique de ces organites, notamment au niveau des processus de fission (Drori et al. 2019).

De plus, nous envisageons également pour la suite du projet d'utiliser de nouveaux outils, comme des systèmes rapporteurs. Nous avons notamment mis en évidence des changements dans le transcriptome des muscles d'ours hibernant, en particulier au niveau de voies régulant la balance protéique telles que les voies de signalisation TGF- β (Transforming Growth Factor β) et BMP (Bone Morphogenic Protein). Afin d'examiner si le sérum d'ours hibernant est capable de reproduire, *in vitro*, des modifications dans les voies de signalisation TGF- β /BMP, il a été prévu de mettre en place un système rapporteur dans des cellules musculaires humaines (lignée CCL136). Des cellules CCL136 seront transfectées avec un plasmide contenant le gène ID1-luc (couplé à la luciférase), qui est un gène régulé positivement lors de

l'activation de la voie TGF- β , et l'effet respectif du sérum d'ours d'été et d'hiver sera investigué sur l'activité luciférase. Nous pourrions donc par la suite, tester les fractions de sérum afin d'identifier de possibles composés, comme des ligands, capable de réguler l'activité de ces voies de signalisation.

4. Exploration des effets du sérum sur la fonction et la respiration mitochondriale

Un effet du sérum d'ours hibernant sur la fonction mitochondriale a été mis en avant, avec une réduction d'une sous unité du complexe II dans les cellules PC3 traités au sérum d'ours et une tendance à la diminution de la respiration mitochondriale dans ces mêmes cellules ainsi que dans un modèle de culture primaire (myotubes humains). Au vu des résultats encourageants obtenus, il est envisagé de reproduire les expériences, en augmentant notamment le nombre de répétition pour valider ou pas un effet significatif.

Nous pourrions également développer de nouvelles mesures, telles que la mesure de la synthèse d'ATP ou encore l'impact du sérum d'ours hibernant sur d'autres paramètres de la fonction mitochondriale. Bien que cette dernière partie n'ait pas été développée durant ma thèse, il a été envisagé d'étudier l'effet du sérum d'ours sur la dynamique du réseau mitochondrial. L'utilisation de sondes MitroTracker comme le MitoGreen permettrait de marquer les mitochondries, et d'observer au microscope à fluorescence le réseau mitochondrial. Les sondes MitroTracker ne reposent pas sur la présence d'un potentiel de membrane pour le marquage, et sont plutôt des bons marqueurs pour étudier la morphologie des mitochondries, directement sur des cellules vivantes, dans des boîtes de culture adaptées pour une observation au microscope.

De manière complémentaire, nous pourrions également étudier l'effet du sérum d'ours sur la dynamique de fusion et fission mitochondriale, en étudiant en particulier des protéines clés comme les mitofusines (MFN1 / MFN2) et OPA1 (Sauvanet et al. 2010). Les mitofusines sont régulées de manière transcriptionnelles et post-transcriptionnelles alors que OPA1 est régulé de manière post-transcriptionnelle et post-traductionnelle (Wai & Langer 2016). En tenant compte de ces données il serait plutôt indiqué de quantifier l'accumulation des protéines concernées, plutôt que d'étudier l'expression des gènes.

5. Perspectives : utilisation du modèle de l'ours brun hibernant en recherche spatiale

Pour les missions spatiales habitées de longue durée, la réduction du métabolisme des astronautes par l'induction d'une torpeur pourrait changer la donne. La consommation d'eau et de nourriture pourrait être fortement réduite, permettant ainsi de diminuer la charge utile des navettes spatiales. L'état d'hypométabolisme pourrait également protéger de certains processus dégénératifs (préservation des organes) et augmenter la résistance aux rayonnements ionisants (Choukèr et al. 2019). Dans ce contexte, les espèces hibernantes préservent leur masse musculaire, malgré une inactivité physique totale, ce qui pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies pour lutter contre des situations d'atrophie musculaire telle que celles rencontrées durant les voyages spatiaux, où les astronautes sont soumis à l'apesanteur (Bertile et al. 2021). De plus, des expériences datant de la fin des années 60 avaient par ailleurs mis en évidence un phénomène de radioprotection chez les écureuils terrestres durant la période d'hibernation (Musacchia & Barr 1968).

L'hypothermie est un état de refroidissement passif avec une réduction conséquente du métabolisme alors que l'hibernation reflète un état de réduction métabolique endogène contrôlé (avec un maintien de la thermorégulation active). L'induction d'un état d'hypométabolisme endogène chez l'homme pourrait induire une réduction du métabolisme plus efficace que ne le permet l'hypothermie (Lee 2008).

Les mécanismes internes responsables de l'induction d'un état d'hibernation (et donc d'hypométabolisme) restent complexes et ne sont pas encore entièrement identifiés à l'heure actuelle. Des circonstances environnementales défavorables (température froides, privation de lumière, raréfaction des sources alimentaires, ...) semblent être un dénominateur commun pour toutes les espèces d'animaux hibernants. Indépendamment des signaux externes (environnementaux), il est vraisemblable qu'un signal interne ou une cascade de signaux doivent initier et maintenir l'état d'hypométabolisme chez les hibernants. Plusieurs études et articles de revues se sont intéressés à identifier des facteurs spécifiques responsables de l'état d'hibernation chez de petits hibernants (Wang & Lee 2011; Hastings & Ebling 2006; Takamatsu et al. 1993; Horii et al. 2018; Kondo & Sekijima 1998; Fujita et al. 2013; Sekijima et al. 2000; Kondo & Kondo 1992). L'hypothèse de l'existence de composés inducteurs de l'hibernation a été rapportée en 1969 via des expériences de transfusion chez des écureuils (Dawe & Spurrier

1969). Le sang prélevé chez des écureuils (*Ictidomys tridecemlineatus*) et transfusé chez des animaux euthermiques durant la saison estivale, est capable d'induire l'hibernation chez les receveurs en l'absence de conditions environnementales favorables (basses températures notamment). Ces expériences semblent démontrer que des facteurs circulants retrouvés dans le sérum d'animaux hibernants auraient un rôle dans l'induction et le maintien d'un état de torpeur.

Dans le but d'identifier certains des signaux impliqués dans l'induction d'un état de torpeur, des recherches ont investigué le rôle de molécules biochimiques tels que des gaz, des composés opioïdes, des hormones ou dérivés d'hormones. Certains agents biochimiques ont ainsi été identifiés tels que le gaz sulfure d'hydrogène (H₂S), la 5'-adénosine monophosphate (5'-AMP), les thyronamines (TAMs) qui sont des dérivés des hormones thyroïdiennes ainsi que des delta-opioïdes (DOPs) (Dirkes et al. 2015). Cependant, malgré leur découverte et les recherches effectuées sur divers modèles animaux, aucun des agents identifiés ne semble induire un état d'hypométabolisme reproductible chez toutes les espèces. Les tentatives d'induire un hypométabolisme chez des espèces non-hibernantes a principalement porté sur des modèles murins (souris et rats). Il a notamment été mis en évidence que l'exposition de souris à 80 ppm d'H₂S provoque un état d'hypométabolisme chez les animaux, avec une réduction de la consommation d'oxygène avoisinant les 90%, accompagnée d'une diminution d'environ 2°C de la température corporelle (Blackstone et al., 2005). Une étude récente a également montré qu'il était possible d'induire expérimentalement un état de pseudo-hibernation chez des espèces non hibernantes (rats et souris) grâce à la stimulation d'un circuit neuronal hypothalamique particulier contenant une population de neurones appelés «Q-neurones» (Takahashi et al. 2020). Cette étude vient souligner l'implication du système nerveux central et de certains circuits neuronaux dans la contribution à l'hypométabolisme.

Les données sur l'hypométabolisme dans l'espèce humaine restent assez limitées. Une certaine suppression métabolique peut néanmoins se produire dans les états méditatifs profonds (Chaya et al. 2006), et de légères réductions de la thermogenèse se produisent durant des périodes de jeûne prolongés ou chez des nouveau-nés soumis à des situations d'hypoxie (Singer 1999; Müller et al. 2015). L'hypométabolisme est présent dans des lignées assez proches de l'homme comme chez les primates. Certains scientifiques avancent l'hypothèse qu'une capacité ancestrale de torpeur serait encore présente chez l'homme, et

pourrait potentiellement être induite au niveau de l'organisme entier ou dans des tissus et organes humains isolés. Néanmoins, les réductions prononcées de température n'ont à ce jour été observée que chez des espèces de petite taille et de moins de 10kg comme présenté précédemment. Les ours avec une masse similaire à celle d'un humain ne diminuent leur température corporelle que de quelques degrés, mais sont néanmoins capable de diminuer drastiquement leur métabolisme par des processus physiologiques actifs, indépendants de la réduction de la température corporelle. La question de la possibilité de l'hibernation chez l'homme reste encore très débattue, et parmi les arguments avancés, il semblerait peu probable qu'un mammifère comme l'homme, compte tenu de sa taille, puisse être capable de rentrer dans une torpeur profonde. Une hypothèse selon laquelle l'Homme de Néandertal aurait survécu à des hivers rigoureux en hibernant a également été mise en avant par des chercheurs grecs et espagnols, en analysant des squelettes d'hominidés qui présentaient des stigmates caractéristiques d'un état d'hibernation (Bartsiokas & Arsuaga 2020). Les altérations retrouvées au niveau de la morphologie osseuse de ces hominidés pourraient tout simplement être due à une hypothermie non contrôlée lors d'une exposition prolongée au froid.

En conclusion, il apparaît clairement que les animaux hibernants constituent des modèles uniques pour étudier le métabolisme énergétique associé à la préservation des muscles, dans des conditions extrêmes d'inactivité totale et de jeûne prolongé. Ils fournissent des pistes pour des investigations plus approfondies dans le domaine biomédical, y compris des traitements pour l'obésité et les maladies cardiovasculaires, et pour améliorer les conditions de vie des astronautes durant les voyages spatiaux. Les ours semblent être des modèles uniques pour développer de nouvelles méthodes de préservation des organes, et pour étudier la préservation des muscles squelettiques, en condition d'hypothermie modérée et d'inactivité physique complète. En raison de leur proximité phylogénétique importante avec l'homme, l'étude de primates hibernants de la famille des lémuriers, dont la torpeur peut être induite en captivité (Blanco et al. 2021), pourrait présenter un intérêt important dans le domaine du biomimétisme. De plus, l'étude de petits animaux hibernants pourrait représenter un avantage, en raison d'une manipulation facilitée par rapport aux grands hibernants comme l'ours brun. Les mécanismes au niveau moléculaire et cellulaire, à l'origine de la préservation de la masse musculaire pourraient différer entre les petits (marmotte, écureuils) et les grands

hibernants (ours). La préservation de la masse musculaire implique des mécanismes d'épargne protéique spécifiques aux ours hibernants, qui sont indépendant de la réduction de la température corporelle. Par conséquent, il serait intéressant de développer des études comparatives entre les différentes espèces d'animaux hibernants afin d'identifier des mécanismes communs ou plus spécifiques, ce qui pourrait contribuer à élucider les différents mécanismes de protection mis en place chez ces animaux.

Bibliographie :

- Abegglen LM, Caulin AF, Chan A, Lee K, Robinson R, Campbell MS, Kiso WK, Schmitt DL, Waddell PJ, Bhaskara S, Jensen ST, Maley CC & Schiffman JD (2015) Potential Mechanisms for Cancer Resistance in Elephants and Comparative Cellular Response to DNA Damage in Humans. *JAMA* 314, 1850–1860.
- Abnous K, Dieni CA & Storey KB (2008) Regulation of Akt during hibernation in Richardson's ground squirrels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780, 185–193.
- Ahlquist DA, Nelson RA, Steiger DL, Jones JD & Ellefson RD (1984) Glycerol metabolism in the hibernating black bear. *J Comp Physiol B* 155, 75–79.
- Andrews MT (2004) Genes controlling the metabolic switch in hibernating mammals. *Biochemical Society Transactions* 32, 1021–1024.
- Armstrong C & Staples JF (2010) The role of succinate dehydrogenase and oxaloacetate in metabolic suppression during hibernation and arousal. *J Comp Physiol B* 180, 775–783.
- Arnold W, Giroud S, Valencak TG & Ruf T (2015) Ecophysiology of Omega Fatty Acids: A Lid for Every Jar. *Physiology* 30, 232–240.
- Austad SN (2010) Methusaleh's Zoo: how nature provides us with clues for extending human health span. *J Comp Pathol* 142 Suppl 1, S10-21.
- Barger JL, Brand MD, Barnes BM & Boyer BB (2003) Tissue-specific depression of mitochondrial proton leak and substrate oxidation in hibernating arctic ground squirrels. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 284, R1306–R1313.
- Barnes BM (1989) Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 degree C in an Arctic hibernator. *Science* 244, 1593–1595.
- Bartsiokas A & Arsuaga J-L (2020) Hibernation in hominins from Atapuerca, Spain half a million years ago. *L'Anthropologie* 124, 102797.
- Bauer VW, Squire TL, Lowe ME & Andrews MT (2001) Expression of a chimeric retroviral-lipase mRNA confers enhanced lipolysis in a hibernating mammal. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R1186-1192.
- Bazwinsky-Wutschke I, Zipprich A & Dehghani F (2019) Endocannabinoid System in Hepatic Glucose Metabolism, Fatty Liver Disease, and Cirrhosis. *Int J Mol Sci* 20, 2516.
- Bertile F, Hahold C, Le Maho Y & Giroud S (2021) Body Protein Sparing in Hibernators: A Source for Biomedical Innovation. *Front. Physiol.* 12, 634953.
- Beuchat CA & Chong CR (1998) Hyperglycemia in hummingbirds and its consequences for hemoglobin glycation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 120, 409–416.
- Bieber C, Lebl K, Stalder G, Geiser F & Ruf T (2014) Body mass dependent use of hibernation: why not prolong the active season, if they can? *Functional Ecology* 28, 167–177.

- Bitting L, Watson FL, O'Hara BF, Kilduff TS & Heller HC (1999) HSP70 expression is increased during the day in a diurnal animal, the golden-mantled ground squirrel *Spermophilus lateralis*. *Mol Cell Biochem* 199, 25–34.
- Blackstone E, Morrison M & Roth MB (2005) H2S Induces a Suspended Animation-Like State in Mice. *Science* 308, 518–518.
- Blake BH (1972) The annual cycle and fat storage in two populations of golden-mantled ground squirrels. *J Mammal* 53, 157–167.
- Blanco MB, Greene LK, Schopler R, Williams CV, Lynch D, Browning J, Welser K, Simmons M, Klopfer PH & Ehmke EE (2021) On the modulation and maintenance of hibernation in captive dwarf lemurs. *Sci Rep* 11, 5740.
- Bocharova LS, Gordon RYa & Arkhipov VI (1992) Uridine uptake and RNA synthesis in the brain of torpid and awakened ground squirrels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 101, 189–192.
- Boyer BB & Barnes BM (1999) Molecular and Metabolic Aspects of Mammalian Hibernation: Expression of the hibernation phenotype results from the coordinated regulation of multiple physiological and molecular events during preparation for and entry into torpor. *BioScience* 49, 713–724.
- Boyer BB, Barnes BM, Lowell BB & Grujic D (1998) Differential regulation of uncoupling protein gene homologues in multiple tissues of hibernating ground squirrels. *Am J Physiol* 275, R1232–1238.
- van Breukelen F & Martin SL (2001) Translational initiation is uncoupled from elongation at 18 degrees C during mammalian hibernation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R1374–1379.
- Brooks SPJ & Storey KB (1992) Mechanisms of glycolytic control during hibernation in the ground squirrel *Spermophilus lateralis*. *J Comp Physiol B* 162, 23–28.
- Brown JCL, Chung DJ, Belgrave KR & Staples JF (2012) Mitochondrial metabolic suppression and reactive oxygen species production in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 302, R15–R28.
- Brown JCL, Chung DJ, Cooper AN & Staples JF (2013) Regulation of succinate-fuelled mitochondrial respiration in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels. *J Exp Biol* 216, 1736–1743.
- Brown JCL & Staples JF (2015) Mitochondrial Metabolic Suppression in Fasting and Daily Torpor: Consequences for Reactive Oxygen Species Production. *Physiological and Biochemical Zoology*. Available at: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/661639> [Accessed September 7, 2022].
- Brown JCL & Staples JF (2014) Substrate-specific changes in mitochondrial respiration in skeletal and cardiac muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels. *J Comp Physiol B* 184, 401–414.

- Brown JD, Karimian Azari E & Ayala JE (2017) Oleoylethanolamide: A fat ally in the fight against obesity. *Physiol Behav* 176, 50–58.
- Brustovetsky NN, Mayevsky EI, Grishina EV, Gogvadze VG & Amerkhanov ZG (1989) Regulation of the rate of respiration and oxidative phosphorylation in liver mitochondria from hibernating ground squirrels, *Citellus undulatus*. *Comp Biochem Physiol B* 94, 537–541.
- Buck CL & Barnes BM (2000) Effects of ambient temperature on metabolic rate, respiratory quotient, and torpor in an arctic hibernator. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R255–262.
- Buck MJ, Squire TL & Andrews MT (2002) Coordinate expression of the PDK4 gene: a means of regulating fuel selection in a hibernating mammal. *Physiological Genomics* 8, 5–13.
- Buffenstein R, Park TJ & Holmes MM eds. (2021) *The Extraordinary Biology of the Naked Mole-Rat*, Cham: Springer International Publishing. Available at: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-65943-1> [Accessed September 27, 2022].
- Burlington RF & Klain GJ (1967) Gluconeogenesis during hibernation and arousal from hibernation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 22, 701–708.
- Buttgereit F & Brand MD (1995) A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J* 312, 163–167.
- Carey HV, Andrews MT & Martin SL (2003) Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev* 83, 1153–1181.
- Carey HV, Frank CL & Seifert JP (2000) Hibernation induces oxidative stress and activation of NK-kappaB in ground squirrel intestine. *J Comp Physiol B* 170, 551–559.
- Carey HV, Sills NS & Gorham DA (1999) Stress Proteins in Mammalian Hibernation. *American Zoologist* 39, 825–835.
- Cham BE & Knowles BR (1976) A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation. *J Lipid Res* 17, 176–181.
- Chanon S, Chazarin B, Toubhans B, Durand C, Chery I, Robert M, Vieille-Marchiset A, Swenson JE, Zedrosser A, Evans AL, Brunberg S, Arnemo JM, Gauquelin-Koch G, Storey KB, Simon C, Blanc S, Bertile F & Lefai E (2018a) Proteolysis inhibition by hibernating bear serum leads to increased protein content in human muscle cells. *Sci Rep* 8, 1–10.
- Chaya M, Kurpad A, Nagendra H & Nagarathna R (2006) The effect of long term combined yoga practice on the basal metabolic rate of healthy adults. *BMC Complement Altern Med* 6, 28.
- Chayama Y, Ando L, Tamura Y, Miura M & Yamaguchi Y Decreases in body temperature and body mass constitute pre-hibernation remodelling in the Syrian golden hamster, a facultative mammalian hibernator. *Royal Society Open Science* 3, 160002.
- Chazarin B, Storey KB, Ziemianin A, Chanon S, Plumel M, Chery I, Durand C, Evans AL, Arnemo JM, Zedrosser A, Swenson JE, Gauquelin-Koch G, Simon C, Blanc S, Lefai E & Bertile F (2019) Metabolic reprogramming involving glycolysis in the hibernating brown bear skeletal muscle. *Front Zool* 16, 12.

- Chazarin B, Ziemianin A, Evans AL, Meugnier E, Loizon E, Chery I, Arnemo JM, Swenson JE, Gauquelin-Koch G, Simon C, Blanc S, Lefai E & Bertile F (2019) Limited Oxidative Stress Favors Resistance to Skeletal Muscle Atrophy in Hibernating Brown Bears (*Ursus Arctos*). *Antioxidants (Basel)* 8, E334.
- Chen L, Zhang H, Chi M, Yang Q & Guo C (2021) *Drugs for the Treatment of Muscle Atrophy*, IntechOpen. Available at: <https://www.intechopen.com/chapters/undefined/state.item.id> [Accessed September 27, 2022].
- Chen Y, Matsushita M, Nairn AC, Damuni Z, Cai D, Frerichs KU & Hallenbeck JM (2001) Mechanisms for increased levels of phosphorylation of elongation factor-2 during hibernation in ground squirrels. *Biochemistry* 40, 11565–11570.
- Choi J, Hwang J, Jeong Y, Park JM, Lee KH & Hong JW (2015) Biomimetics: forecasting the future of science, engineering, and medicine. *IJN*, 5701.
- Choukèr A, Bereiter-Hahn J, Singer D & Heldmaier G (2019) Hibernating astronauts—science or fiction? *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 471, 819–828.
- Chow BA, Donahue SW, Vaughan MR, McConkey B & Vijayan MM (2013) Serum Immune-Related Proteins are Differentially Expressed during Hibernation in the American Black Bear. *PLOS ONE* 8, e66119.
- Chung D, Lloyd GP, Thomas RH, Guglielmo CG & Staples JF (2011) Mitochondrial respiration and succinate dehydrogenase are suppressed early during entrance into a hibernation bout, but membrane remodeling is only transient. *J Comp Physiol B* 181, 699–711.
- Chung DJ, Szyszka B, Brown JCL, Hüner NPA & Staples JF (2013) Changes in the mitochondrial phosphoproteome during mammalian hibernation. *Physiological Genomics* 45, 389–399.
- Cioloboc D, Arkosi M-K & Silaghi-Dumitrescu R (2013) A new protocol for purifying human serum albumin. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chimia* 2013, 27–32.
- Cooper GM (2000) The Origin and Evolution of Cells. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9841/> [Accessed November 4, 2022].
- Dark J (2005) ANNUAL LIPID CYCLES IN HIBERNATORS: Integration of Physiology and Behavior. *Annual Review of Nutrition* 25, 469–497.
- Dark J, Kilduff TS, Heller HC, Licht P & Zucker I (1990) Suprachiasmatic nuclei influence hibernation rhythms of golden-mantled ground squirrels. *Brain Res* 509, 111–118.
- Dark J, Pickard GE & Zucker I (1985) Persistence of circannual rhythms in ground squirrels with lesions of the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 332, 201–207.
- Darrow JM, Duncan MJ, Bartke A, Bona-Gallo A & Goldman BD (1988) Influence of photoperiod and gonadal steroids on hibernation in the European hamster. *J Comp Physiol A* 163, 339–348.
- Dawe AR & Spurrier WA (1969) Hibernation induced in ground squirrels by blood transfusion. *Science* 163, 298–299.

