

Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur Strasbourg 1

Discipline : Sciences du vivant Domaine : Physiologie et biologie des organismes

par Sylvain Giroud

## DIFFERENCES SAISONNIERES DES MECANISMES D'ECONOMIE D'ENERGIE D'UN PRIMATE MALGACHE HETEROTHERME : LE MICROCEBE



Soutenu publiquement le 8 décembre 2008 devant la commission d'examen :

Yvon LE MAHO	
Directeur de Recherche Classe Exceptionnelle, CNRS, Strasbourg	Directeur de thèse
Martine PERRET	
Directeur de Recherche 2, CNRS, Brunoy	Codirecteur de thèse
Jean-Louis GENDRAULT	
Professeur, Université Louis Pasteur, Strasbourg	Rapporteur interne
Patricia WRIGHT	
Professeur, Université d'état de New York, Stony Brook	Rapporteur externe
Dominique DESPLANCHES	
Chargé de Recherche 1, Université Claude Bernard, Lyon	Rapporteur externe
Stéphane BLANC	
Chargé de Recherche 1, CNRS, Strasbourg	Invité

#### <u>Remerciements</u>

Je tiens, tout d'abord, à remercier Monsieur Jean-Louis Gendrault, et Mesdames Patricia Wright et Dominique Desplanches pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merei à Monsieur Stéphane Blane pour son encadrement et son esprit de rigueur (« White Spirit ») dont j'espère avoir hérité ne serait-ce qu'une infime partie. L'esprit du « Grand Chef » restera à jamais présent et m'accompagnera tout au long du parcours qui suivra ma thèse de doctorat. Je tiens notamment à le remercier de m'avoir constamment fait confiance dans toutes les tâches et pour son éternel optimisme qui m'a poussé à aller sans cesse de l'avant.

Merei à Madame Martine Perret de m'avoir eneadré tout au long de ces 4 années de doctorat, pour son grand esprit de synthèse et sa faculté à rendre les choses beaucoup plus simples qu'elles n'y paraissent. Je lui suis grandement reconnaissant de m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche à Brunoy, lieu détendu où règne la bonne humeur chaque jour à l'occasion de la traditionnelle « pausecafé » de 11h.

Merci aussi à Monsieur Yvon Le Maho de m'avoir accueilli et permis de réaliser cette thèse au sein du DEPE.

Je tiens également à remercier chaleureusement Monsieur Jean-Mare Péquignot, qui a été mon directeur de stage de DCA « Physiologie intégrée en conditions extrêmes » à l'Université de Lyon 1, et qui m'a permis par son soutien continuel de pouvoir m'engager en thèse par la suite.

Je remercie les chercheurs et les techniciens ayant réalisé des mesures, dosages et analyses en tout genre sur mes échantillons biologiques de microcèbes. En particulier, merci à Monsieur Peter Stein de l'Université du New Jersey pour les analyses d'azote lourd, à Mme Joëlle Goudable de l'Hôpital Edouard Herriot de Lyon pour les analyses d'azote urinaire et de métabolites, à Monsieur et Madame Cottet-Emard et Madame Vouillarmet pour les dosages de catécholamines. Je remercie aussi chaleureusement Alexandre Zahariev pour son temps passé à l'analyse des isotopes stables sur mes échantillons urinaire et sanguin, avec toute d'odeur particulièrement forte et tenace, mais non désagréable, de l'urine de microcèbes.

Merei à toutes les personnes du laboratoire de Brunoy pour leur bonne humeur et les bons moments passés dans ce « grand château ». Je remercie en particulier Jérémy pour les longues parties de tennis de table et ses nombreuses propositions ludiques lors de mon séjour en région parisienne.

Merci à Caroline Gilbert pour les nombreuses relectures d'articles, et en particulier pour son aide précieuse et son soutien dans la rédaction du premier papier ! Je tiens également à lui faire part de ma gratitude pour ses conseils avisés dans la préparation des enseignements, notamment des cours magistraux, à l'Université de Nancy. Je la remercie aussi pour m'avoir permis de partager son bureau au sein de l'équipe nancéenne.

Un grand merci également à Madame Marie Trabalon de m'avoir accueilli au sein de son équipe durant l'année de mon poste d'ATER à l'Université de Nancy 1.

Merei à ma eo-thésarde, Audrey, avec qui j'ai partagé les périodes dures, épuisantes et décourageantes mais aussi drôles et rigolotes, caractérisant la vie du doctorant au laboratoire. Merei à Sabrina, Jérôme, Hélène, François, Cédric, Sylvie, Pamien, nicolas...

Merci à tous les étudiants du laboratoire, les plus anciens comme les derniers arrivés. En particulier, je remercie l'équipe de choc coordonnée par Marion, ma voisine de bureau au cours des derniers mois de ma thèse, pour leur soutien et leur aide inestimable durant les derniers instants de la période de rédaction de mon manuscrit!