- Dirkes MC, van Gulik TM & Heger M (2015) The physiology of artificial hibernation. *J Clin Transl Res* 1, 78–93.
- Drew KL, Buck CL, Barnes BM, Christian SL, Rasley BT & Harris MB (2007) Central nervous system regulation of mammalian hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. *J Neurochem* 102, 1713–1726.
- Drew KL, Harris MB, LaManna JC, Smith MA, Zhu XW & Ma YL (2004) Hypoxia tolerance in mammalian heterotherms. *Journal of Experimental Biology* 207, 3155–3162.
- Drori A, Permyakova A, Hadar R, Udi S, Nemirovski A & Tam J (2019) Cannabinoid-1 receptor regulates mitochondrial dynamics and function in renal proximal tubular cells. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 21, 146–159.
- Duffy BM & Staples JF (2022) Arousal from Torpor Increases Oxidative Damage in the Hibernating Thirteen-Lined Ground Squirrel (*Ictidomys tridecemlineatus*). *Physiol Biochem Zool* 95, 229–238.
- Dupont-Versteegden EE, Nagarajan R, Beggs ML, Bearden ED, Simpson PM & Peterson CA (2008) Identification of cold-shock protein RBM3 as a possible regulator of skeletal muscle size through expression profiling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R1263-1273.
- Eddy SF, Morin P & Storey KB (2005) Cloning and expression of PPAR-gamma and PGC-1alpha from the hibernating ground squirrel, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Mol Cell Biochem* 269, 175–182.
- Eddy SF & Storey KB (2003) Differential expression of Akt, PPAR γ , and PGC-1 during hibernation in bats. *Biochemistry and Cell Biology* 81, 269–274.
- Eddy SF & Storey KB (2004) Up-regulation of fatty acid-binding proteins during hibernation in the little brown bat, *Myotis lucifugus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1676, 63–70.
- Evans AL, Singh NJ, Friebe A, Arnemo JM, Laske TG, Frøbert O, Swenson JE & Blanc S (2016) Drivers of hibernation in the brown bear. *Frontiers in Zoology* 13, 7.
- Fedorov VB, Goropashnaya AV, Stewart NC, Tøien Ø, Chang C, Wang H, Yan J, Showe LC, Showe MK & Barnes BM (2014) Comparative functional genomics of adaptation to muscular disuse in hibernating mammals. *Mol Ecol* 23, 5524–5537.
- Fedorov VB, Goropashnaya AV, Tøien Ø, Stewart NC, Chang C, Wang H, Yan J, Showe LC, Showe MK & Barnes BM (2011) Modulation of gene expression in heart and liver of hibernating black bears (*Ursus americanus*). *BMC Genomics* 12, 171.
- Fedorov VB, Goropashnaya AV, Tøien Ø, Stewart NC, Gracey AY, Chang C, Qin S, Pertea G, Quackenbush J, Showe LC, Showe MK, Boyer BB & Barnes BM (2009) Elevated expression of protein biosynthesis genes in liver and muscle of hibernating black bears (*Ursus americanus*). *Physiol Genomics* 37, 108–118.
- Fedotcheva NJ, Sharyshev AA, Mironova GD & Kondrashova MN (1985) Inhibition of succinate oxidation and K⁺ transport in mitochondria during hibernation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 82, 191–195.

- Fezza F, Bari M, Florio R, Talamonti E, Feole M & Maccarrone M (2014) Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules* 19, 17078–17106.
- Florant GL, Hoo-Paris R, Castex C, Bauman WA & Sutter BC (1986) Pancreatic A and B cell stimulation in euthermic and hibernating marmots (*Marmota flaviventris*): effects of glucose and arginine administration. *J Comp Physiol B* 156, 309–314.
- Folk GE, Folk MA & Minor JJ (1972) Physiological Condition of Three Species of Bears in Winter Dens. *Bears: Their Biology and Management* 2, 107.
- Folk GE, Hunt JM & Folk MA (1980) Further Evidence for Hibernation of Bears. *Bears: Their Biology and Management* 4, 43.
- Frerichs KU, Smith CB, Brenner M, DeGracia DJ, Krause GS, Marrone L, Dever TE & Hallenbeck JM (1998) Suppression of protein synthesis in brain during hibernation involves inhibition of protein initiation and elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 14511–14516.
- Frøbert AM, Brohus M, Toews JNC, Round P, Frøbert O, Hammond GL & Overgaard MT (2022) Characterization and comparison of recombinant full-length ursine and human sex hormone-binding globulin. *FEBS Open Bio* 12, 362–378.
- Frøbert O, Frøbert AM, Kindberg J, Arnemo J & Overgaard M (2019) The brown bear as a translational model for sedentary lifestyle related diseases. *Journal of Internal Medicine* 287.
- Fujita S, Okamoto R, Taniguchi M, Ban-Tokuda T, Konishi K, Goto I, Yamamoto Y, Sugimoto K, Takamatsu N, Nakamura M, Shiraki K, Buechler C & Ito M (2013) Identification of bovine hibernation-specific protein complex and evidence of its regulation in fasting and aging. *J Biochem* 153, 453–461.
- Fuster G, Busquets S, Almendro V, López-Soriano FJ & Argilés JM (2007) Antiproteolytic effects of plasma from hibernating bears: a new approach for muscle wasting therapy? *Clin Nutr* 26, 658–661.
- Gallagher K & Staples JF (2013) Metabolism of brain cortex and cardiac muscle mitochondria in hibernating 13-lined ground squirrels *Ictidomys tridecemlineatus*. *Physiol Biochem Zool* 86, 1–8.
- Galster W & Morrison PR (1975) Gluconeogenesis in arctic ground squirrels between periods of hibernation. *Am J Physiol* 228, 325–330.
- Galster WA & Morrison P (1970) Cyclic changes in carbohydrate concentrations during hibernation in the arctic ground squirrel. *Am J Physiol* 218, 1228–1232.
- Gao Y-F, Wang J, Wang H-P, Feng B, Dang K, Wang Q & Hinghofer-Szalkay HG (2012) Skeletal muscle is protected from disuse in hibernating dauria ground squirrels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 161, 296–300.
- Garner JP (2014) The significance of meaning: why do over 90% of behavioral neuroscience results fail to translate to humans, and what can we do to fix it? *ILAR J* 55, 438–456.
- Gehrlich SC & Aprille JR (1988) Hepatic gluconeogenesis and mitochondrial function during hibernation. *Comp Biochem Physiol B* 91, 11–16.

- Geiser F (2004) Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol* 66, 239–274.
- Giroud S, Chery I, Bertile F, Bertrand-Michel J, Tascher G, Gauquelin-Koch G, Arnemo JM, Swenson JE, Singh NJ, Lefai E, Evans AL, Simon C & Blanc S (2019) Lipidomics Reveals Seasonal Shifts in a Large-Bodied Hibernator, the Brown Bear. *Frontiers in Physiology* 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.00389> [Accessed October 6, 2022].
- Giroud S, Evans AL, Chery I, Bertile F, Tascher G, Bertrand-Michel J, Gauquelin-Koch G, Arnemo JM, Swenson JE, Lefai E, Blanc S & Simon C (2018) Seasonal changes in eicosanoid metabolism in the brown bear. *Naturwissenschaften* 105, 58.
- Giroud S, Stalder G, Gerritsmann H, Küber-Heiss A, Kwak J, Arnold W & Ruf T (2018) Dietary Lipids Affect the Onset of Hibernation in the Garden Dormouse (*Eliomys quercinus*): Implications for Cardiac Function. *Front Physiol* 9, 1235.
- Goldštajn MŠ, Toljan K, Grgić F, Jurković I & Baldani DP (2016) Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) as a Marker of Clinical Disorders. *Coll Antropol* 40, 211–218.
- González-Bernardo E, Russo LF, Valderrábano E, Fernández Á & Penteriani V (2020) Denning in brown bears. *Ecol Evol* 10, 6844–6862.
- Goropashnaya AV, Barnes BM & Fedorov VB (2020) Transcriptional changes in muscle of hibernating arctic ground squirrels (*Urocitellus parryii*): implications for attenuation of disuse muscle atrophy. *Sci Rep* 10, 9010.
- Goropashnaya AV, Tøien Ø, Ramaraj T, Sundararajan A, Schilkey FD, Barnes BM, Donahue SW & Fedorov VB (2021) Transcriptional changes and preservation of bone mass in hibernating black bears. *Sci Rep* 11, 8281.
- Græsli AR, Evans AL, Fahlman Å, Bertelsen MF, Blanc S & Arnemo JM (2015) Seasonal variation in haematological and biochemical variables in free-ranging subadult brown bears (*Ursus arctos*) in Sweden. *BMC Vet Res* 11, 301.
- Green CJ, Brosnan JT, Fuller BJ, Lowry M, Stubbs M & Ross BD (1984) Effect of hibernation on liver and kidney metabolism in 13-lined ground squirrels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 79, 167–171.
- Guzmán M, Verme JL, Fu J, Oveisi F, Blázquez C & Piomelli D (2004) Oleoylethanolamide Stimulates Lipolysis by Activating the Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPAR- α). *J. Biol. Chem.* 279, 27849–27854.
- Hall VD, Bartke A & Goldman BD (1982) Role of the testis in regulating the duration of hibernation in the Turkish hamster, *Mesocricetus brandti*. *Biol Reprod* 27, 802–810.
- Hallam SL & Mzilikazi N (2011) Heterothermy in the southern African hedgehog, *Atelerix frontalis*. *J Comp Physiol B* 181, 437–445.
- Hargrove JL (2005) Adipose energy stores, physical work, and the metabolic syndrome: lessons from hummingbirds. *Nutrition Journal* 4, 36.
- Harris RA, Bowker-Kinley MM, Huang B & Wu P (2002) Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Advances in Enzyme Regulation* 42, 249–259.

- Hastings MH & Ebling FJP (2006) Hibernation proteins: preparing for life in the freezer. *Cell* 125, 21–23.
- Healy K, Guillerme T, Finlay S, Kane A, Kelly S, Mcclean D, Kelly D, Donohue I, Jackson A & Cooper N (2014) Ecology and mode-of-life explain lifespan variation in birds and mammals. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 281, 20140298.
- Heldmaier G, Ortman S & Elvert R (2004) Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respir Physiol Neurobiol* 141, 317–329.
- Heller HC (1979) Hibernation: neural aspects. *Annu Rev Physiol* 41, 305–321.
- Hellgren EC (1998) Physiology of Hibernation in Bears. *Ursus* 10, 467–477.
- Herinckx G, Hussain N, Opperdoes FR, Storey KB, Rider MH & Vertommen D (2017) Changes in the phosphoproteome of brown adipose tissue during hibernation in the ground squirrel, *Ictidomys tridecemlineatus*. *Physiol Genomics* 49, 462–472.
- Hershey JD, Robbins CT, Nelson OL & Lin DC (2008) Minimal Seasonal Alterations in the Skeletal Muscle of Captive Brown Bears. *Physiological and Biochemical Zoology* 81, 138–147.
- Hillard CJ (2018) Circulating Endocannabinoids: From Whence Do They Come and Where are They Going? *Neuropsychopharmacology* 43, 155–172.
- Hissa R, Hohtola E, Tuomala-Saramäki T, Laine T & Kallio H (1998) Seasonal changes in fatty acids and leptin contents in the plasma of the European brown bear (*Ursus arctos arctos*). *Annales Zoologici Fennici* 35, 215–224.
- Hissa R, Siekkinen J, Hohtola E, Saarela S, Hakala A & Pudas J (1994) Seasonal patterns in the physiology of the European brown bear (*Ursus arctos arctos*) in Finland. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 109, 781–791.
- Hoehn KL, Hudachek SF, Summers SA & Florant GL (2004) Seasonal, tissue-specific regulation of Akt/protein kinase B and glycogen synthase in hibernators. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, R498-504.
- Hogan HRH, Hutzenbiler BDE, Robbins CT & Jansen HT (2022) Changing lanes: seasonal differences in cellular metabolism of adipocytes in grizzly bears (*Ursus arctos horribilis*). *J Comp Physiol B* 192, 397–410.
- Horak M, Novak J & Bienertova-Vasku J (2016) Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Developmental Biology* 410, 1–13.
- Horii Y, Shiina T & Shimizu Y (2018) The Mechanism Enabling Hibernation in Mammals. *Adv Exp Med Biol* 1081, 45–60.
- Huet O, Petit JM, Ratinaud MH & Julien R (1992) NADH-dependent dehydrogenase activity estimation by flow cytometric analysis of 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Cytometry* 13, 532–539.
- Humphries MM, Thomas DW & Kramer DL (2003a) The Role of Energy Availability in Mammalian Hibernation: A Cost-Benefit Approach. *Physiological and Biochemical Zoology* 76, 165–179.

- Humphries MM, Thomas DW & Kramer DL (2003b) The role of energy availability in Mammalian hibernation: a cost-benefit approach. *Physiol Biochem Zool* 76, 165–179.
- Humphries MM, Thomas DW & Kramer DL (2001) Torpor and digestion in food-storing hibernators. *Physiol Biochem Zool* 74, 283–292.
- Hut RA, Dardente H & Riede SJ (2014) Seasonal Timing: How Does a Hibernator Know When to Stop Hibernating? *Current Biology* 24, R602–R605.
- Ibuka N & Fukumura K (1997) Unpredictable Deprivation of Water Increases the Probability of Torpor in the Syrian Hamster. *Physiology & Behavior* 62, 551–556.
- Im D-S (2021) GPR119 and GPR55 as Receptors for Fatty Acid Ethanolamides, Oleoylethanolamide and Palmitoylethanolamide. *Int J Mol Sci* 22, 1034.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD & Yamamoto M (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13, 76–86.
- JD, A A, Gc O, Pw V, Gm E & Vp M (2005) Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15684048/> [Accessed October 18, 2022].
- Jansen HT, Trojahn S, Saxton MW, Quackenbush CR, Evans Hutzenbiler BD, Nelson OL, Cornejo OE, Robbins CT & Kelley JL (2019) Hibernation induces widespread transcriptional remodeling in metabolic tissues of the grizzly bear. *Commun Biol* 2, 336.
- Jensen BS & Fago A (2021) Sulfide metabolism and the mechanism of torpor. *Journal of Experimental Biology* 224, jeb215764.
- Karpovich S, Tøien Ø, Buck CL & Barnes B (2009) Energetics of arousal episodes in hibernating arctic ground squirrels. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 179, 691–700.
- Katsuoka F, Motohashi H, Engel JD & Yamamoto M (2005) Nrf2 transcriptionally activates the mafG gene through an antioxidant response element. *J Biol Chem* 280, 4483–4490.
- Kilduff TS, Miller JD, Radeke CM, Sharp FR & Heller HC (1990) 14C-2-deoxyglucose uptake in the ground squirrel brain during entrance to and arousal from hibernation. *J Neurosci* 10, 2463–2475.
- Kirkwood JS, Broeckling CD, Donahue S & Prenni JE (2016) A novel microflow LC-MS method for the quantitation of endocannabinoids in serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1033–1034, 271–277.
- Kitchener AC, Bellemain E, Ding X, Kopatz A, Kutschera VE, Salomashkina V, Ruiz-García M, Graves T, Hou Y, Werdelin L & Janke A (2020) Systematics, Evolution, and Genetics of Bears. In V. Penteriani & M. Melletti, eds. *Bears of the World*. Cambridge University Press, pp.3–20. Available at: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/9781108692571%23CN-bp-1/type/book_part [Accessed September 29, 2022].

- Klichkhanov NK, Nikitina ER, Shihamirova ZM, Astaeva MD, Chalabov SI & Krivchenko AI (2021) Erythrocytes of Little Ground Squirrels Undergo Reversible Oxidative Stress During Arousal From Hibernation. *Frontiers in Physiology* 12. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.730657> [Accessed September 8, 2022].
- Kondo N & Kondo J (1992) Identification of novel blood proteins specific for mammalian hibernation. *J Biol Chem* 267, 473–478.
- Kondo N & Sekijima T (1998) P-550 - Hibernation-specific protein as a signal factor for hibernation. *Japanese Journal of Pharmacology* 76, 270.
- Kondo N, Sekijima T, Kondo J, Takamatsu N, Tohya K & Ohtsu T (2006) Circannual control of hibernation by HP complex in the brain. *Cell* 125, 161–172.
- Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC & Huang LE (2004) HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J* 23, 1949–1956.
- Krilowicz BL (1985) Ketone body metabolism in a ground squirrel during hibernation and fasting. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. Available at: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.1985.249.4.R462> [Accessed September 15, 2022].
- Larkin JE & Heller CH (1998) The disappearing slow wave activity of hibernators. *Sleep Res Online* 1, 96–101.
- LeBlanc PJ, Obbard M, Battersby BJ, Felskie AK, Brown L, Wright PA & Ballantyne JS (2001) Correlations of plasma lipid metabolites with hibernation and lactation in wild black bears *Ursus americanus*. *J Comp Physiol B* 171, 327–334.
- Lee BP, Smith M, Buffenstein R & Harries LW (2020) Negligible senescence in naked mole rats may be a consequence of well-maintained splicing regulation. *GeroScience* 42, 633–651.
- Lee CC (2008) Is Human Hibernation Possible? *Annual Review of Medicine* 59, 177–186.
- Lee K, Park JY, Yoo W, Gwag T, Lee J-W, Byun M-W & Choi I (2008) Overcoming muscle atrophy in a hibernating mammal despite prolonged disuse in dormancy: Proteomic and molecular assessment. *Journal of Cellular Biochemistry* 104, 642–656.
- Lee TM, Pelz K, Licht P & Zucker I (1990) Testosterone influences hibernation in golden-mantled ground squirrels. *Am J Physiol* 259, R760-767.
- Lee Y, Miyake S, Wakita H, McMullen DC, Azuma Y, Auh S & Hallenbeck JM (2007) Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 950–962.
- Leenaars CHC, Kouwenaar C, Stafleu FR, Bleich A, Ritskes-Hoitinga M, De Vries RBM & Meijboom FLB (2019) Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates. *Journal of Translational Medicine* 17, 223.
- Li Z, Zhang Z, Ren Y, Wang Y, Fang J, Yue H, Ma S & Guan F (2021) Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology* 22, 165–187.

- Liu N, Williams AH, Kim Y, McAnally J, Bezprozvannaya S, Sutherland LB, Richardson JA, Bassel-Duby R & Olson EN (2007) An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20844–20849.
- Logan SM & Storey KB (2020) Cold-inducible RNA-binding protein Cirp, but not Rbm3, may regulate transcript processing and protection in tissues of the hibernating ground squirrel. *Cell Stress Chaperones* 25, 857–868.
- Lohuis TD, Harlow HJ & Beck TDI (2007) Hibernating black bears (*Ursus americanus*) experience skeletal muscle protein balance during winter anorexia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 147, 20–28.
- Luu BE, Lefai E, Giroud S, Swenson JE, Chazarin B, Gauquelin-Koch G, Arnemo JM, Evans AL, Bertile F & Storey KB (2020) MicroRNAs facilitate skeletal muscle maintenance and metabolic suppression in hibernating brown bears. *J Cell Physiol* 235, 3984–3993.
- Lyman CP & Chatfield PO (1955) Physiology of hibernation in mammals. *Physiol Rev* 35, 403–425.
- Ma Q (2013) Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53, 401–426.
- Ma YL, Zhu X, Rivera PM, Tøien Ø, Barnes BM, LaManna JC, Smith MA & Drew KL (2005) Absence of cellular stress in brain after hypoxia induced by arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289, R1297–R1306.
- Mak IW, Evaniew N & Ghert M (2014) Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res* 6, 114–118.
- Mamady H & Storey KB (2008) Coping with the stress: expression of ATF4, ATF6, and downstream targets in organs of hibernating ground squirrels. *Arch Biochem Biophys* 477, 77–85.
- Manchi S & Swenson JE (2005) Denning behaviour of Scandinavian brown bears *Ursus arctos*. *wbio* 11, 123–132.
- Martin AW & Fuhrman FA (1955) The Relationship between Summated Tissue Respiration and Metabolic Rate in the Mouse and Dog. *Physiological Zoology* 28, 18–34.
- Martin B, Ji S, Maudsley S & Mattson MP (2010) “Control” laboratory rodents are metabolically morbid: Why it matters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6127–6133.
- Martin SL, Maniero GD, Carey C & Hand SC (1999) Reversible depression of oxygen consumption in isolated liver mitochondria during hibernation. *Physiol Biochem Zool* 72, 255–264.
- Mathers KE, McFarlane SV, Zhao L & Staples JF (2017) Regulation of mitochondrial metabolism during hibernation by reversible suppression of electron transport system enzymes. *J Comp Physiol B* 187, 227–234.
- Matsumaru D & Motohashi H (2021) The KEAP1-NRF2 System in Healthy Aging and Longevity. *Antioxidants (Basel)* 10, 1929.

- Mc Auley MT, Guimera AM, Hodgson D, McDonald N, Mooney KM, Morgan AE & Proctor CJ (2017) Modelling the molecular mechanisms of aging. *Biosci Rep* 37, BSR20160177.
- McMullen DC & Hallenbeck JM (2010) Regulation of Akt during torpor in the hibernating ground squirrel, *Ictidomys tridecemlineatus*. *J Comp Physiol B* 180, 927–934.
- Mizzen LA, Chang C, Garrels JI & Welch WJ (1989) Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp 75, a member of the hsp 70 family and hsp 58, a homolog of the bacterial groEL protein*. *Journal of Biological Chemistry* 264, 20664–20675.
- Mokrasch LC, Grady HJ & Grisolia S (1960) Thermogenic and adaptive mechanisms in hibernation and arousal from hibernation. *Am J Physiol* 199, 945–949.
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB & Worm B (2011) How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLOS Biology* 9, e1001127.
- Morin P & Storey KB (2005) Cloning and expression of hypoxia-inducible factor 1alpha from the hibernating ground squirrel, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Biochim Biophys Acta* 1729, 32–40.
- Morin P & Storey KB (2009) Mammalian hibernation: differential gene expression and novel application of epigenetic controls. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 433–442.
- Mountassif D, Kabine M, Latruffe N & El Kebbaj MS (2007) Prehibernation and hibernation effects on the D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase of the heavy and light mitochondria from liver jerboa (*Jaculus orientalis*) and related metabolism. *Biochimie* 89, 1019–1028.
- Mrosovsky N (1990) Circannual cycles in golden-mantled ground squirrels: fall and spring cold pulses. *J Comp Physiol A* 167. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF00192662> [Accessed September 6, 2022].
- Muccioli GG (2010) Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov Today* 15, 474–483.
- Mugahid DA, Sengul TG, You X, Wang Y, Steil L, Bergmann N, Radke MH, Ofenbauer A, Gesell-Salazar M, Balogh A, Kempa S, Tursun B, Robbins CT, Völker U, Chen W, Nelson L & Gotthardt M (2019) Proteomic and Transcriptomic Changes in Hibernating Grizzly Bears Reveal Metabolic and Signaling Pathways that Protect against Muscle Atrophy. *Sci Rep* 9, 19976.
- Mulawa EA, Kirkwood JS, Wolfe LM, Wojda SJ, Prenni JE, Florant GL & Donahue SW (2018) Seasonal Changes in Endocannabinoid Concentrations between Active and Hibernating Marmots (*Marmota flaviventris*). *J Biol Rhythms* 33, 388–401.
- Muleme HM, Walpole AC & Staples JF (2006) Mitochondrial metabolism in hibernation: metabolic suppression, temperature effects, and substrate preferences. *Physiol Biochem Zool* 79, 474–483.
- Müller MJ, Enderle J, Pourhassan M, Braun W, Eggeling B, Lagerpusch M, Glüer C-C, Kehayias JJ, Kiosz D & Bosy-Westphal A (2015) Metabolic adaptation to caloric restriction and subsequent refeeding: the Minnesota Starvation Experiment revisited. *Am J Clin Nutr* 102, 807–819.

- Musacchia XJ & Barr RE (1968) Survival of whole-body-irradiated hibernating and active ground squirrels; *Citellus tridecemlineatus*. *Radiat Res* 33, 348–356.
- Nasoori A, Okamatsu-Ogura Y, Shimozuru M, Sashika M & Tsubota T (2020) Hibernating bear serum hinders osteoclastogenesis in-vitro X.-M. Shi, ed. *PLoS ONE* 15, e0238132.
- Nelson OL & Robbins CT (2015) Cardiovascular function in large to small hibernators: bears to ground squirrels. *J Comp Physiol B* 185, 265–279.
- Nelson RA (1973) Winter sleep in the black bear. A physiologic and metabolic marvel. *Mayo Clin Proc* 48, 733–737.
- Ni Z & Storey KB (2010) Heme oxygenase expression and Nrf2 signaling during hibernation in ground squirrels. *Can J Physiol Pharmacol* 88, 379–387.
- Nizielski SE, Billington CJ & Levine AS (1989) Brown fat GDP binding and circulating metabolites during hibernation and arousal. *Am J Physiol* 257, R536-541.
- Ohta H, Okamoto I, Hanaya T, Arai S, Ohta T & Fukuda S (2006) Enhanced antioxidant defense due to extracellular catalase activity in Syrian hamster during arousal from hibernation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 143, 484–491.
- Oliveira C, Faoro H, Alves LR & Goldenberg S (2017) RNA-binding proteins and their role in the regulation of gene expression in *Trypanosoma cruzi* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet Mol Biol* 40, 22–30.
- Orr AL, Lohse LA, Drew KL & Hermes-Lima M (2009) Physiological oxidative stress after arousal from hibernation in Arctic ground squirrel. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 153, 213–221.
- Osborne PG, Gao B & Hashimoto M (2004) Determination In Vivo of Newly Synthesized Gene Expression in Hamsters During Phases of the Hibernation Cycle. *JJP* 54, 295–305.
- Otis JP, Sahoo D, Drover VA, Yen C-LE & Carey HV (2011) Cholesterol and Lipoprotein Dynamics in a Hibernating Mammal. *PLoS One* 6, e29111.
- Page MM, Peters CW, Staples JF & Stuart JA (2009) Intracellular antioxidant enzymes are not globally upregulated during hibernation in the major oxidative tissues of the 13-lined ground squirrel *Spermophilus tridecemlineatus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 152, 115–122.
- Patnaik P & Sahoo DD (2021) Variations in oxidative stress and antioxidant defense level during different phases of hibernation in common Asian toad, *Duttaphrynus melanostictus*. *Biol Open* 10, bio058567.
- Pehowich DJ & Wang LCH (1984) Seasonal changes in mitochondrial succinate dehydrogenase activity in a hibernator, *Spermophilus richardsonii*. *J Comp Physiol B* 154, 495–501.
- Pier Jr Morin, Ni Z, McMullen DC & Storey KB (2008) Expression of Nrf2 and its downstream gene targets in hibernating 13-lined ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Mol Cell Biochem* 312, 121–129.

- Prendergast B, Freeman D, Zucker I & Nelson R (2002) Periodic arousal from hibernation is necessary for initiation of immune responses in ground squirrels. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 282, R1054-62.
- Price ER, Armstrong C, Guglielmo CG & Staples JF (2013) Selective Mobilization of Saturated Fatty Acids in Isolated Adipocytes of Hibernating 13-Lined Ground Squirrels *Ictidomys tridecemlineatus*. *Physiological and Biochemical Zoology* 86, 205–212.
- Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S & Lodish HF (2006) Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8721–8726.
- Rauch JC & Behrisch HW (1981) Ketone bodies: a source of energy during hibernation. *Can. J. Zool.* 59, 754–760.
- Regan MD, Chiang E, Liu Y, Tonelli M, Verdoorn KM, Gugel SR, Suen G, Carey HV & Assadi-Porter FM (2022) Nitrogen recycling via gut symbionts increases in ground squirrels over the hibernation season. *Science* 375, 460–463.
- Reilly BD & Franklin CE (2016) Prevention of muscle wasting and osteoporosis: the value of examining novel animal models. *Journal of Experimental Biology* 219, 2582–2595.
- Robbins CT, Lopez-Alfaro C, Rode KD, Tjøien Ø & Nelson OL (2012) Hibernation and seasonal fasting in bears: the energetic costs and consequences for polar bears. *Journal of Mammalogy* 93, 1493–1503.
- Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM & Glasebrook AL (1991) An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods* 142, 257–265.
- Rolfe DF & Brown GC (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews* 77, 731–758.
- Ros-Rocher N, Pérez-Posada A, Leger MM & Ruiz-Trillo I The origin of animals: an ancestral reconstruction of the unicellular-to-multicellular transition. *Open Biology* 11, 200359.
- Ruf T & Arnold W (2008) Effects of polyunsaturated fatty acids on hibernation and torpor: a review and hypothesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R1044-1052.
- Ruf T & Geiser F (2015) Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 90, 891–926.
- Sáenz de Miera C, Monecke S, Bartzen-Sprauer J, Laran-Chich M-P, Pévet P, Hazlerigg DG & Simonneaux V (2014) A Circannual Clock Drives Expression of Genes Central for Seasonal Reproduction. *Current Biology* 24, 1500–1506.
- Sauvanet C, Arnauné-Pelloquin L, David C, Belenguer P & Rojo M (2010) Dynamique et morphologie mitochondriales - Acteurs, mécanismes et pertinence fonctionnelle. *Med Sci (Paris)* 26, 823–829.
- Sekijima T, Kondo J, Ohtsu T & Kondo N (2000) Endogenous Changes in Hibernation-specific Protein in Chipmunk Cerebrospinal Fluid. In G. Heldmaier & M. Klingenspor, eds. *Life in the Cold*. Berlin, Heidelberg: Springer, pp.369–376.

- Shao C, Liu Y, Ruan H, Li Y, Wang H, Kohl F, Goropashnaya AV, Fedorov VB, Zeng R, Barnes BM & Yan J (2010) Shotgun proteomics analysis of hibernating arctic ground squirrels. *Mol Cell Proteomics* 9, 313–326.
- Shimozuru M, Nagashima A, Tanaka J & Tsubota T (2016) Seasonal changes in the expression of energy metabolism-related genes in white adipose tissue and skeletal muscle in female Japanese black bears. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 196–197, 38–47.
- Singer D (1999) Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative-physiological approach. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 123, 221–234.
- Snapp BD & Heller HC (1981) Suppression of Metabolism during Hibernation in Ground Squirrels (*Citellus lateralis*). *Physiological Zoology* 54, 297–307.
- Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL & Lilly CM (2002) Invited Review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *Journal of Applied Physiology* 92, 1725–1742.
- Squire TL, Lowe ME, Bauer VW & Andrews MT (2003) Pancreatic triacylglycerol lipase in a hibernating mammal. II. Cold-adapted function and differential expression. *Physiol Genomics* 16, 131–140.
- Srere HK, Wang LC & Martin SL (1992) Central role for differential gene expression in mammalian hibernation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7119–7123.
- Staples JF (2014) Metabolic suppression in mammalian hibernation: the role of mitochondria. *J Exp Biol* 217, 2032–2036.
- Staples JF & Brown JCL (2008) Mitochondrial metabolism in hibernation and daily torpor: a review. *J Comp Physiol B* 178, 811–827.
- Stenvinkel P, Avesani CM, Gordon LJ, Schalling M & Shiels PG (2021) Biomimetics provides lessons from nature for contemporary ways to improve human health. *J Clin Transl Sci* 5, e128.
- Stenvinkel P, Fröbert O, Anderstam B, Palm F, Eriksson M, Bragfors-Helin A-C, Qureshi AR, Larsson T, Friebe A, Zedrosser A, Josefsson J, Svensson M, Sahdo B, Bankir L & Johnson RJ (2013) Metabolic Changes in Summer Active and Anuric Hibernating Free-Ranging Brown Bears (*Ursus arctos*). *PLoS One* 8. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3767665/> [Accessed November 7, 2019].
- Stenvinkel P, Jani AH & Johnson RJ (2013) Hibernating bears (Ursidae): metabolic magicians of definite interest for the nephrologist. *Kidney International* 83, 207–212.
- Stenvinkel P, Painer J, Johnson RJ & Natterson-Horowitz B (2020) Biomimetics – Nature’s roadmap to insights and solutions for burden of lifestyle diseases. *Journal of Internal Medicine* 287, 238–251.
- Stenvinkel P & Shiels PG (2019) Long-lived animals with negligible senescence: clues for ageing research. *Biochem Soc Trans* 47, 1157–1164.
- Stewart GS & Smith CP (2005) Urea nitrogen salvage mechanisms and their relevance to ruminants, non-ruminants and man. *Nutr Res Rev* 18, 49–62.

- Stewart JM, Boudreau NM, Blakely JA & Storey KB (2002) A comparison of oleamide in the brains of hibernating and non-hibernating Richardson's ground squirrel (*Spermophilus richardsonii*) and its inability to bind to brain fatty acid binding protein. *Journal of Thermal Biology* 27, 309–315.
- Storey KB & Storey JM (2004) Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79, 207–233.
- Storey KB & Storey JM (2010) Metabolic rate depression: the biochemistry of mammalian hibernation. *Adv Clin Chem* 52, 77–108.
- Storey KB & Storey JM (2007) Tribute to P. L. Lutz: putting life on 'pause' – molecular regulation of hypometabolism. *Journal of Experimental Biology* 210, 1700–1714.
- Suarez RK & Welch KC (2017) Sugar Metabolism in Hummingbirds and Nectar Bats. *Nutrients* 9, 743.
- Swenson JE, Adamič M, Huber D & Stokke S (2007) Brown bear body mass and growth in northern and southern Europe. *Oecologia* 153, 37–47.
- Tähti H (1978) Seasonal differences in O₂ consumption and respiratory quotient in a hibernator (*Erinaceus europaeus* L.). *Annales Zoologici Fennici* 15, 69–75.
- Takahashi TM, Sunagawa GA, Soya S, Abe M, Sakurai K, Ishikawa K, Yanagisawa M, Hama H, Hasegawa E, Miyawaki A, Sakimura K, Takahashi M & Sakurai T (2020) A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. *Nature* 583, 109–114.
- Takamatsu N, Ohba K, Kondo J, Kondo N & Shiba T (1993) Hibernation-associated gene regulation of plasma proteins with a collagen-like domain in mammalian hibernators. *Mol Cell Biol* 13, 1516–1521.
- Tamura Y, Shintani M, Nakamura A, Monden M & Shiomi H (2005) Phase-specific central regulatory systems of hibernation in Syrian hamsters. *Brain Research* 1045, 88–96.
- Tang Z, Chen B & Niu C (2021) Antioxidant defense response during hibernation and arousal in Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* juveniles. *Cryobiology* 99, 46–54.
- Tashima LS, Adelstein SJ & Lyman CP (1970) Radioglucose utilization by active, hibernating, and arousing ground squirrels. *Am J Physiol* 218, 303–309.
- Tessier SN, Breedon SA & Storey KB (2021) Modulating Nrf2 transcription factor activity: Revealing the regulatory mechanisms of antioxidant defenses during hibernation in 13-lined ground squirrels. *Cell Biochem Funct* 39, 623–635.
- Tessier SN & Storey KB (2012) Myocyte enhancer factor-2 and cardiac muscle gene expression during hibernation in thirteen-lined ground squirrels. *Gene* 501, 8–16.
- Tian X, Azpurua J, Hine C, Vaidya A, Myakishev-Rempel M, Ablaeva J, Mao Z, Nevo E, Gorbunova V & Seluanov A (2013) High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. *Nature* 499, 346–349.
- Tinker DB, Harlow HJ & Beck TD (1998) Protein use and muscle-fiber changes in free-ranging, hibernating black bears. *Physiol Zool* 71, 414–424.

- Tøien Ø null, Drew KL, Chao ML & Rice ME (2001) Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R572-583.
- Tøien Ø, Blake J, Edgar DM, Grahn DA, Heller HC & Barnes BM (2011) Hibernation in black bears: independence of metabolic suppression from body temperature. *Science* 331, 906–909.
- Trachsel L, Edgar DM & Heller HC (1991) Are ground squirrels sleep deprived during hibernation? *Am J Physiol* 260, R1123-1129.
- Twente JW & Twente JA (1967) Concentrations of D-Glucose in The Blood of Citellus Lateralis After Known Intervals of Hibernating Periods. *Journal of Mammalogy* 48, 381–386.
- Ueda S & Ibuka N (1995) An analysis of factors that induce hibernation in Syrian hamsters. *Physiology & Behavior* 58, 653–657.
- Varga T, Czimmerer Z & Nagy L (2011) PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1812, 1007–1022.
- Vaughn LK, Denning G, Stuhr KL, de Wit H, Hill MN & Hillard CJ (2010a) Endocannabinoid signalling: has it got rhythm? *Br J Pharmacol* 160, 530–543.
- Vuarin P, Dammhahn M & Henry P-Y (2013) Individual flexibility in energy saving: body size and condition constrain torpor use. *Functional Ecology* 27, 793–799.
- van der Vusse GJ (2009) Albumin as Fatty Acid Transporter. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 24, 300–307.
- Wai T & Langer T (2016) Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27, 105–117.
- Wang LCH & Lee TF (2011) Torpor and Hibernation in Mammals: Metabolic, Physiological, and Biochemical Adaptations. In *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp.507–532. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cphy.cp040122> [Accessed August 24, 2022].
- Wang LCH & Wolowyk MW (1988) Torpor in mammals and birds. *Can. J. Zool.* 66, 133–137.
- Wang Y-X (2010) PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res* 20, 124–137.
- Watts PD, Øritsland NA, Jonkel C & Ronald K (1981) Mammalian hibernation and the oxygen consumption of a denning black bear (*Ursus americanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 69, 121–123.
- Wei Y, Zhang J, Xu S, Peng X, Yan X, Li X, Wang H, Chang H & Gao Y Controllable oxidative stress and tissue specificity in major tissues during the torpor–arousal cycle in hibernating Daurian ground squirrels. *Open Biology* 8, 180068.
- Weitten M (2015) *Adaptations métaboliques et influence du régime alimentaire chez un hibernant food-storing*. phdthesis. Université de Strasbourg. Available at: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01394370> [Accessed September 28, 2022].

- Welinder KG, Hansen R, Overgaard MT, Brohus M, Sønderkær M, von Bergen M, Rolle-Kampczyk U, Otto W, Lindahl TL, Arinell K, Evans AL, Swenson JE, Revsbech IG & Frøbert O (2016) Biochemical Foundations of Health and Energy Conservation in Hibernating Free-ranging Subadult Brown Bear *Ursus arctos**. *Journal of Biological Chemistry* 291, 22509–22523.
- Williams DR, Epperson LE, Li W, Hughes MA, Taylor R, Rogers J, Martin SL, Cossins AR & Gracey AY (2005) Seasonally hibernating phenotype assessed through transcript screening. *Physiol Genomics* 24, 13–22.
- Wilson BE, Deeb S & Florant GL (1992) Seasonal changes in hormone-sensitive and lipoprotein lipase mRNA concentrations in marmot white adipose tissue. *Am J Physiol* 262, R177–181.
- Yan J, Barnes BM, Kohl F & Marr TG (2008) Modulation of gene expression in hibernating arctic ground squirrels. *Physiol Genomics* 32, 170–181.
- Yan J, Burman A, Nichols C, Alila L, Showe LC, Showe MK, Boyer BB, Barnes BM & Marr TG (2006) Detection of differential gene expression in brown adipose tissue of hibernating arctic ground squirrels with mouse microarrays. *Physiol Genomics* 25, 346–353.
- Yin Q, Ge H, Liao C-C, Liu D, Zhang S & Pan Y-H (2016) Antioxidant Defenses in the Brains of Bats during Hibernation. *PLOS ONE* 11, e0152135.
- Zervanos SM, Maher CR & Florant GL (2014) Effect of Body Mass on Hibernation Strategies of Woodchucks (*Marmota monax*). *Integrative and Comparative Biology* 54, 443–451.
- Zhang G (2012) Biomimicry in biomedical research. *Organogenesis* 8, 101–102.
- Zimmerman ML (1982) Carbohydrate and torpor duration in hibernating golden-mantled ground squirrels (*Citellus lateralis*). *J Comp Physiol B* 147, 129–135.
- Zimny ML & Tyrone V (1957) Carbohydrate metabolism during fasting and hibernation in the ground squirrel. *Am J Physiol* 189, 297–300.