Merci à toute « l'équipe du bas » encore présente : Cédrie, Isabelle, Iman, Hugues, André, Michaël, ou passée : Péguy, Guillaume...

Merci à Thierry (et à sa machine à café pour ce breuvage miraculeux) pour sa bonne humeur et ses plaisanteries récurrentes, jusqu'à souvent tard le soir, lorsqu'il faisait une « nocturne » pour m'accompagner, mais aussi à ses services rendus en restant si tard.

Merei à tout le DEPE ! Merei à Anita et à Aurélie, les deux animalières qui se sont succédées, notamment dans l'entretien et le nourrissage des microcèbes. Merei également à Jacqueline, Martine, Guy et Brigitte.

Merei à toute ma famille et tous mes amis qui m'ont soutenu au cours de ces 4 années de thèse, d'exil strasbourgeois ou d'accueil alsacien. J'exprime notamment ma gratitude et tout mon amour à Marie-Laure pour m'avoir « supporté » et soutenu pendant les moments difficiles. Un grand merei aussi à mes parents et à mes sœurs, à mes oncles et tantes, et à mes cousins et cousines, en particulier mon cousin Romain dont les eroquis de microcèbes, qui jalonnent les différents chapitres de ce manuscrit, révèlent tout son talent de dessinateur. Je remercie également Thomas pour son investissement dans la re-lecture et son travail sur la section « Microcèbe » de ce manuscrit.

Et Merci beaucoup aux titous, sans qui cette aventure ne serait certainement pas arrivée...



Ce travail de recherche a été réalisé grâce au soutien financier des institutions suivantes :

La Fondation Schueller-Bettencourt Le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Le Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) « Longévité » L'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) « Alimentation et Nutrition Humaine » L'Université Louis Pasteur de Strasbourg

« Plus les circonstances sont difficiles, plus elles nourrissent notre développement spirituel » *Léon Tolstoï* 

« C'est seulement lorsqu'il triomphe d'un puissant adversaire que se révèle la force d'un homme » *Nichiren Daïshonin* 

# DIFFERENCES SAISONNIERES DES MECANISMES D'ECONOMIE D'ENERGIE D'UN PRIMATE MALGACHE HETEROTHERME : LE MICROCEBE

Ce travail est basé sur les articles suivants :

#### Article 1:

**Giroud S.**, Blanc S., Aujard F., Bertrand F., Gilbert C., and Perret M. (2008). Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294: R1958-R1967, **2008** 

#### Article 2:

**Giroud S.**, Perret M., Stein P., Robin J.P., Le Maho Y., Zahariev A., Momken I., and Blanc S. (soumis). The grey mouse lemur uses season-dependent fat or protein sparing strategies to face chronic food shortage restriction. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 

#### Article 3:

**Giroud S.**, Perret M., Le Maho Y., Momken I., Gilbert C., and Blanc S. (2008). Gut hormones in relation to body mass and torpor pattern changes during food restriction and refeeding in the gray mouse lemur. *Journal of Comparative Physiology B – Biochemical, Systemic and Environmental Physiology. doi* 10.1007/s00360-008-0294-4.

#### Article 4:

**Giroud S.**, Perret M., Gilbert C., Aujard F., Zahariev A., Le Maho Y., Oudart H., and Blanc S. (soumis). Dietary palmitate and linoleate oxidations, oxidative stress and DNA damage differ according to season in mouse lemurs exposed to a chronic food deprivation. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*.

#### Article 5:

**Giroud S.**, Perret M., Gilbert C., and Blanc S. (<u>soumis</u>). The biology of the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*): A unique model to study the strategies of energy economy in contrasted climates. *Journal of Experimental Biology*.

Articles non présentés dans le cadre de la thèse:

- Gilbert C., Blanc S., Giroud S., Trabalon M., Le Maho Y., Perret M., and Ancel A. Role of huddling on the energetic of growth in a newborn altricial mammal. *American Journal* of *Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 293: 867-876, 2007
- Dali-Youcef N., Mataki C., Coste A., Messaddeq N., Giroud S., Blanc S., Koehl C., Chambon P., Fajas L., Metzger D., Schoonjans K., and Auwerx J. (2007). Adipose tissue specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabesity due to increased energy expenditure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(25): 703-708.