Annexes :

Article

Concurrent BMP Signaling Maintenance and TGF- β Signaling Inhibition Is a Hallmark of Natural Resistance to Muscle Atrophy in the Hibernating Bear

Laura Cussonneau ^{1,*} , Christian Boyer ¹, Charlotte Brun ², Christiane Deval ¹, Emmanuelle Loizon ³, Emmanuelle Meugnier ³, Elise Gueret ^{4,5} , Emeric Dubois ^{4,5} , Daniel Taillandier ¹, Cécile Polge ¹ , Daniel Béchet ¹ , Guillemette Gauquelin-Koch ⁶, Alina L. Evans ⁷, Jon M. Arnemo ^{7,8}, Jon E. Swenson ⁹, Stéphane Blanc ², Chantal Simon ³ , Etienne Lefai ¹ , Fabrice Bertile ²  and Lydie Combaret ^{1,*} 

- ¹ INRAE, Unité de Nutrition Humaine, Université Clermont Auvergne, UMR 1019, F-63000 Clermont-Ferrand, France; christian.boyer@inrae.fr (C.B.); christiane.deval@inrae.fr (C.D.); daniel.taillandier@inrae.fr (D.T.); cecile.polge@inrae.fr (C.P.); daniel.bechet@inrae.fr (D.B.); etienne.lefai@inrae.fr (E.L.)
- ² Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France; charlotte.brun@etu.unistra.fr (C.B.); stephane.blanc@iphc.cnrs.fr (S.B.); fbertile@unistra.fr (F.B.)
- ³ CarMen Laboratory, INSERM 1060, INRAE 1397, University of Lyon, F-69600 Oullins, France; emmanuelle.loizon@inserm.fr (E.L.); emmanuelle.meugnier@univ-lyon1.fr (E.M.); chantal.simon@univ-lyon1.fr (C.S.)
- ⁴ Institut de Génétique Fonctionnelle (IGF), University Montpellier, CNRS, INSERM, 34094 Montpellier, France; elise.gueret@mgx.cnrs.fr (E.G.); emeric.dubois@mgx.cnrs.fr (E.D.)
- ⁵ Montpellier GenomiX, France Génomique, 34095 Montpellier, France
- ⁶ Centre National d'Etudes Spatiales, CNES, 75001 Paris, France; guillemette.gauquelin Koch@cnes.fr
- ⁷ Department of Forestry and Wildlife Management, Inland Norway University of Applied Sciences, Campus Evenstad, NO-2480 Koppang, Norway; alina.evans@inn.no (A.L.E.); jon.arnemo@inn.no (J.M.A.)
- ⁸ Department of Wildlife, Fish, and Environmental Studies, Swedish University of Agricultural Sciences, SE-901 83 Umeå, Sweden
- ⁹ Faculty of Environmental Sciences and Natural Resource Management, Norwegian University of Life Sciences, NO-1432 Ås, Norway; jon.swenson@nmbu.no
- * Correspondence: Laura.cussonneau@inrae.fr (L.C.); Lydie.combaret@inrae.fr (L.C.); Tel.: +(33)4-7362-4824 (Lydie Combaret)



Citation: Cussonneau, L.; Boyer, C.; Brun, C.; Deval, C.; Loizon, E.; Meugnier, E.; Gueret, E.; Dubois, E.; Taillandier, D.; Polge, C.; et al. Concurrent BMP Signaling Maintenance and TGF- β Signaling Inhibition Is a Hallmark of Natural Resistance to Muscle Atrophy in the Hibernating Bear. *Cells* **2021**, *10*, 1873. <https://doi.org/10.3390/cells10081873>

Academic Editors: Maria Pennuto and Marco Pirazzini

Received: 16 June 2021
Accepted: 20 July 2021
Published: 23 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Muscle atrophy arises from a multiplicity of physio-pathological situations and has very detrimental consequences for the whole body. Although knowledge of muscle atrophy mechanisms keeps growing, there is still no proven treatment to date. This study aimed at identifying new drivers for muscle atrophy resistance. We selected an innovative approach that compares muscle transcriptome between an original model of natural resistance to muscle atrophy, the hibernating brown bear, and a classical model of induced atrophy, the unloaded mouse. Using RNA sequencing, we identified 4415 differentially expressed genes, including 1746 up- and 2369 down-regulated genes, in bear muscles between the active versus hibernating period. We focused on the Transforming Growth Factor (TGF)- β and the Bone Morphogenetic Protein (BMP) pathways, respectively, involved in muscle mass loss and maintenance. TGF- β - and BMP-related genes were overall down- and up-regulated in the non-atrophied muscles of the hibernating bear, respectively, and the opposite occurred for the atrophied muscles of the unloaded mouse. This was further substantiated at the protein level. Our data suggest TGF- β /BMP balance is crucial for muscle mass maintenance during long-term physical inactivity in the hibernating bear. Thus, concurrent activation of the BMP pathway may potentiate TGF- β inhibiting therapies already targeted to prevent muscle atrophy.

Keywords: brown bear hibernation; mouse unloading; muscle atrophy; physical inactivity; RNA sequencing; TGF- β /BMP signaling

1. Introduction

Muscle atrophy is defined as a loss of muscle mass and strength and is associated with adverse health outcomes, such as an autonomy decline and an increase in morbidity and mortality in many catabolic conditions (e.g., cancer cachexia, heart, and kidney failure, fasting, sepsis, injury, aging, or physical inactivity, etc.) [1–5]. Given the increase in sedentary behavior and improvement in life expectancy, and with to date still no proven therapeutic or preventive treatment to date, muscle atrophy remains a major public health issue (World Health Organization data) [6]. Skeletal muscle tissue represents an important reservoir of amino acids, which are mobilized during catabolic situations to preserve vital functions, resulting in an imbalance of contractile protein turnover (i.e., proteolysis exceeding protein synthesis) [7,8]. Catabolic stimuli (e.g., oxidative stress, endoplasmic reticulum disturbances, nutrient shortage, mitochondrial disruptions, etc.) activate a complex network of intracellular modulators, which in turn lead to the activation of the ubiquitin-proteasome system (UPS) and autophagy [9,10]. These two main proteolytic systems in muscle tissue involve a set of genes, i.e., atrogenes, whose expression at the mRNA levels is commonly altered during atrophy [11]. Cascades of events and players of muscle atrophy are well described and conserved in mammals [12,13] and include the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, with TGF- β signaling acting as a negative regulator, and Bone Morphogenetic Proteins (BMP) signaling as a positive regulator of muscle mass [14]. The TGF- β pathway mediates muscle atrophy through cytoplasmic and nuclear signaling molecules SMAD2/3, mainly leading to the expression of the atrogenes TRIM63 (MuRF1) and FBXO32 (atrogin-1) [15]. Constitutive expression of SMAD3 triggers muscle wasting, and inhibition of SMAD2 and SMAD3 is sufficient to induce muscle growth in vivo [16–19]. Conversely, the BMP pathway mediates muscle mass maintenance through cytoplasmic and nuclear signaling molecules SMAD1/5/9, promoting a negative transcriptional regulation for a ubiquitin ligase required for muscle wasting, FBXO30 (MUSA1) [20], and increasing the expression of BMP receptors activity in muscles induced hypertrophy through Smad1/5-mediated activation of mTOR signaling [21].

Hibernating bears (Ursidae family) are naturally resistant to muscle atrophy when facing the two major atrophic inducers, prolonged fasting and physical inactivity up to 5–7 months [22,23]. Conversely and during a shorter period, a loss of muscle mass and volume prevails in rodent models [24–29] and humans [4,5]. As in rodent models, the muscles of the active bear are sensitive to disuse after denervation, whereas the muscles of the hibernating brown bear (*Ursus arctos*) are resistant [30]. The hibernating brown bear, therefore, appears as a suitable model to study the underlying mechanisms of muscle mass maintenance [31]. How it withstands muscle loss in conditions where muscle atrophy is expected in non-hibernating mammals remains to be fully elucidated. However, several hypotheses can be raised; our recent analysis of muscle proteome in the hibernating brown bear revealed the maintenance of glycolysis and a turning down of ATP turnover [32]. In addition, we reported (i) a myogenic microRNA signature prone to promoting muscle regeneration and suppressing ubiquitin ligase expression in bear muscle during winter [33], as well as (ii) limited levels of oxidative stress [34]. To unravel the molecular basis of muscle maintenance at the mRNA level, the bear muscle transcriptome has already been explored using cDNA microarrays [35] or RNA sequencing [36,37]. These two transcriptomic studies suggested an overall reduction in energy and protein metabolism, consistent with metabolic suppression and lower energy demand in skeletal muscle during hibernation. Although these studies focused on the changes in bear muscle transcriptome during the hibernating versus active period, our study aimed to compare them with those that occur in the muscle transcriptome of disuse-induced atrophy in a mouse model. The rationale for such a comparative analysis of two contrasted situations of muscle atrophy or maintenance lies in the identification of potential new candidates, beyond already reported metabolic factors [35–37], that may help the hibernating bear resist atrophy, thereby providing new targets for fighting muscle atrophy in humans. Among the transcription factors involved in the regulation of the differentially expressed genes highlighted in bear muscle between

the hibernation and active periods, eight were involved in the regulation of the TGF- β superfamily. We therefore subsequently focused on an in-depth analysis of the TGF- β and BMP intracellular pathways.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Experiments

2.1.1. Bear Sample Collection

Biopsies from the vastus lateralis muscle were collected from 17 free-ranging brown bears, 2–3 years old (*Ursus arctos*; 11 females and 6 males), from Dalarna and Gävleborg counties, Sweden, from 2014 to 2019 (Table S6). The samples were immediately frozen on dry ice until storage at -80 °C. In a given year, the same bears were captured during winter hibernation (February) and recaptured during their active period (June). The study was approved by the Swedish Ethical Committee on Animal Experiment (applications Dnr C3/2016 and Dnr C18/2015), the Swedish Environmental Protection Agency (NV-0741-18), and the Swedish Board of Agriculture (Dnr 5.2.18–3060/17). All procedures complied with Swedish laws and regulations. Capture, anesthesia, and sampling were carried out according to an established biomedical protocol [38].

2.1.2. Mouse Model of Hindlimb Unloading

Our objective was to compare the muscle transcriptome of the hibernating bear with that in a rodent model of long-term physical inactivity. We chose the 10-day mouse model of unloading as an established disuse-atrophy model, with atrophic pathways still activated [28,39]. All experiments were conducted with the approval of the regional ethics committee (agreement n° D6334515) following the European Directive 2010/63/EU on the protection of vertebrate animals used for experimental and scientific purposes. This study was performed with 12 C57BL6/J adult male mice purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). They were housed by pairs upon arrival in a polycarbonate cage in a controlled room (22 ± 2 °C, $60\% \pm 5\%$ humidity, 12 h light/dark cycle, light period starting at 8 h), fed ad libitum, and given free access to water.

After 10 days of acclimatization, the mice were either kept unsuspending (Control, $n = 6$) or subjected to hindlimb unloading through tail suspension (Unloaded, $n = 6$) for 10 days. Custom tail suspension cages were adapted from previous studies [40,41]. The cages ($43 \times 29 \times 24$ cm) have an overhead frame to which two suspension systems are fixed in parallel on the width of the cage. These suspension systems are widely spaced in a cage so that mice can always be housed in pairs without touching each other. Unloaded mice had a metal ring attached near the base of their tails using surgical adhesive tape. This ring was then attached to a swivel that allowed a 360-degree rotation and was attached on a rail that covered the upper width of the cage. The height of the swivel has been adjusted to keep the mouse at an angle of about 30° from the head so that the hindlimbs could not touch the ground or the walls. During the 10 days of unloading, mice showed only a very small body weight loss ($<7\%$) that occurred within the first 3 days, with no change in food intake. At the end of the experiment, soleus muscles were rapidly dissected out and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analyses. As for the data used from the RNA sequencing of Zhang et al. [42], the soleus muscle atrophied by 37% (from 7.24 ± 0.27 mg in control mice to 4.58 ± 0.31 mg in unloaded mice, $p < 0.001$ according to the unpaired Student's *t*-test).

2.2. RNA Sequencing of Brown Bear Muscle

2.2.1. RNA Isolation

Total RNA from bear muscles was isolated as described [43]. Briefly, muscle RNA from six bears (paired samples collected in summer and winter in a given year for the same individual) was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Courtaboeuf, France).

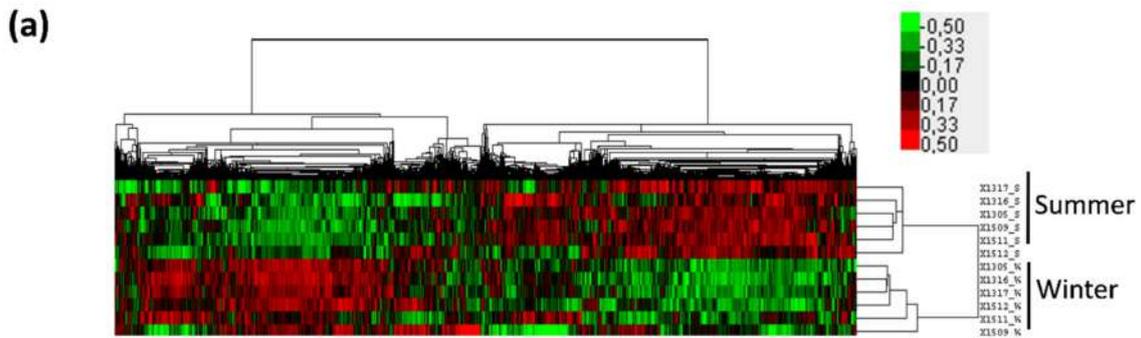
2.2.2. Illumina RNA Sequencing, Data Assembly, Statistical Analysis

We constructed RNA-Seq libraries with the Truseq stranded mRNA sample preparation kit from Illumina and sequenced them in two lanes on an Illumina HiSeq2500 (single-end, 50 bp, six libraries per lane). Image analyses and base calling were performed using the HiSeq Control Software (v2.2.70, Illumina, San Diego, CA, USA) and Real-Time Analysis component (v1.18.66.4, Illumina, San Diego, CA, USA). Demultiplexing was performed using Illumina's conversion software (bcl2fastq 2.20). The quality of the raw data were assessed using FastQC from the Babraham Institute and the Illumina software SAV (Sequencing Analysis Viewer, Illumina, San Diego, CA, USA). A splice junction mapper, TopHat 2.1.1 [44] (using Bowtie 2.3.5.1 [45], Johns Hopkins University, MD, USA), was used to align the RNA-Seq reads to the *Ursus arctos* genome (GCA_003584765.1 ASM358476v1 assembly downloaded from NCBI) with a set of gene model annotations (GCF_003584765.1_ASM358476v1_genomic.gff downloaded on 17 June 2019, from NCBI). Final read alignments having more than three mismatches were discarded. Samtools (v1.9) (<http://samtools.sourceforge.net>) was used to sort the alignment files. Then, the gene quantification was performed with Featurecounts 1.6.2 (<http://subread.sourceforge.net/>) [46]. As the data were from a strand-specific assay, the read had to be mapped to the opposite strand of the gene (-s 2 option). Before statistical analysis, genes with less than 30 reads (cumulating over all the analyzed samples) were filtered out. Differentially expressed genes were identified using the Bioconductor (<https://bioconductor.org/>) [47] package DESeq2 1.26.0 [48] (R version 3.6.1 <https://www.r-project.org/>). Data were normalized using the DESeq2 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>, accessed on 16 June 2021) normalization method. Genes with an adjusted *p*-value below 5% (according to the Benjamini–Hochberg procedure that controls the FDR) were declared differentially expressed.

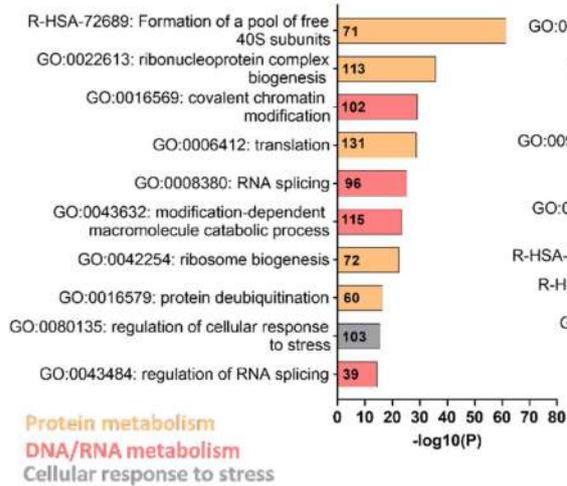
2.2.3. Functional and Pathway Enrichment Analysis

Hierarchical clustering of bear transcriptomic data (log-transformed) was performed using Cluster v3.0 software (University of Tokyo, Tokyo, Japan) from the 13531 reads [49]. Parameters were set as follows: median centering and normalization of genes for adjusting data and centroid linkage clustering for both genes and arrays. Dendrograms were generated and viewed using the Java Treeview v1.3.3 program (Alok Saldanha, Stanford University, Stanford, CA, USA) [50]. To identify the differentially expressed genes (DEGs), we selected a fold change (FC) Winter/Summer $> |1.3|$ or $< |0.77|$ and an adjusted *p*-value $< |0.01|$ as cut-off standards, for the up- and down-regulated genes, respectively. Visualization of functional enrichment was performed using Metascape [51], a web-based portal for visualizing the inference of enriched biological pathways among the DEGs. For the given DEGs gene list, pathway and process enrichment analysis has been carried out with the following ontology sources: KEGG Pathway, GO Biological Processes, Reactome Gene Sets, Canonical Pathways, CORUM, TRRUST, DisGeNET, PaGenBase, Transcription Factor Targets, WikiPathways, PANTHER Pathway, and COVID. All genes in the genome have been used as the enrichment background. Terms with a *p*-value < 0.01 , a minimum count of 3, and an enrichment factor > 1.5 (the enrichment factor is the ratio between the observed counts and the counts expected by chance) are collected and grouped into clusters based on their membership similarities. More specifically, *p*-values are calculated based on the accumulative hypergeometric distribution, and *q*-values are calculated using the Benjamini–Hochberg procedure to account for multiple testings. Kappa scores are used as the similarity metric when performing hierarchical clustering on the enriched terms, and sub-trees with a similarity of > 0.3 are considered a cluster. The most statistically significant term within a cluster is chosen to represent the cluster. The 10 top-score enrichment terms from that analysis are shown in Figure 1b,c, and the 10 top-score enrichment transcription factors regulating the DEGs are shown in Figure 1d. The heat map representing the expression changes of the TGF- β /BMP gene sets in bear versus mouse muscles was made using the Pheatmap package (R 1.4.1106, University of Tartu, Tartu, Estonia). Briefly,

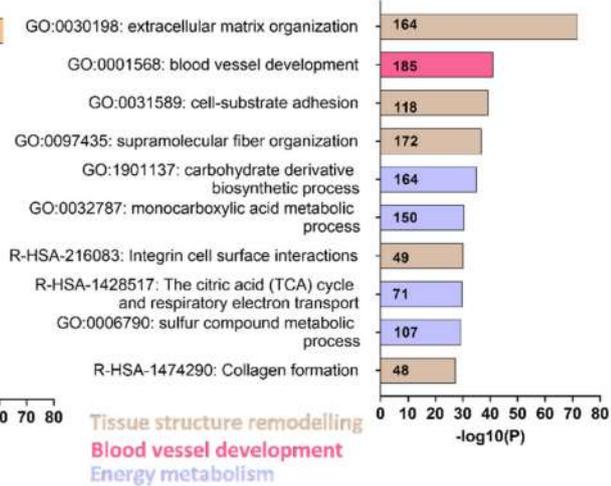
the gene hierarchical clustering is based on Euclidean distance calculated from the log2FC value (Winter/Summer and Unloaded/Control for bear and mouse muscles, respectively).



(b) 10 top-score enriched terms from the 1746 upregulated DEGs



(c) 10 top-score enriched terms from the 2369 downregulated DEGs



(d)

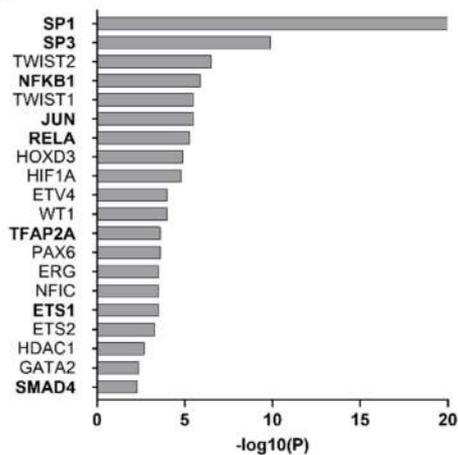


Figure 1. Deep changes in brown bear muscle transcriptome during hibernation. **(a)** Heatmap from brown bear muscle (vastus lateralis) transcripts ($n = 6$ bears/season, the same individuals were sampled and analyzed in summer and winter); red indicates high and green indicates low expression level of the 13531 genes. **(b)** Graph representing the 10 top-score of significantly enriched

terms in winter compared to summer, from the 1746 up-regulated differentially expressed genes (DEGs) ($FC\ W/S > |1.3|$ and $padj < |0.01|$) or (c) from the 2369 down-regulated DEGs ($FC\ W/S < |0.77|$ and $padj < |0.01|$; Table S1). The color code for the functional cluster is indicated in the respective graphs, and the bold numbers in the different bars represent the numbers of DEGs found in the enriched terms. (d) Graph representing the 10 top-score of transcription factors involved in DEGs regulation from “Formation of a pool of free 40S subunits” and “Extracellular matrix organization” enriched terms. The bold TFs are involved in TGF- β superfamily regulation.

2.3. Transcriptomic Data Assembly and Statistical Analysis of Mouse Muscle

We used transcriptomic data from an already published study [42]. Briefly, in this study, C57BL6/J adult male mice were either kept unsuspended (Control, $n = 4$) or subjected to hindlimb unloading through tail suspension (Unloaded, $n = 4$) for 10 days. The fastq files of eight soleus muscles were downloaded from GEO (GSE102284). A splice junction mapper, TopHat 2.1.1 (Johns Hopkins University, MD, USA) [44], was used to align the RNA-Seq reads to the mouse genome (UCSC mm10) with a set of gene model annotations (genes.gtf downloaded from UCSC on 29 October 2019; GeneIDs come from the NCBI gene2refseq file). Final read alignments having more than three mismatches were discarded. Samtools (v1.9, <http://www.htslib.org/>) was used to sort the alignment files. Then, the gene quantification was performed with Featurecounts 2.0.0 (<http://subread.sourceforge.net/>) [46]. As the data were from a strand-specific assay, the read had to be mapped to the opposite strand of the gene ($-s\ 2$ option). Before statistical analysis, genes with less than 20 reads (cumulating all the analyzed samples) were filtered out. Differentially expressed genes were identified using the Bioconductor [47] package DESeq2 1.26.0 [48] as previously described (cf. 2.2.2).

2.4. Western Blot

Vastus lateralis muscles from eleven bears (paired samples collected in summer and winter in a given year for the same individual; Table S6) and soleus muscles from 10-days control or unloaded mice ($n = 6$ /group) (~ 30 mg) were used. Samples were homogenized using a polytron in 1 mL of an ice-cold buffer (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% Igepal CA630) containing inhibitors of proteases (Protease Inhibitor Cocktail) and phosphatases (1 mM Na_3VO_3 , 10 mM NaF) (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France). The homogenates were stirred for 1 h at 4 °C and then centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4 °C. The resulting supernatants were then stored at -80 °C until use. The concentration of proteins was determined using the Bradford Protein Assay Kit (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Proteins were then diluted in Laemmli buffer and stored at -80 °C until use. Protein extracts were subjected to SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) using TGX™ FastCast™ 10% Acrylamide gels (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) and transferred onto a PVDF membrane (Hybond P, Amersham, England). Blots were blocked for 1 h at room temperature with 5% bovine serum albumin in TBS buffer with 0.1% Tween-20 (TBS-T, pH = 7.8), then washed thrice in TBS-T and incubated (overnight, stirring, 4 °C) with appropriated primary antibodies against SMAD1/5 (PA5-80036, Thermo Fisher, Illkirch, France), SMAD2/3 (#8685, Cell Signaling Technology, Saint-Cyr-L'Ecole, France), SMAD4 (ab230815), CTGF (ab227180), and GDF5 (ab137698) (Abcam, Cambridge, United Kingdom). Blots were then washed and incubated for 1 h with an appropriate secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody at room temperature. Signals were detected after incubation with Luminata Crescendo Western HRP substrate (Millipore, Burlington, MA, USA) and visualized using G: BOX ChemiXT4 (XL1) imaging system (Syngene, Frederick, MD, USA). Signals were then quantified using the GeneTools software (Syngene, Cambridge, UK) and normalized against the total amount of proteins determined by TGX signals to correct for uneven loading. Protein data were presented as individual values. The bilateral ratio paired Student's t -test was used to compare the muscles of bears during summer and winter (S and W, respectively). For muscles of control and unloaded mice (C and U, respectively), statistical significance was determined using the bilateral unpaired Student's

t-test. Statistical analysis was performed using Prism 8 (GraphPad Prism 9, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Deep Changes in Brown Bear Muscle Transcriptome during Hibernation

The brown bear transcriptome data set revealed that, from 13531 transcripts commonly identified in all individuals, gene expression differed markedly between summer and winter (Figure 1a). We identified 4115 differentially expressed genes (DEGs) between muscles of the active and hibernating bear with mainly down-regulated genes (Table S1). The 10 top-score obtained from an annotation enrichment analysis performed from the down- and up-regulated DEGs highlighted several significant enriched terms regulated differentially in bear muscles between the two seasons (Figure 1b,c). For instance, the protein metabolism functional cluster was the most up-regulated in bear muscles in winter compared to summer, with “Formation of a pool of free 40S subunits”, “Ribonucleoprotein complex biogenesis”, or “Translation” enriched terms (Figure 1b). In addition, the tissue structure remodeling functional cluster was the most down-regulated in muscles of the hibernating versus active bear, with “Extracellular matrix organization”, “Cell-substrate adhesion”, or “Supramolecular fiber organization” enriched terms (Figure 1c). We then run a transcriptional regulatory network analysis to identify transcription factors (TFs) involved in the DEGs regulation from the two most differentially enriched terms between the two seasons (e.g., “Formation of a pool of free 40S subunits” and “Extracellular matrix organization”) (Figure 1d). We found that SP1 was the TF the most involved in the DEGs regulation, as well as others TFs such as SP3, NFKB1, JUN, RELA, TFAP2A, ETS1, or SMAD4. Interestingly, these TFs cited above are all involved in the regulation or signal transduction of the TGF- β superfamily [52–54]. We therefore decided to focus on that superfamily, including (i) TGF- β signaling, which is a master regulator of the extracellular matrix organization and also involved in muscle mass loss, and (ii) BMP signaling, which has recently been discovered to be involved in muscle mass maintenance [20].

3.2. Hibernation Induces a Transcriptional Shift from the TGF- β to the BMP Pathway

From a thorough analysis of the literature [55–57], we have drawn up a list of the actors and regulators of the TGF- β superfamily. We then analyzed precisely how they were regulated at the mRNA level in the muscles of the hibernating bear between the winter and summer seasons.

The expression levels of two main TGF- β ligands, INHBA and MSTN, were dramatically lower (Fold change (FC) = 0.28 and 0.52, respectively) in winter, whereas INHBB expression was higher (FC = 1.85) (Figure 2, Tables S2 and S3). In BMP signaling, the main ligand described in muscle mass maintenance, GDF5, showed higher levels (FC = 2.5) in hibernating bear muscles compared to active muscles. Extracellular actors inhibiting (KCP, DCN, MGP, NOV, or CHRDL) or promoting (CCN2 or BMPER) TGF- β and/or BMP signals were mainly down-regulated in winter compared to summer. Receptors from the TGF- β signaling were differentially expressed during hibernation, with ACVR1C and TGBBR2 levels being considerably lower (FC = 0.28 and 0.80, respectively) in winter compared to summer, whereas TGFBR1 and ACVR1B were higher (FC = 1.42 and 1.47, respectively). The GDF5 receptor, BMPR1B, was higher in winter compared to summer (FC = 1.37). The co-receptors that control intensity and specificity of the downstream TGF- β /BMP signaling were mainly down-regulated or unchanged in winter for both pathways, except for MUSK, an important BMP co-receptor in muscle cells, which was up-regulated (FC = 2.39). Overall, actors involved in the initiation of the TGF- β signal were mainly repressed while those driving the BMP signal were increased.

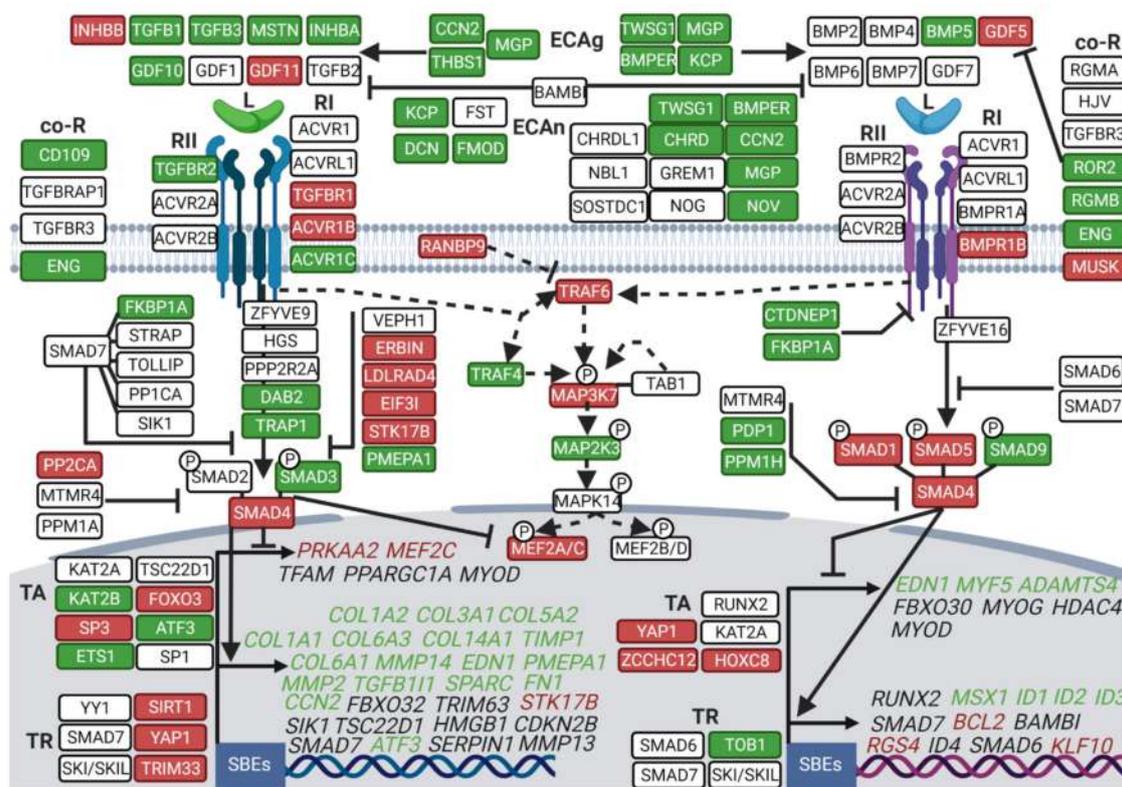


Figure 2. Deep transcriptomic reprogramming of TGF- β and BMP pathways in muscle during brown bear hibernation. Scheme showing brown bear vastus lateralis muscle transcripts involved in TGF- β and BMP signaling and depicting (i) their relationships [55–57] and (ii) the difference in their expression levels between hibernation and activity periods. Red and green boxes indicate, respectively up- and down-regulated genes during hibernation compared to the summer season, and white boxes indicate unchanged genes. Target genes of the TGF and BMP pathways are indicated in italic and are in green when down-regulated, in red when up-regulated, and in black when unchanged. Dashed lines show the SMAD-independent pathway and full lines the canonical signaling pathway. Arrows indicate activation, and \perp bars indicate inhibition. ($n = 6$ bears/season, the same individuals were sampled and analyzed in summer and winter, $\text{padj} < |0.05|$; Tables S2 and S3). ECAg: Extracellular Agonist, ECAn: Extracellular Antagonist, L: Ligand, Co-R: Co-Receptor, RII: Receptor type II, RI: Receptor type I, TA: Transcriptional Activator, TR: Transcriptional Repressor, SBEs: SMAD Binding Element. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

For TGF- β signaling, intracellular inhibitors such as ERBIN, LDLRAD4, EIF3I, STK17B, and PP2CA were up-regulated in winter bear muscles (FC = 1.26, 1.50, 1.37, 1.86, and 1.56, respectively), whereas some of the actors promoting the signal were lower expressed, i.e., DAB2 and TRAP1 (FC = 0.50 and 0.63, respectively). By contrast, for BMP signaling, intracellular inhibitors were mainly lower expressed in muscles of the hibernating bear, such as CTDNEP1, FKBP1A (FC = 0.70 and 0.67, respectively). Regarding the intracellular actors triggering TGF- β /BMP signaling, SMAD3 (TGF- β signaling; FC = 0.76) was less expressed, SMAD1 and SMAD5 (BMP signaling; FC = 1.99 and 1.30, respectively), and SMAD4 (common to TGF- β and BMP signaling; FC = 1.34) were more expressed in muscles of the hibernating bear compared to the active one. Thus, expression changes of the intracellular actors again suggest repression of TGF- β signaling but maintenance of the BMP signaling.

For nuclear components, transcriptional activators were either up- (FOXO3 and SP3, FC = 1.68 and 1.70) or down-regulated (e.g., KAT2B, ATF3 and ETS1, FC = 0.55, 0.46, and 0.54) for TGF- β , whereas mainly up-regulated in winter for BMP with YAP1, ZCCHC12, and HOXC8 (FC = 1.63, 2.21, and 2.46, respectively). Conversely, the transcriptional repressors were mainly up-regulated for the TGF- β pathway, i.e., TRIM33, YAP1, and SIRT1 (FC = 1.60, 1.63, and 1.82, respectively), whereas unchanged or lower expressed, i.e.,

TOB1 (FC = 0.78) for BMP during hibernation. Considering TGF- β target genes, an overall down-regulation was observed in winter compared to summer, as highlighted for the different collagen isoforms or the multiple metalloproteinases COL1A1/2 (FC = 0.04 and 0.07), COL3A1 (FC = 0.06), COL5A2 (FC = 0.28), COL6A1/3 (FC = 0.22 and 0.20), COL14A1 (FC = 0.14), and MMP2/14 (FC = 0.33 and 0.46) (Figure 2 and Table S2). For BMP target genes, it was less contrasted, with either an unchanged (e.g., RUNX2 or ID4), down-regulated (e.g., ID1 or ID2, FC = 0.31 and 0.65), or up-regulated expression (RGS4 or KLF10, FC = 1.72 and 1.32) during hibernation, with RGS4 being a muscle-specific gene. Overall, this supports a general down-regulation of the transcriptional activity that drives TGF- β signaling, with possible maintenance of that for BMP signaling.

Finally, TGF- β and BMP signaling also use a shared SMAD-independent pathway, involving a branch of the MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) pathway [58]. In this pathway, the expression of TRAF6 and its downstream actor MAP3K7 were higher in muscles of the hibernating bear compared to the active one (FC = 1.78 and 1.60, respectively). Some of the TRAF6 downstream actors, including MEF2A and MEF2C, which are key muscle transcription factors, were as well up-regulated (FC = 1.89 and 2.23) in winter compared to summer bear muscles (Figure 2).

TGF- β and BMP signaling pathways are tightly regulated by several UPS members, such as E3 ubiquitin ligases (E3s) and deubiquitinating enzymes (DUB) [55,59]. TGF- β inhibitors localized from the receptors to the nucleus level were up-regulated in winter, such as for CUL1 (FC = 1.85), NEDD4L (FC = 1.63), and TRIM33 (FC = 1.60), the latter being also a positive regulator of BMP signal transduction (Figure 3 and Table S4). SMURF1, an E3 ligase inhibiting both TGF- β and BMP signaling, was also up-regulated (FC = 1.64) in muscles of the hibernating bear. For UPS activators of the TGF- β signaling pathway alone, several DUBs were up-regulated in winter, e.g., UCHL5, USP11, and USP4 (FC = 1.78, 1.77, and 1.37, respectively), the latter also promoting BMP signaling, and others were down-regulated such as for USP15 and TRAF4 (FC = 0.52 and 0.47). The TGF- β and BMP pathways regulate the transcription of some muscle-specific E3s (TRIM63, FBXO32, and FBXO30). None of them were differentially expressed in winter compared to summer (Figure 3 and Table S4).

Overall, this wide transcriptomic analysis highlighted a winter transcriptional pattern in muscles of the brown bear that was prone to shutting down TGF- β signaling while maintaining or even over-activating the BMP pathway.

3.3. Divergent Regulation of TGF- β and BMP Pathways in Atrophy-Resistant Muscles of the Hibernating Brown Bear versus Atrophied Muscles of the Unloaded Mouse

We compared the above-described brown bear muscle transcriptome to published transcriptomic data from a model of long-term physical inactivity in mice induced by 10 days of unloading, where the soleus muscle mass decreased by ~30% [42]. Comparing the two models, the muscle transcriptomic profiles appeared very different for selected gene expression related to TGF- β and BMP signaling pathways (Figure S1 and Tables S2–S4). Of note, gene expressions of TGF- β and BMP ligands were mainly differently regulated, as particularly evidenced for GDF5, which was up-regulated during bear hibernation, but down-regulated during unloading in the mouse model (FC = 0.18), and as well with MSTN strongly down-regulated during bear hibernation but unchanged in unloaded mouse muscles (FC = 1.57) (Figure 4a and Tables S2 and S3). Regarding receptor expressions, the two models responded quite similarly (Figure 4b and Tables S2 and S3), with three notable exceptions. Firstly, the gene expression of ACRV1C did not change in muscles of the unloaded mouse, unlike muscles of the hibernating bear, where a strong down-regulation occurred (FC = 1.11 and 0.28, respectively), what we also observed with the gene expression of TGFBR2 (FC = 1.08 and 0.80, respectively). Secondly, the gene expression of BMPRI1B, GDF5 receptor, was up-regulated in muscles of the hibernating bear but was down-regulated in muscles of the unloaded mouse (FC = 0.66) (Figure 4b). The intracellular actors SMAD3, SMAD4, and SMAD1 were regulated similarly by bear hibernation or mouse unloading, although not to the same extent (FC = 0.73, 1.10, and 1.50, respectively).

However, SMAD2 was up-regulated (FC = 1.24), and SMAD5 and SMAD9 remained unchanged only in the muscles of the unloaded mouse (Figure 4c).

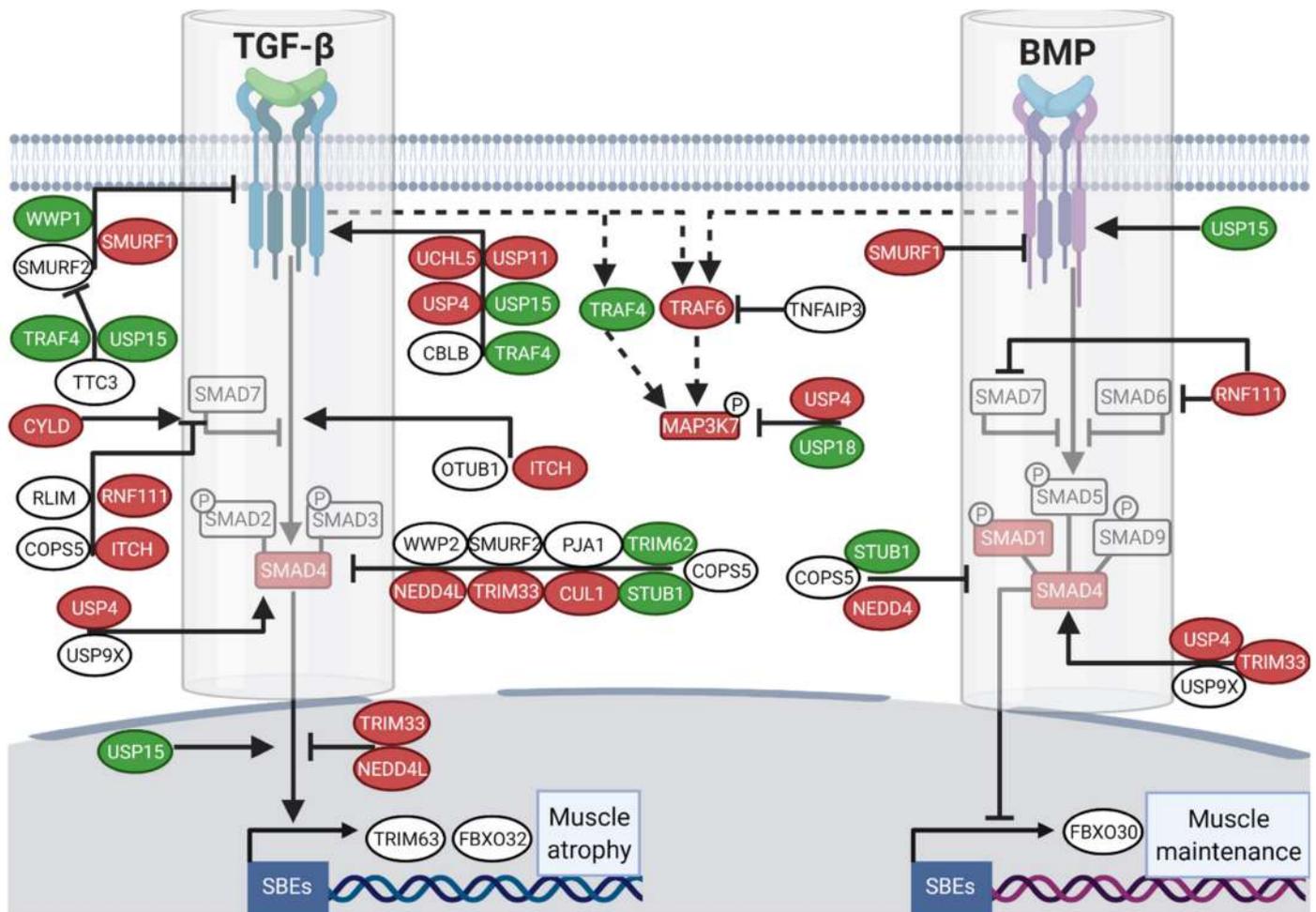


Figure 3. A transcriptomic reprogramming of UPS components involved in TGF- β and BMP regulation prevails in muscle during brown bear hibernation. Scheme showing the E3s/DUBs enzymes regulation of brown bear vastus lateralis muscle transcripts involved in TGF- β and BMP signaling pathways and depicting (i) their relationships [12,60] and (ii) the difference in their expression levels between hibernation and activity periods. Red and green boxes indicate, respectively up- down-regulated genes during hibernation compared to the summer season, and white boxes indicate unchanged genes. Dashed lines show the SMAD-independent pathway and full lines the canonical signaling. Arrows indicate activation and bars inhibition. ($n = 6$ bears/season, the same individuals were sampled and analyzed in summer and winter, $\text{padj} < |0.05|$; Table S4). SBEs: SMAD Binding Elements. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

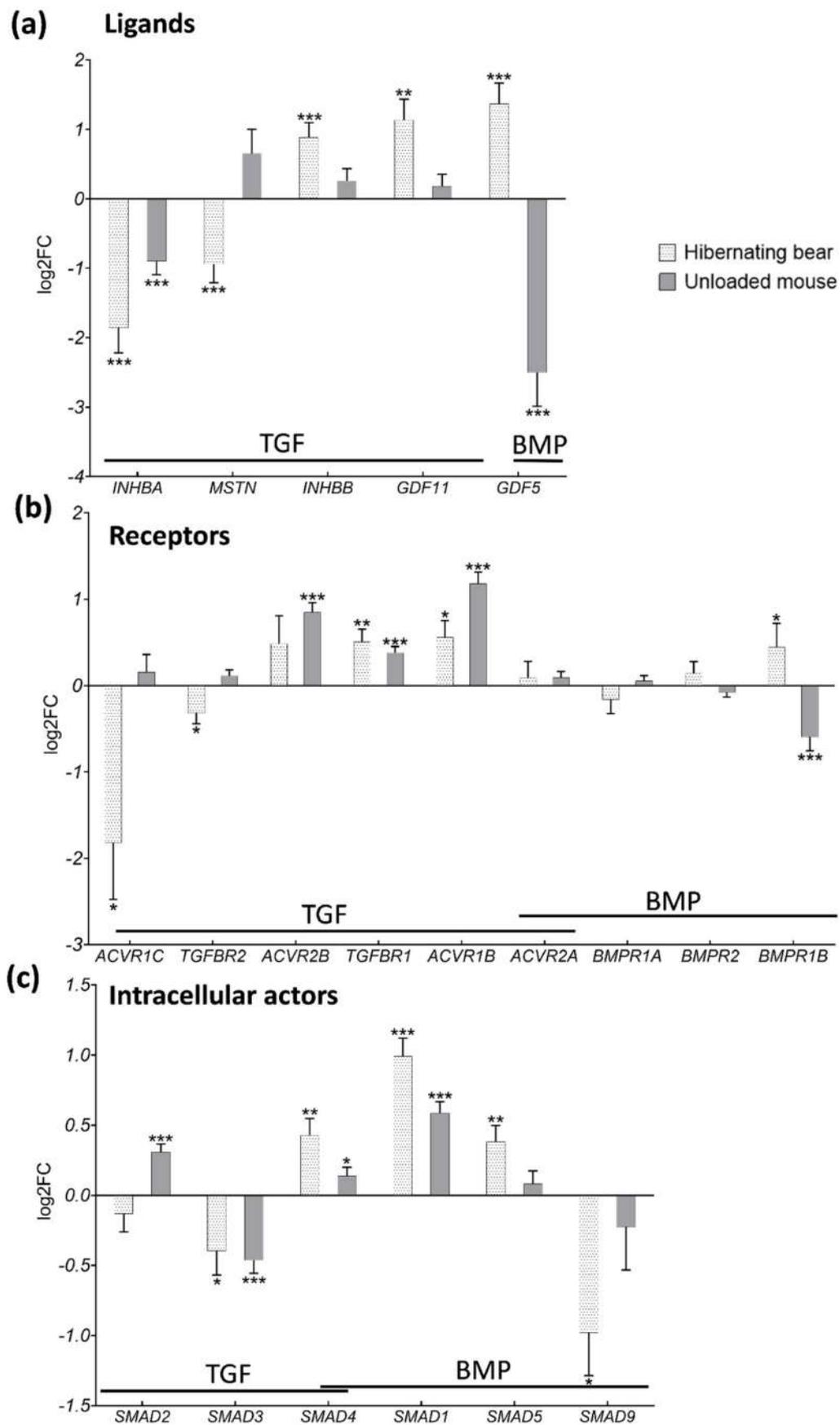


Figure 4. The gene expression pattern of TGF- β and BMP components is different in brown bear muscle resistant to atrophy during hibernation compared to atrophied muscles of the unloaded mouse. Genes expression level in vastus lateralis muscle of

active and hibernating brown bears ($n = 6$ bears/season, the same individuals were sampled and analyzed in summer and winter, \log_2FC Winter/Summer, dotted white bars) and in soleus muscle of control and unloaded mice ($n = 4$ mice per condition, \log_2FC Unloaded/Control, gray bars). The depicted genes were categorized as TGF- β and BMP (a) ligands, (b) receptors, and (c) intracellular actors. Data are expressed as $\log_2FC \pm 1fcSE$. Statistical significance is shown (* $padj < |0.05|$; ** $padj < |0.01|$; *** $padj < |0.001|$).

Regarding the E3s and DUB enzymes involved in the BMP pathway alone (Figure 5 upper panel), NEDD4 was similarly up-regulated in both models (FC = 1.63 and 1.28, respectively in bear and mouse), whereas FBXO30 (FC = 0.82) was down-regulated only in muscles of the unloaded mouse (Figure 5 and Table S4). The enzymes involved in the regulation of both TGF- β /BMP signaling were mainly up- or down-regulated in muscles of the hibernating bear but were mainly unaffected in unloaded mouse muscles (Figure 5 middle panel, Table S4). Finally, the E3s/DUB involved only in TGF- β signaling regulation were for half of them commonly unchanged or up-regulated, e.g., CUL1, UCHL5 or NEDD4L (FC = 1.17, 1.30 or 2.38, respectively), and for the other half oppositely regulated, e.g., SMURF2, CBLB, or TRIM62 (FC = 0.81, 1.50, and 1.97, respectively) in muscles of the unloaded mouse compared to muscles of the hibernating bear (Figure 5 lower panel and Table S4).

Overall, TGF- β and BMP signaling pathways were differentially regulated between atrophy-resistant muscles of the hibernating bear and atrophy-sensitive muscles of the unloaded mouse.

3.4. Hibernation Induces Changes in TGF- β and BMP Pathway Components at the Protein Level

To further compare these models of resistance and vulnerability to atrophy, we explored the protein levels of the SMAD intracellular actors. In the brown bear muscle, we observed a tendency to decrease for SMAD2 protein levels ($p = 0.09$) in winter compared to summer, whereas SMAD3 levels remained quite similar between the two seasons (Figure 6a,c,d). Protein levels of SMAD4 were higher in muscles of the hibernating bear compared to the active one (Figure 6a,e), but the converse was observed for SMAD1/5 (Figure 6a,f). As for mRNA, these SMAD proteins did not follow the same regulation pattern in muscles of the unloaded mouse, where none changed at the protein level (Figure 6b–f). The protein levels of CCN2, a TGF- β target gene that is also an extracellular activator of the TGF- β pathway and an inhibitor of the BMP pathway, were strongly lower in winter bear muscles but were unaffected in unloaded mouse muscles (Figure 6a,b,g). Finally, the protein levels for GDF5, a BMP ligand, remained unchanged in both muscles from the hibernating bear and the unloaded mouse (Figure 6a,b,h).

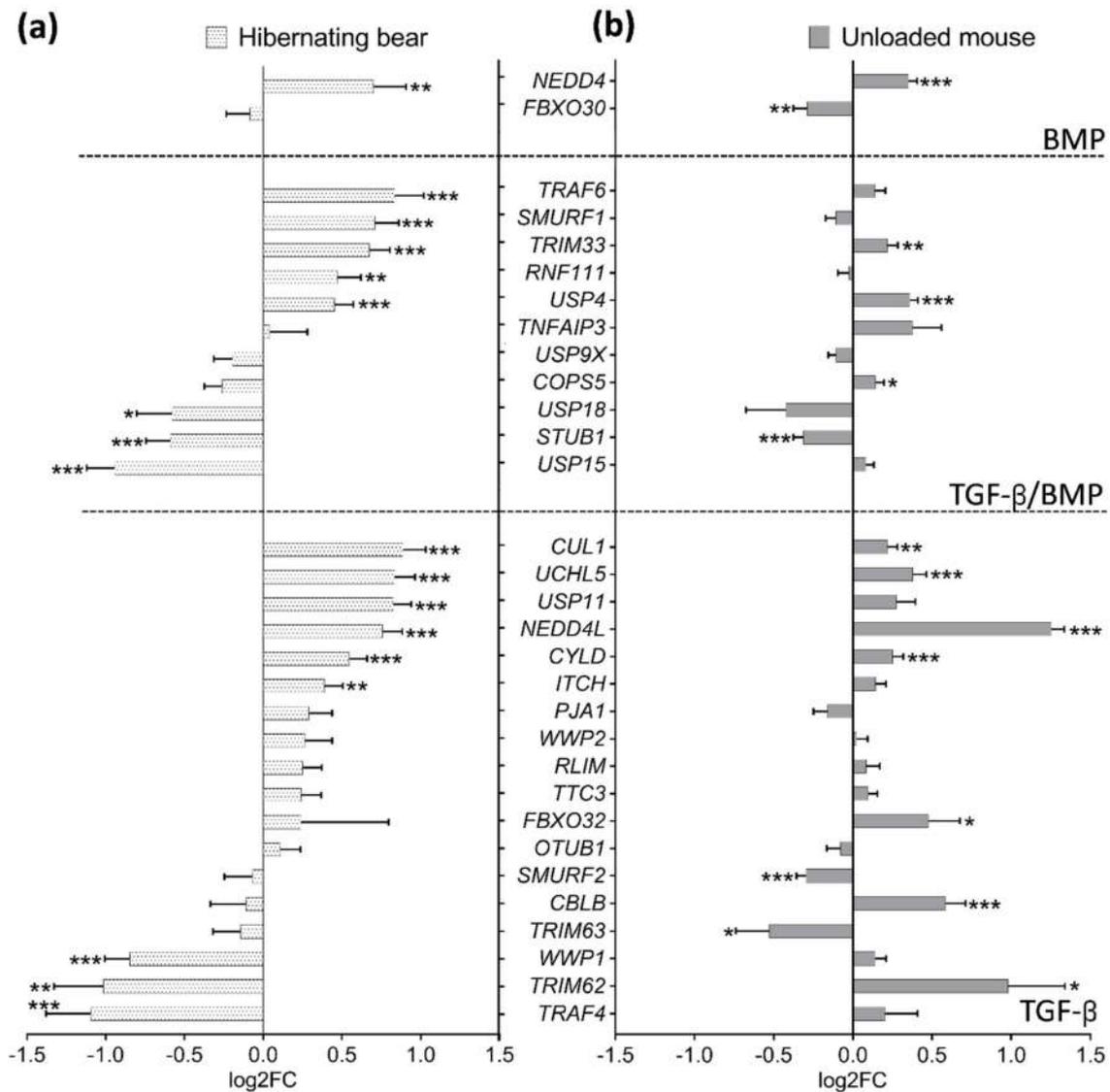


Figure 5. The gene expression pattern of muscle E3s/DUB enzymes involved in TGF-β and BMP pathway regulation differed in the atrophy-resistant brown bear muscle during hibernation compared to the atrophied muscle of the unloaded mouse. Genes expression level (a) in vastus lateralis muscle of active and hibernating brown bears ($n = 6$ bears/season, the same individuals were sampled and analyzed in summer and winter, log2FC Winter/Summer, dotted white bars), and (b) in soleus muscle of control and unloaded mice ($n = 4$ mice per condition, log2FC Unloaded/Control, gray bars). Data are expressed as log2FC \pm lfcSE. Statistical significance is shown (* padj < |0.05|; ** padj < |0.01|; *** padj < |0.001|).

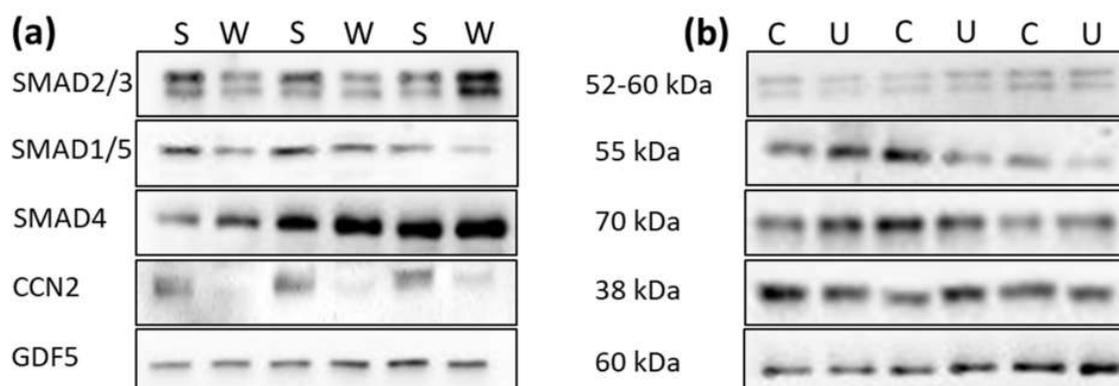


Figure 6. Cont.

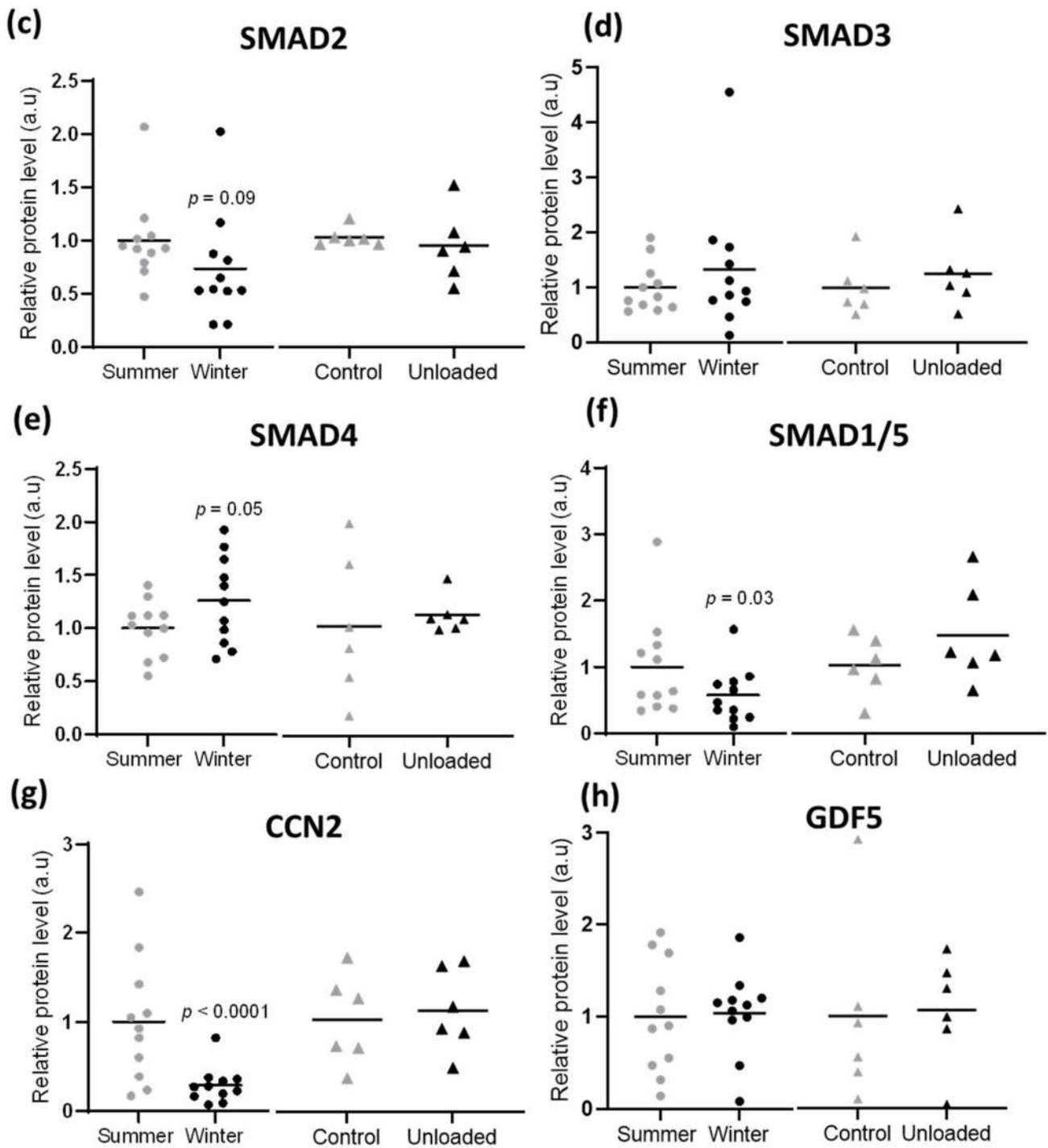


Figure 6. Hibernation induces changes in TGF- β and BMP components at protein level. Protein levels for total SMAD2/3, SMAD1/5, SMAD4, CCN2, and GDF5 were assessed by Western blots (a) in the vastus lateralis muscle of brown bears during summer (S) and winter (W) and (b) in the soleus muscle of control (C) and unloaded mice (U). Representative western blots are shown for three couples of bears and mice. (c–h). Data are presented as individuals' values with mean bars ($n = 11$ bears/season, the same individuals were sampled and analyzed in summer and winter, and $n = 6$ mice per condition). Gray and black dots are for muscles of bears, in summer and winter, respectively, and gray and black triangles are for control and unloaded muscle of mice, respectively.

4. Discussion

Although basic knowledge regarding the underlying mechanisms of muscle atrophy is continuously growing, essentially from rodent models and clinical studies in humans, there are still no efficient therapeutic strategies for its prevention and treatment. To explore new avenues, we compared a model of muscle atrophy resistance, the hibernating brown bear [23], and a mouse model of disuse-induced muscle atrophy [42]. Therefore, we analyzed the bear muscle transcriptome and identified sweeping changes in gene expression between the summer-active period and the winter-hibernating period, and we compared them with transcriptomic data from muscles of the unloaded mouse.

Whereas the loss of muscle mass during inactivity is often associated with a decrease in muscle protein synthesis [42,61–63], we reported here that genes implicated in protein metabolism were mainly up-regulated in muscles of the hibernating bear. This is consistent with previous studies that linked muscle atrophy resistance during hibernation to induction of protein translation [35,36,64]. Under activation of FOXOs transcription factors, atrogenes involved in both autophagy and UPS pathways are enhanced in rodents [65–67]. These atrogenes (e.g., *MAP1LC3A*, *FBXO32*, and *ZFAND5*) were indeed up-regulated or maintained in the unloaded mouse model but down-regulated or unchanged in muscles of the hibernating bear (Table S5). In agreement with previous studies, our data confirmed that proteolytic actors were up-regulated in disuse-induced muscle atrophy in rodents [11] but not in the bear model of muscle atrophy resistance [36]. Despite discrepancies between bear and mouse models (e.g., fed status, torpor vs. hindlimb muscle disuse), both display similar pathways controlling skeletal muscle mass and protein balance. For instance, the TGF- β signaling pathway has been reported to be evolutionarily conserved among several species, from *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* to *Mus musculus* [68]. In addition, both models are responsive to denervation-induced atrophy when in active conditions [20,30]. We performed our analyses on the fast-twitch vastus lateralis muscle for the brown bear and the slow-twitch soleus muscle for the mouse. Thus, we cannot exclude the possibility that the differences recorded here between the models may partly have resulted from the specific nature of these muscles concerning their metabolic and contractile properties. However, it is noteworthy that, although fast-twitch muscles are not as sensitive to physical inactivity as slow-twitch muscles, both types of muscles atrophied in classical models of long-term physical inactivity in rodents [25,29,39,69,70] and humans [71–73]. Despite this difference in metabolic and contractile properties, a general down-regulation of genes involved in extracellular matrix (ECM) structure organization was observed in atrophied muscles from the unloaded mouse and atrophy-resistant muscles from the hibernating brown bear (Figure 1 and Table S2). This ECM structure remodeling is a common feature of other atrophic models reported during dystrophic diseases [74] or muscle disuse in rodents or humans [26,69,75–77].

TGF- β is currently of major interest within the field of skeletal muscle biology. Indeed, the gene disruption of two of its ligands Myostatin (*MSTN*) or Activin A (*INHBA*), and the inhibition of their shared receptor ActRIIB (*ACVR2B*) promote a profound muscle hypertrophy phenotype in various conditions and species [78–81]. On the contrary, overexpression of *MSTN* or *INHBA* leads to the recruitment and phosphorylation of SMAD2-3, triggering an atrophic transcriptional program [16,17,82–84]. Here, we reported that the expression levels of both ligands *MSTN* and *INHBA* were lower only in muscles of the hibernating bear. In addition, *ACVR2B* and *SMAD2* mRNA levels were up-regulated in muscles of the unloaded mouse whereas maintained in muscles of the hibernating bear. At the protein level, SMAD2 was maintained in the muscles of the unloaded mouse and showed a tendency to decrease in muscles of the hibernating bear. However, despite extensive efforts and numerous antibodies tested, we could not characterize the SMADs phosphorylation status in bear muscles, which thus remains to be defined.

One TGF- β target gene, *CCN2* (also known as CTGF), is an ECM protein associated with fibrotic activity that is up-regulated in several muscle chronic disorders (i.e., Duchenne muscular dystrophy or the amyotrophic lateral sclerosis) [85]. *CCN2* is one of the main

pro-fibrotic cytokines acting downstream of TGF- β signaling and can amplify its effects through enhancement of TGF- β ligand-receptor binding [85–90]. Inhibition of *CCN2* gene expression reduced fibrosis and improved muscle and locomotor performance in a rodent model of amyotrophic lateral sclerosis [86]. During unloading, mRNA and protein levels of *CCN2* were unchanged in the muscles of the unloaded mouse but were strongly lower in the muscles of the hibernating brown bear. Taken together, our data strongly suggest that TGF- β signaling is overall inhibited only in muscles resistant to atrophy during bear hibernation.

The BMP pathway is a potent inducer of bone and cartilage formation [91]. BMP signaling was also recently discovered as a regulator of muscle mass, as its inhibition abolished the hypertrophic phenotype of the *MSTN*-KO mouse [20], and an increase in its receptor activity induced important muscle hypertrophy [21]. Regarding BMP ligands, GDF5 is essential to muscle mass maintenance, binding preferentially to the type I receptor *BMPRI1B*. GDF5 expression was strongly induced in denervated mouse muscles, and its inhibition worsened muscle atrophy, suggesting a role in counteracting denervation-induced atrophy [20]. We report here that the gene expression for both *GDF5* and *BMPRI1B* was strongly down-regulated in mouse muscles during unloading, whereas up-regulated in muscles of the hibernating bear. However, GDF5 protein levels were stable in the muscles of both the unloaded mouse and the hibernating bear. We recently demonstrated that circulating components of the hibernating bear serum were able to induce trans-species effects on human myotubes, notably inhibition of protein degradation. Therefore, we hypothesized that those components could be involved in the maintenance of muscle mass and strength in the hibernating bear [92]. Along with muscle mass maintenance, bear hibernation is also associated with bone mass maintenance [93], and thus GDF5 may constitute a possible target toward muscle and bone protection during long periods of physical inactivity and/or fasting. Unfortunately, the exploration of GDF5 concentration in bear serum was hampered by species cross-reactivity concerns with commercially available Elisa kits and thus remains to be addressed.

It has been proposed that the BMP and TGF- β common actor SMAD4 mainly engages with the TGF- β pathway, but switches to the BMP pathway when TGF- β transduction is reduced, and thus could be the limiting factor between these two signalings [20]. Moreover, denervation-induced muscle atrophy was exacerbated in the SMAD4 deficient mouse [20], and muscle mass was increased in humans with a mutation-associated gain of function in the SMAD4 gene [94]. We observed here higher mRNA and protein levels for SMAD4 in muscles of the hibernating bear, but only at mRNA levels in muscles of the unloaded mouse. This is concomitant with the overall down-regulation highlighted for the TGF- β signaling in the hibernating bear, which was not observed for the unloaded mouse. Thus, the inhibition of the TGF- β signaling in muscles of the hibernating bear may have released SMAD4 from TGF- β to BMP pathway to maintain muscle mass in a long period of disuse (Graphical abstract).

TGF- β and BMP share a SMAD-independent pathway that activates the E3 ubiquitin ligase TRAF6 [58]. In addition to its pro-atrophic role [95], TRAF6 is also required for myogenic differentiation and muscle regeneration via the MEF2 axis [96]. MEF2 is a conserved family of transcription factors involved in the control of muscle gene expression [97]. A recent muscle transcriptome analysis highlighted an inhibition of MEF2 transcription factors during human bed rest leading to skeletal muscle alterations [98]. Here, only *MEF2A* was up-regulated during unloading in mouse muscles, whereas *TRAF6*, *MEF2A*, and *MEF2C* were up-regulated in the hibernating bear muscles. We already observed a myogenic microRNA signature mediated by MEF2A signaling in the muscles of the hibernating bear, promoting mechanisms of muscle regeneration, suppression of ubiquitin ligases, and resistance to muscle atrophy [33]. Further studies are required to address whether this MEF2 signature could be under the control of the TGF- β and/or the BMP pathway through TRAF6.

5. Conclusions

Resistance to muscle atrophy in hibernating brown bears has so far been linked to a reduction in protein and energy metabolism. Here, we show for the first time that the TGF- β pathway is down-regulated whereas the BMP pathway is concomitantly sustained or even up-regulated in atrophy-resistant muscles of the hibernating brown bear. Thus, beyond strengthening the previous hypothesis of a hypometabolism enabling this natural resistance to muscle atrophy, our study provides new insights regarding the underlying mechanisms.

The originality of the current work lies in the choice to study the mechanisms involved in resistance to atrophy, and not solely, as in many studies, the mechanisms involved in the onset of atrophy. Our comparison of resistance and sensitivity to muscle atrophy animal models suggested the balance between the TGF- β and the BMP pathways as critical for preventing skeletal muscle atrophy over a long period of disuse. Many targeted therapies to counteract muscle atrophy already focus on TGF- β inhibition [99]. Our data open the way for further studies and clinical trials to test the effects of strategies to switch on (or sustain) the BMP pathway in combination with TGF- β inhibition to prevent disuse-induced muscle atrophy.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells10081873/s1>, Figure S1, Tables S1–S6, and Blots quantification.

Author Contributions: Individual contributions of authors is as followed: Conceptualization, L.C. (Laura Cussonneau), E.L. (Etienne Lefai), F.B. and L.C. (Lydie Combaret); Methodology, L.C. (Laura Cussonneau), C.B. (Christian Boyer), C.B. (Charlotte Brun), C.D., E.L. (Etienne Lefai), E.M., A.L.E., J.M.A., J.E.S., E.L. (Emmanuelle Loizon), F.B. and L.C. (Lydie Combaret); Analysis, L.C. (Laura Cussonneau), E.G., E.D., E.L. (Etienne Lefai), F.B. and L.C. (Lydie Combaret); Writing—original draft preparation, L.C. (Laura Cussonneau), E.L. (Etienne Lefai), F.B. and L.C. (Lydie Combaret); Writing—review and editing, all authors; Project administration, E.L. (Etienne Lefai), F.B. and L.C. (Lydie Combaret); Funding acquisition, E.L. (Etienne Lefai), F.B. and L.C. (Lydie Combaret). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Center National d'Etudes Spatiales (CNES, #865, #974, #1006, #1905), the iSITE Challenge 3 Mobility program (Université Clermont Auvergne), and the CNRS and Strasbourg University (H2E project; MyoBears project of the PEPS ExoMod program). MGX acknowledges financial support from France Génomique National infrastructure, funded as part of "Investissement d'Avenir" program managed by the Agence Nationale pour la Recherche (contract ANR-10-INBS-09). L.C. (Laura Cussonneau) was supported by a grant from the Institut National de la Recherche Agronomique et Environnement and Clermont Métropole. C.B. (Christian Boyer) and C.B. (Charlotte Brun) were supported by grants from the Ministère Français de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. The long-term funding of Scandinavian Brown Bear Research Project (SBBRP) has come primarily from the Swedish Environmental Protection Agency, the Norwegian Environment Agency, the Austrian Science Fund, and the Swedish Association for Hunting and Wildlife Management.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and of the European Directive 2010/63/EU and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of (1) the Swedish Ethical Committee on Animal Experiment (applications Dnr C3/2016 and Dnr C18/2015), the Swedish Environmental Protection Agency (NV-0741-18), and the Swedish Board of Agriculture (Dnr 5.2.18–3060/17), and (2) the C2E2A (Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale Auvergne) (D6334515-08/2018).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The analyzed transcriptomic mouse data that support the findings of this study are openly available in the GEO repository database at <https://doi.org/10.1093/gerona/gly051>, accessed on 16 June 2021, reference number (GSE102284). The generated transcriptomic bear data that support the findings of this study are openly available in the GEO repository database at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>, accessed on 16 June 2021, reference number

(GSE144856). Other data that support the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

Acknowledgments: The authors thank the field capture team (D. Ahlqvist, A. Friebe, H. Nordin, H. Blomgren, and S. Persson) and the IEN (INRAE Clermont-Ferrand-Theix, France) for excellent assistance with mouse care (A. Cissoire, Y. Delorme, and M. Djelloul-Mazouz), and L. Parry for help during animal slaughtering. The authors are also grateful to T. Brioché (Unité Mixte de Recherche INRAE, Dynamique Musculaire et Métabolisme, Université de Montpellier, France) for his help in implementing the unloading model in mouse and F. Rocher for helpful discussions. This is paper N°317 of the Scandinavian Brown Bear Research Project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jamshidpour, B.; Bahrpeyma, F.; Khatami, M.-R. The Effect of Aerobic and Resistance Exercise Training on the Health Related Quality of Life, Physical Function, and Muscle Strength among Hemodialysis Patients with Type 2 Diabetes. *J. Bodyw. Mov. Ther.* **2019**, *24*, S1360859219303134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Leenders, M.; Verdijk, L.B.; van der Hoeven, L.; Adam, J.J.; van Kranenburg, J.; Nilwik, R.; van Loon, L.J.C. Patients With Type 2 Diabetes Show a Greater Decline in Muscle Mass, Muscle Strength, and Functional Capacity With Aging. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **2013**, *14*, 585–592. [[CrossRef](#)]
3. DeFronzo, R.A.; Tripathy, D. Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2009**, *32*, S157–S163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Alkner, B.A.; Tesch, P.A. Knee Extensor and Plantar Flexor Muscle Size and Function Following 90 Days of Bed Rest with or without Resistance Exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2004**, *93*, 294–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Trappe, S.; Trappe, T.; Gallagher, P.; Harber, M.; Alkner, B.; Tesch, P. Human Single Muscle Fibre Function with 84 Day Bed-Rest and Resistance Exercise. *J. Physiol.* **2004**, *557*, 501–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Thyfault, J.P.; Du, M.; Kraus, W.E.; Levine, J.A.; Booth, F.W. Physiology of Sedentary Behavior and Its Relationship to Health Outcomes. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2015**, *47*, 1301–1305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Argilés, J.M.; Campos, N.; Lopez-Pedrosa, J.M.; Rueda, R.; Rodriguez-Mañas, L. Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan Crosstalk: Roles in Health and Disease. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **2016**, *17*, 789–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Powers, S.K.; Lynch, G.S.; Murphy, K.T.; Reid, M.B.; Zijdewind, I. Disease-Induced Skeletal Muscle Atrophy and Fatigue. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2016**, *48*, 2307–2319. [[CrossRef](#)]
9. Bonaldo, P.; Sandri, M. Cellular and Molecular Mechanisms of Muscle Atrophy. *Dis. Model. Mech.* **2013**, *6*, 25–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Lecker, S.H.; Goldberg, A.L.; Mitch, W.E. Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17*, 1807–1819. [[CrossRef](#)]
11. Taillandier, D.; Polge, C. Skeletal Muscle Atrogenes: From Rodent Models to Human Pathologies. *Biochimie* **2019**, *166*, 251–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Peris-Moreno, D.; Cussonneau, L.; Combaret, L.; Polge, C.; Taillandier, D. Ubiquitin Ligases at the Heart of Skeletal Muscle Atrophy Control. *Molecules* **2021**, *26*, 407. [[CrossRef](#)]
13. Vainshtein, A.; Sandri, M. Signaling Pathways That Control Muscle Mass. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4759. [[CrossRef](#)]
14. Sartori, R.; Gregorevic, P.; Sandri, M. TGF β and BMP Signaling in Skeletal Muscle: Potential Significance for Muscle-Related Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **2014**, *25*, 464–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lokireddy, S.; Mouly, V.; Butler-Browne, G.; Gluckman, P.D.; Sharma, M.; Kambadur, R.; McFarlane, C. Myostatin Promotes the Wasting of Human Myoblast Cultures through Promoting Ubiquitin-Proteasome Pathway-Mediated Loss of Sarcomeric Proteins. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2011**, *301*, C1316–C1324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Sartori, R.; Milan, G.; Patron, M.; Mammucari, C.; Blaauw, B.; Abraham, R.; Sandri, M. Smad2 and 3 Transcription Factors Control Muscle Mass in Adulthood. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2009**, *296*, C1248–C1257. [[CrossRef](#)]
17. Tando, T.; Hirayama, A.; Furukawa, M.; Sato, Y.; Kobayashi, T.; Funayama, A.; Kanaji, A.; Hao, W.; Watanabe, R.; Morita, M.; et al. Smad2/3 Proteins Are Required for Immobilization-Induced Skeletal Muscle Atrophy. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 12184–12194. [[CrossRef](#)]
18. Goodman, C.A.; McNally, R.M.; Hoffmann, F.M.; Hornberger, T.A. Smad3 Induces Atrogin-1, Inhibits MTOR and Protein Synthesis, and Promotes Muscle Atrophy In Vivo. *Mol. Endocrinol.* **2013**, *27*, 1946–1957. [[CrossRef](#)]
19. Carlson, M.E.; Hsu, M.; Conboy, I.M. Imbalance between PSmad3 and Notch Induces CDK Inhibitors in Old Muscle Stem Cells. *Nature* **2008**, *454*, 528–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Sartori, R.; Schirwis, E.; Blaauw, B.; Bortolanza, S.; Zhao, J.; Enzo, E.; Stantzou, A.; Mouisel, E.; Toniolo, L.; Ferry, A.; et al. BMP Signaling Controls Muscle Mass. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 1309–1318. [[CrossRef](#)]
21. Winbanks, C.E.; Chen, J.L.; Qian, H.; Liu, Y.; Bernardo, B.C.; Beyer, C.; Watt, K.I.; Thomson, R.E.; Connor, T.; Turner, B.J.; et al. The Bone Morphogenetic Protein Axis Is a Positive Regulator of Skeletal Muscle Mass. *J. Cell Biol.* **2013**, *203*, 345–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Tinker, D.B.; Harlow, H.J.; Beck, T.D.I. Protein Use and Muscle-Fiber Changes in Free-Ranging, Hibernating Black Bears. *Physiol. Zool.* **1998**, *71*, 414–424. [[CrossRef](#)]
23. Lohuis, T.D.; Harlow, H.J.; Beck, T.D.I. Hibernating Black Bears (*Ursus Americanus*) Experience Skeletal Muscle Protein Balance during Winter Anorexia. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *147*, 20–28. [[CrossRef](#)]
24. Deval, C.; Capel, F.; Laillet, B.; Polge, C.; Béchet, D.; Taillandier, D.; Attaix, D.; Combaret, L. Docosahexaenoic Acid-Supplementation Prior to Fasting Prevents Muscle Atrophy in Mice: Docosahexaenoic Acid Limits Muscle Wasting in Fasted Mice. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2016**, *7*, 587–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Vazeille, E.; Codran, A.; Claustre, A.; Averous, J.; Listrat, A.; Béchet, D.; Taillandier, D.; Dardevet, D.; Attaix, D.; Combaret, L. The Ubiquitin-Proteasome and the Mitochondria-Associated Apoptotic Pathways Are Sequentially Downregulated during Recovery after Immobilization-Induced Muscle Atrophy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2008**, *295*, E1181–E1190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Slimani, L.; Vazeille, E.; Deval, C.; Meunier, B.; Polge, C.; Dardevet, D.; Béchet, D.; Taillandier, D.; Micol, D.; Listrat, A.; et al. The Delayed Recovery of the Remobilized Rat Tibialis Anterior Muscle Reflects a Defect in Proliferative and Terminal Differentiation That Impairs Early Regenerative Processes. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2015**, *6*, 73–83. [[CrossRef](#)]
27. Gao, Y.; Arfat, Y.; Wang, H.; Goswami, N. Muscle Atrophy Induced by Mechanical Unloading: Mechanisms and Potential Countermeasures. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Cui, Q.; Yang, H.; Gu, Y.; Zong, C.; Chen, X.; Lin, Y.; Sun, H.; Shen, Y.; Zhu, J. RNA Sequencing (RNA-Seq) Analysis of Gene Expression Provides New Insights into Hindlimb Unloading-Induced Skeletal Muscle Atrophy. *Ann. Transl. Med.* **2020**, *8*, 1595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Deval, C.; Calonne, J.; Coudy-Gandilhon, C.; Vazeille, E.; Bechet, D.; Polge, C.; Taillandier, D.; Attaix, D.; Combaret, L. Mitophagy and Mitochondria Biogenesis Are Differentially Induced in Rat Skeletal Muscles during Immobilization and/or Remobilization. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Lin, D.C.; Hershey, J.D.; Mattoon, J.S.; Robbins, C.T. Skeletal Muscles of Hibernating Brown Bears Are Unusually Resistant to Effects of Denervation. *J. Exp. Biol.* **2012**, *215*, 2081–2087. [[CrossRef](#)]
31. Bertile, F.; Habold, C.; Le Maho, Y.; Giroud, S. Body Protein Sparing in Hibernators: A Source for Biomedical Innovation. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 634953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Chazarin, B.; Storey, K.B.; Ziemianin, A.; Chanon, S.; Plumel, M.; Chery, I.; Durand, C.; Evans, A.L.; Arnemo, J.M.; Zedrosser, A.; et al. Metabolic Reprogramming Involving Glycolysis in the Hibernating Brown Bear Skeletal Muscle. *Front. Zool.* **2019**, *16*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Luu, B.E.; Lefai, E.; Giroud, S.; Swenson, J.E.; Chazarin, B.; Gauquelin-Koch, G.; Arnemo, J.M.; Evans, A.L.; Bertile, F.; Storey, K.B. MicroRNAs Facilitate Skeletal Muscle Maintenance and Metabolic Suppression in Hibernating Brown Bears. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *235*, 3984–3993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chazarin, B.; Ziemianin, A.; Evans, A.L.; Meugnier, E.; Loizon, E.; Chery, I.; Arnemo, J.M.; Swenson, J.E.; Gauquelin-Koch, G.; Simon, C.; et al. Limited Oxidative Stress Favors Resistance to Skeletal Muscle Atrophy in Hibernating Brown Bears (*Ursus Arctos*). *Antioxidants* **2019**, *8*, 334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Fedorov, V.B.; Goropashnaya, A.V.; Stewart, N.C.; Tøien, Ø.; Chang, C.; Wang, H.; Yan, J.; Showe, L.C.; Showe, M.K.; Barnes, B.M. Comparative Functional Genomics of Adaptation to Muscular Disuse in Hibernating Mammals. *Mol. Ecol.* **2014**, *23*, 5524–5537. [[CrossRef](#)]
36. Jansen, H.T.; Trojahn, S.; Saxton, M.W.; Quackenbush, C.R.; Evans Hutzenbiler, B.D.; Nelson, O.L.; Cornejo, O.E.; Robbins, C.T.; Kelley, J.L. Hibernation Induces Widespread Transcriptional Remodeling in Metabolic Tissues of the Grizzly Bear. *Commun. Biol.* **2019**, *2*, 336. [[CrossRef](#)]
37. Mugahid, D.A.; Sengul, T.G.; You, X.; Wang, Y.; Steil, L.; Bergmann, N.; Radke, M.H.; Ofenbauer, A.; Gesell-Salazar, M.; Balogh, A.; et al. Proteomic and Transcriptomic Changes in Hibernating Grizzly Bears Reveal Metabolic and Signaling Pathways That Protect against Muscle Atrophy. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 19976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Arnemo, J.M.; Evans, A.L. *Biomedical Protocols for Free-Ranging Brown Bears, Wolves, Wolverines and Lynx*; Inland Norway University of Applied Sciences: Elverum, Norway, 2017.
39. Chacon-Cabrera, A.; Gea, J.; Barreiro, E. Short- and Long-Term Hindlimb Immobilization and Reloading: Profile of Epigenetic Events in Gastrocnemius. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *232*, 1415–1427. [[CrossRef](#)]
40. Anderson, M.J.; Diko, S.; Baehr, L.M.; Baar, K.; Bodine, S.C.; Christiansen, B.A. Contribution of Mechanical Unloading to Trabecular Bone Loss Following Non-Invasive Knee Injury in Mice. *J. Orthop. Res.* **2016**, *34*, 1680–1687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Pagano, A.F.; Demangel, R.; Brioché, T.; Jublanc, E.; Bertrand-Gaday, C.; Candau, R.; Dechesne, C.A.; Dani, C.; Bonnieu, A.; Py, G.; et al. Muscle Regeneration with Intermuscular Adipose Tissue (IMAT) Accumulation Is Modulated by Mechanical Constraints. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0144230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zhang, X.; Trevino, M.B.; Wang, M.; Gardell, S.J.; Ayala, J.E.; Han, X.; Kelly, D.P.; Goodpaster, B.H.; Vega, R.B.; Coen, P.M. Impaired Mitochondrial Energetics Characterize Poor Early Recovery of Muscle Mass Following Hind Limb Unloading in Old Mice. *J. Gerontol. Ser. A* **2018**, *73*, 1313–1322. [[CrossRef](#)]
43. Boyer, C.; Cussonneau, L.; Brun, C.; Deval, C.; Pais de Barros, J.-P.; Chanon, S.; Bernoud-Hubac, N.; Daira, P.; Evans, A.L.; Arnemo, J.M.; et al. Specific Shifts in the Endocannabinoid System in Hibernating Brown Bears. *Front. Zool.* **2020**, *17*, 35. [[CrossRef](#)]
44. Kim, D.; Perte, G.; Trapnell, C.; Pimentel, H.; Kelley, R.; Salzberg, S.L. TopHat2: Accurate Alignment of Transcriptomes in the Presence of Insertions, Deletions and Gene Fusions. *Genome Biol.* **2013**, *14*, R36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Langmead, B.; Trapnell, C.; Pop, M.; Salzberg, S.L. Ultrafast and Memory-Efficient Alignment of Short DNA Sequences to the Human Genome. *Genome Biol.* **2009**, *10*, R25. [[CrossRef](#)]
46. Liao, Y.; Smyth, G.K.; Shi, W. FeatureCounts: An Efficient General Purpose Program for Assigning Sequence Reads to Genomic Features. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 923–930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Gentleman, R.C.; Carey, V.J.; Bates, D.M.; Bolstad, B.; Dettling, M.; Dudoit, S.; Ellis, B.; Gautier, L.; Ge, Y.; Gentry, J.; et al. Bioconductor: Open Software Development for Computational Biology and Bioinformatics. *Genome Biol.* **2004**, *5*, 16.
48. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. De Hoon, M.J.L.; Imoto, S.; Nolan, J.; Miyano, S. Open Source Clustering Software. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 1453–1454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Saldanha, A.J. Java Treeview—Extensible Visualization of Microarray Data. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 3246–3248. [[CrossRef](#)]
51. Zhou, Y.; Zhou, B.; Pache, L.; Chang, M.; Khodabakhshi, A.H.; Tanaseichuk, O.; Benner, C.; Chanda, S.K. Metascape Provides a Biologist-Oriented Resource for the Analysis of Systems-Level Datasets. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1523. [[CrossRef](#)]
52. Koinuma, D.; Tsutsumi, S.; Kamimura, N.; Taniguchi, H.; Miyazawa, K.; Sunamura, M.; Imamura, T.; Miyazono, K.; Aburatani, H. Chromatin Immunoprecipitation on Microarray Analysis of Smad2/3 Binding Sites Reveals Roles of ETS1 and TFAP2A in Transforming Growth Factor β Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 172–186. [[CrossRef](#)]
53. Luo, K. Signaling Cross Talk between TGF- β /Smad and Other Signaling Pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, a022137. [[CrossRef](#)]
54. Córdova, G.; Rochard, A.; Riquelme-Guzmán, C.; Cofré, C.; Scherman, D.; Bigey, P.; Brandan, E. SMAD3 and SP1/SP3 Transcription Factors Collaborate to Regulate Connective Tissue Growth Factor Gene Expression in Myoblasts in Response to Transforming Growth Factor β . *J. Cell. Biochem.* **2015**, *116*, 1880–1887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hata, A.; Chen, Y.-G. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8*, a022061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Itoh, S.; ten Dijke, P. Negative Regulation of TGF- β Receptor/Smad Signal Transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2007**, *19*, 176–184. [[CrossRef](#)]
57. Weiss, A.; Attisano, L. The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway: TGFbeta Superfamily Signaling Pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2013**, *2*, 47–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Zhang, Y.E. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, a022129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Miyazono, K.; Kamiya, Y.; Morikawa, M. Bone Morphogenetic Protein Receptors and Signal Transduction. *J. Biochem. (Tokyo)* **2010**, *147*, 35–51. [[CrossRef](#)]
60. Inui, N.; Sakai, S.; Kitagawa, M. Molecular Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis, with Focus on Pathways Related to TGF- β and the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6107. [[CrossRef](#)]
61. Ferrando, A.A.; Lane, H.W.; Stuart, C.A.; Davis-Street, J.; Wolfe, R.R. Prolonged Bed Rest Decreases Skeletal Muscle and Whole Body Protein Synthesis. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **1996**, *270*, E627–E633. [[CrossRef](#)]
62. Ferrando, A.A.; Tipton, K.D.; Bamman, M.M.; Wolfe, R.R. Resistance Exercise Maintains Skeletal Muscle Protein Synthesis during Bed Rest. *J. Appl. Physiol.* **1997**, *82*, 807–810. [[CrossRef](#)]
63. Idris, I.; Atherton, P.J. Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance—A Qualitative Review. *Front. Physiol.* **2016**, *7*, 10.
64. Fedorov, V.B.; Goropashnaya, A.V.; Tøien, Ø.; Stewart, N.C.; Gracey, A.Y.; Chang, C.; Qin, S.; Perlea, G.; Quackenbush, J.; Showe, L.C.; et al. Elevated Expression of Protein Biosynthesis Genes in Liver and Muscle of Hibernating Black Bears (*Ursus Americanus*). *Physiol. Genomics* **2009**, *37*, 108–118. [[CrossRef](#)]
65. Zhao, J.; Brault, J.J.; Schild, A.; Cao, P.; Sandri, M.; Schiaffino, S.; Lecker, S.H.; Goldberg, A.L. FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. *Cell Metab.* **2007**, *6*, 472–483. [[CrossRef](#)]
66. Mammucari, C.; Milan, G.; Romanello, V.; Masiero, E.; Rudolf, R.; Del Piccolo, P.; Burden, S.J.; Di Lisi, R.; Sandri, C.; Zhao, J.; et al. FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. *Cell Metab.* **2007**, *6*, 458–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Sandri, M.; Sandri, C.; Gilbert, A.; Skurk, C.; Calabria, E.; Picard, A.; Walsh, K.; Schiaffino, S.; Lecker, S.H.; Goldberg, A.L. Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. *Cell* **2004**, *117*, 399–412. [[CrossRef](#)]
68. Fabian, D.K.; Fuentealba, M.; Dönertaş, H.M.; Partridge, L.; Thornton, J.M. Functional Conservation in Genes and Pathways Linking Ageing and Immunity. *Immun. Ageing* **2021**, *18*, 23. [[CrossRef](#)]
69. Slimani, L.; Micol, D.; Amat, J.; Delcros, G.; Meunier, B.; Taillandier, D.; Polge, C.; Béchet, D.; Dardevet, D.; Picard, B.; et al. The Worsening of Tibialis Anterior Muscle Atrophy during Recovery Post-Immobilization Correlates with Enhanced Connective Tissue Area, Proteolysis, and Apoptosis. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **2012**, *303*, E1335–E1347. [[CrossRef](#)]
70. Pigna, E.; Renzini, A.; Greco, E.; Simonazzi, E.; Fulle, S.; Mancinelli, R.; Moresi, V.; Adamo, S. HDAC4 Preserves Skeletal Muscle Structure Following Long-Term Denervation by Mediating Distinct Cellular Responses. *Skelet. Muscle* **2018**, *8*, 6. [[CrossRef](#)]

71. Leermakers, P.A.; Kneppers, A.E.M.; Schols, A.M.W.J.; Kelders, M.C.J.M.; Theije, C.C.; Verdijk, L.B.; Loon, L.J.C.; Langen, R.C.J.; Gosker, H.R. Skeletal Muscle Unloading Results in Increased Mitophagy and Decreased Mitochondrial Biogenesis Regulation. *Muscle Nerve* **2019**, *60*, 769–778. [[CrossRef](#)]
72. Dirks, M.L.; Wall, B.T.; van de Valk, B.; Holloway, T.M.; Holloway, G.P.; Chabowski, A.; Goossens, G.H.; van Loon, L.J.C. One Week of Bed Rest Leads to Substantial Muscle Atrophy and Induces Whole-Body Insulin Resistance in the Absence of Skeletal Muscle Lipid Accumulation. *Diabetes* **2016**, *65*, 2862–2875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Brocca, L.; Longa, E.; Cannavino, J.; Seynnes, O.; de Vito, G.; McPhee, J.; Narici, M.; Pellegrino, M.A.; Bottinelli, R. Human Skeletal Muscle Fibre Contractile Properties and Proteomic Profile: Adaptations to 3 Weeks of Unilateral Lower Limb Suspension and Active Recovery: Impact of ULLS and Active Rehabilitation on Human Muscle Fibres. *J. Physiol.* **2015**, *593*, 5361–5385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Gillies, A.R.; Lieber, R.L. Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix: Skeletal Muscle ECM. *Muscle Nerve* **2011**, *44*, 318–331. [[CrossRef](#)]
75. Martinez, D.A.; Vailas, A.C.; Vanderby, R.; Grindeland, R.E. Temporal Extracellular Matrix Adaptations in Ligament during Wound Healing and Hindlimb Unloading. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, *293*, R1552–R1560. [[CrossRef](#)]
76. Miller, T.A.; Lesniewski, L.A.; Muller-Delp, J.M.; Majors, A.K.; Scalise, D.; Delp, M.D. Hindlimb Unloading Induces a Collagen Isoform Shift in the Soleus Muscle of the Rat. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2001**, *281*, R1710–R1717. [[CrossRef](#)]
77. Urso, M.L.; Scrimgeour, A.G.; Chen, Y.-W.; Thompson, P.D.; Clarkson, P.M. Analysis of Human Skeletal Muscle after 48 h Immobilization Reveals Alterations in mRNA and Protein for Extracellular Matrix Components. *J. Appl. Physiol.* **2006**, *101*, 13. [[CrossRef](#)]
78. Elkina, Y.; von Haehling, S.; Anker, S.D.; Springer, J. The Role of Myostatin in Muscle Wasting: An Overview. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2011**, *2*, 143–151. [[CrossRef](#)]
79. Lee, S.-J.; Reed, L.A.; Davies, M.V.; Girgenrath, S.; Goad, M.E.P.; Tomkinson, K.N.; Wright, J.F.; Barker, C.; Ehrmantraut, G.; Holmstrom, J.; et al. Regulation of Muscle Growth by Multiple Ligands Signaling through Activin Type II Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 18117–18122. [[CrossRef](#)]
80. Chen, J.L.; Walton, K.L.; Hagg, A.; Colgan, T.D.; Johnson, K.; Qian, H.; Gregorevic, P.; Harrison, C.A. Specific Targeting of TGF- β Family Ligands Demonstrates Distinct Roles in the Regulation of Muscle Mass in Health and Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 201620013. [[CrossRef](#)]
81. Latres, E.; Mastaitis, J.; Fury, W.; Miloscio, L.; Trejos, J.; Pangilinan, J.; Okamoto, H.; Cavino, K.; Na, E.; Papatheodorou, A.; et al. Activin A More Prominently Regulates Muscle Mass in Primates than Does GDF8. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15153. [[CrossRef](#)]
82. Zimmers, T.A. Induction of Cachexia in Mice by Systemically Administered Myostatin. *Science* **2002**, *296*, 1486–1488. [[CrossRef](#)]
83. Langley, B.; Thomas, M.; Bishop, A.; Sharma, M.; Gilmour, S.; Kambadur, R. Myostatin Inhibits Myoblast Differentiation by Down-Regulating MyoD Expression. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49831–49840. [[CrossRef](#)]
84. Ding, H.; Zhang, G.; Sin, K.W.T.; Liu, Z.; Lin, R.-K.; Li, M.; Li, Y.-P. Activin A Induces Skeletal Muscle Catabolism via P38 β Mitogen-Activated Protein Kinase: Activin A Induces Skeletal Muscle Catabolism. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2017**, *8*, 202–212. [[CrossRef](#)]
85. Sun, G.; Haginoya, K.; Wu, Y.; Chiba, Y.; Nakanishi, T.; Onuma, A.; Sato, Y.; Takigawa, M.; Iinuma, K.; Tsuchiya, S. Connective Tissue Growth Factor Is Overexpressed in Muscles of Human Muscular Dystrophy. *J. Neurol. Sci.* **2008**, *267*, 48–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Gonzalez, D.; Rebolledo, D.L.; Correa, L.M.; Court, F.A.; Cerpa, W.; Lipson, K.E.; van Zundert, B.; Brandan, E. The Inhibition of CTGF/CCN2 Activity Improves Muscle and Locomotor Function in a Murine ALS Model. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, 2913–2926. [[CrossRef](#)]
87. Morales, M.G.; Gutierrez, J.; Cabello-Verrugio, C.; Cabrera, D.; Lipson, K.E.; Goldschmeding, R.; Brandan, E. Reducing CTGF/CCN2 Slows down Mdx Muscle Dystrophy and Improves Cell Therapy. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 4938–4951. [[CrossRef](#)]
88. Abreu, J.G.; Ketpura, N.I.; Reversade, B.; De Robertis, E.M. Connective-Tissue Growth Factor (CTGF) Modulates Cell Signalling by BMP and TGF- β . *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, 599–604. [[CrossRef](#)]
89. Vial, C.; Zúñiga, L.M.; Cabello-Verrugio, C.; Cañón, P.; Fadic, R.; Brandan, E. Skeletal Muscle Cells Express the Profibrotic Cytokine Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2), Which Induces Their Dedifferentiation. *J. Cell. Physiol.* **2008**, *215*, 410–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Hillege, M.; Galli Caro, R.; Offringa, C.; de Wit, G.; Jaspers, R.; Hoogaars, W. TGF- β Regulates Collagen Type I Expression in Myoblasts and Myotubes via Transient Ctgf and Fgf-2 Expression. *Cells* **2020**, *9*, 375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Salazar, V.S.; Gamer, L.W.; Rosen, V. BMP Signalling in Skeletal Development, Disease and Repair. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 203–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Chanon, S.; Chazarin, B.; Touhans, B.; Durand, C.; Chery, I.; Robert, M.; Vieille-Marchiset, A.; Swenson, J.E.; Zedrosser, A.; Evans, A.L.; et al. Proteolysis Inhibition by Hibernating Bear Serum Leads to Increased Protein Content in Human Muscle Cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Donahue, S.W.; McGee, M.E.; Harvey, K.B.; Vaughan, M.R.; Robbins, C.T. Hibernating Bears as a Model for Preventing Disuse Osteoporosis. *J. Biomech.* **2006**, *39*, 1480–1488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

94. Le Goff, C.; Mahaut, C.; Abhyankar, A.; Le Goff, W.; Serre, V.; Afenjar, A.; Destrée, A.; di Rocco, M.; Héron, D.; Jacquemont, S.; et al. Mutations at a Single Codon in Mad Homology 2 Domain of SMAD4 Cause Myhre Syndrome. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 85–88. [[CrossRef](#)]
95. Paul, P.K.; Bhatnagar, S.; Mishra, V.; Srivastava, S.; Darnay, B.G.; Choi, Y.; Kumar, A. The E3 Ubiquitin Ligase TRAF6 Intercedes in Starvation-Induced Skeletal Muscle Atrophy through Multiple Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 1248–1259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Xiao, F.; Wang, H.; Fu, X.; Li, Y.; Wu, Z. TRAF6 Promotes Myogenic Differentiation via the TAK1/P38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Akt Pathways. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34081. [[CrossRef](#)]
97. Taylor, M.V.; Hughes, S.M. Mef2 and the Skeletal Muscle Differentiation Program. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *72*, 33–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Rullman, E.; Fernandez-Gonzalo, R.; Mekjavić, I.B.; Gustafsson, T.; Eiken, O. MEF2 as Upstream Regulator of the Transcriptome Signature in Human Skeletal Muscle during Unloading. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2018**, *315*, R799–R809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Abrigo, J.; Simon, F.; Cabrera, D.; Cordova, G.; Trollet, C.; Cabello-Verrugio, C. Central Role of Transforming Growth Factor Type Beta 1 in Skeletal Muscle Dysfunctions: An Update on Therapeutic Strategies. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2018**, *19*, 1189–1200. [[CrossRef](#)]

Résumé :

L'atrophie musculaire, qui constitue un enjeu majeur en matière de santé publique, est une affection qui touche les personnes âgées, mais aussi les personnes sédentaires, immobilisées ou souffrant d'une inflammation chronique. L'utilisation de modèles animaux, en particulier les rongeurs de laboratoire, a permis d'élucider les mécanismes moléculaires et physiopathologiques à l'origine de l'atrophie musculaire. Dans la recherche de solutions thérapeutiques, l'exploration d'un modèle de résistance naturelle à l'atrophie musculaire doit permettre d'ouvrir de nouvelles pistes de recherche innovantes. Le laboratoire explore comment l'ours brun hibernant est capable de préserver son tissu musculaire durant plusieurs mois d'immobilité, et comment son sérum est capable d'induire des modifications de la balance protéique sur des cellules musculaires humaines. L'objectif principal de mon travail de thèse était d'identifier des composés ou familles de composés circulants chez l'ours en hibernation, et responsables d'effets biologiques sur des cellules humaines. Dans un premier temps j'ai recherché une activité biologique facilement mesurable, et qui pourrait être utilisée pour cribler les composés circulants. La mesure de l'activité NADH déshydrogénase par un test colorimétrique, permet de suivre les effets inhibiteurs du sérum et de ses fractions sur des cellules humaines en culture, de façon robuste et reproductible. Grâce à cet outil, nous avons pu initier le criblage de plusieurs fractions issues du sérum d'ours hibernant, débutant ainsi une approche sans a priori dans la recherche des composés actifs du sérum d'ours hibernant. Ces travaux ouvrent la voie aux tests de nouvelles fractions, permettant d'avancer vers l'identification de nouvelles molécules ayant un effet positif sur la balance énergétique cellulaire. Selon la même démarche, le développement de plusieurs outils de mesure couvrant d'autres domaines du métabolisme cellulaire devrait permettre à l'avenir de compléter cette approche. En parallèle, dans la recherche de composés circulants actifs présent dans le sérum d'ours hibernant, j'ai axé mes recherches sur des composés en relation avec le système endocannabinoïde. J'ai pu ainsi mettre en évidence une diminution globale du tonus endocannabinoïde, avec une diminution des ligands de la voie canonique. De façon surprenante, la concentration d'oleoylethanolamide (OEA) circulante est multipliée par trois en hiver, suggérant un rôle important de ce composé dans la physiologie de l'hibernation chez l'ours brun. La poursuite de ces travaux doit permettre de mieux cerner les composés circulants d'intérêt pour la médecine humaine, et d'avancer vers des solutions thérapeutiques innovantes dans la lutte de certaines pathologies, comme l'atrophie musculaire.

Mots-clés : hibernation, ours brun (*Ursus arctos*), myotubes humains, endocannabinoïdes, activité NADH-déshydrogénase, respiration mitochondriale.

Abstract :

Muscle atrophy, which is a major public health issue, is a condition that affects the elderly, but also people who are sedentary, immobilized or suffering from chronic inflammation. The use of animal models, in particular laboratory rodents, has made it possible to elucidate the molecular and physiopathological mechanisms at the origin of muscle atrophy. In the search for therapeutic solutions, the exploration of a model of natural resistance to muscle atrophy should open up new and innovative avenues of research. The laboratory is exploring how the hibernating brown bear is able to preserve its muscle tissue during several months of immobility, and how its serum is able to induce changes in the protein balance of human muscle cells. The main objective of my thesis work was to identify compounds or families of compounds circulating in the hibernating bear and responsible for biological effects on human cells. First, I looked for a biological activity that could be easily measured and that could be used to screen the circulating compounds. The measurement of NADH dehydrogenase activity by a colorimetric assay, allows to follow the inhibitory effects of serum and its fractions on human cells in culture, in a robust and reproducible way. Thanks to this tool, we were able to initiate the screening of several fractions from hibernating bear serum, thus starting an unbiased approach in the search for active compounds in hibernating bear serum. This work opens the way to the testing of new fractions, allowing to advance towards the identification of new molecules having a positive effect on the cellular energy balance. According to the same approach, the development of several measurement tools covering other domains of cellular metabolism should allow to complete this approach in the future. In parallel, in the search for active circulating compounds present in the serum of hibernating bears, I focused my research on compounds related to the endocannabinoid system. I was thus able to highlight a global decrease of the endocannabinoid tone, with a decrease of the ligands of the canonical pathway. Surprisingly, the concentration of circulating oleoylethanolamide (OEA) is multiplied by three in winter, suggesting an important role of this compound in the physiology of hibernation in brown bears. The continuation of this work should allow to better identify circulating compounds of interest for human medicine, and to advance towards innovative therapeutic solutions in the fight against certain pathologies, such as muscle atrophy.

Keywords : hibernation, brown bear (*Ursus arctos*), human myotubes, endocannabinoids, NADH-dehydrogenase activity, mitochondrial respiration.