Communications orales effectuées dans le cadre de la thèse:

- Giroud S, Blanc S, Perret M. "Différences saisonnières des mécanismes d'économie d'énergie en réponse à une restriction calorique au long cours, chez un primate malgache". 19<sup>e</sup> Colloque de la Société Francophone de Primatologie (SFDP), Strasbourg, France ; 18 au 20 octobre 2006.
- Giroud S, Blanc S, Aujard, F, Bertrand F, Gilbert C, Perret M. "Effect of chronic food restriction on daily torpor and locomotor activity in a seasonal Malagasy primate: *M. murinus*". A statistical approach. *Neuroscience upper rhine network (Neurex : Strasbourg, France; Freibourg, Allemagne ; Bâle, Suisse). Workshop « The forgotten partner: the statistical tool », Strasbourg, France; 19 juin 2007 et 18 septembre 2007.*
- Giroud S, Blanc S, Perret M. "Seasonal differences in modulation of heterothermic phases in a small Malagasy primate – *Microcebus murinus* – coping with a chronic food shortage". *The Society for Experimental Biology (SEB), Glasgow, Ecosse ; 31 mars au 14 avril 2007.*
- Giroud S, Perret M, Blanc S. "Seasonal Differences in energy saving mechanisms in response to chronic food restriction, in a heterothermic Malagasy primate: *Microcebus murinus*". 13<sup>th</sup> International Hibernation Symposium (IHS), Swakopmund, Namibia; 6 au 12 août 2008.

Communications affichées dans le cadre de la thèse:

 Giroud S, Reichardt F, Perret M, Le Maho Y, Gilbert C, Blanc S. "Gut hormones in relation to body mass and torpor patterns changes during food restriction and re-feeding in the grey mouse lemur". *The Society for Experimental Biology (SEB), Marseille, France; 6 au 11 juillet 2008.*

# Sommaire : Grandes lignes

Chapitre 1 : Préambule
Chapitre 2 : Revue bibliographique19
Introduction : Ecophysiologie de la torpeur
The biology of the grey mouse lemur ( <i>Microcebus murinus</i> ): A unique model for the study of strategy of enery economy
Chapitre 3: Objectifs de l'étude 67
Chapitre 4: Résultats 71
Etude 1 : Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur <i>(Micocebus murinus)</i>
Etude 2: The grey mouse lemur uses season-dependant fat or protein sapring strategies to face chronic food restriction
Etude 3: Gut hormones in relation to body mass and torpor pattern changes during food restriction and re-feeding in the gray mouse lemur 115
Etude 4: Dietary palmitate and linoleate oxidations, oxidative stress and DNA damage differ according to season in mouse lemurs exposed to a chronic food deprivation
Chapitre 5: Conclusions et perspectives 161
Chapitre 6: Références bibliographiques 181

Chapitre 1

# Préambule



## Préambule

Pour assurer sa survie, l'objectif premier d'un individu est de contrôler la quantité d'énergie qu'il assimile et celle qu'il dépense, de manière à ce que sur le long terme ces deux composantes s'équilibrent. Ainsi, le maintien de la **balance énergétique** constitue un élément clef dans l'adaptation de l'animal au sein de son milieu naturel. Cette notion découle du rôle essentiel que cette balance a sur la survie et la fécondité, et tout comportement de l'individu aura des conséquences sur sa dépense énergétique (31). Ainsi, une des questions centrales de la théorie de l'évolution réside dans le **compromis** qu'un individu réalise entre l'investissement énergétique au cours de la **reproduction** et celui alloué à sa **survie**. C'est pourquoi l'évolution a sélectionné les comportements maximisant la valeur sélective de l'individu, c'est-à-dire, maximisant le flux net de gain énergétique et optimisant la répartition entre les demandes ayant trait à la maintenance, la croissance, la réparation, la défense et la reproduction. Ainsi, au sein d'environnements fluctuants, en termes de température ou de disponibilité trophique, l'évolution a favorisé les stratégies visant au maintien de la balance énergétique.

De multiples formes de stratégies comportementales et physiologiques existent pour faire face aux variations environnementales. Le phénomène de migration constitue un exemple de réponse comportementale à une pénurie alimentaire, la plus souvent saisonnière, les animaux se déplaçant vers des contrées plus riches en ressources trophiques. De même, la constitution de réserves alimentaires représente également une réponse d'anticipation aux périodes de réduction, voir d'absence, des ressources énergétiques. Un autre exemple de réponse comportementale à un environnement énergétiquement défavorable, notamment à de basses températures ambiantes, correspond à la thermorégulation sociale qui vise à réduire les coûts énergétiques par le regroupement actif d'individus. Parmi les stratégies d'économie d'énergie, la torpeur ou l'hibernation/estivation constitue une capacité d'épargne énergétique remarquable, via une dépression métabolique, pour survivre au sein de milieux environnementaux défavorisés : basses températures ambiantes et/ou périodes de pénurie alimentaire. Ainsi, la torpeur peut être considérée comme un moyen maximisant la valeur sélective de l'individu, et donc ses chances de survie. En outre, ce mécanisme d'économie énergétique n'est pas limité exclusivement aux zones tempérées puisqu'il a été également décrit chez de nombreuses espèces animales peuplant des régions tropicales au climat très contrasté, comme c'est le cas à Madagascar.

En effet, Madagascar présente un environnement hautement fluctuant et contient l'une des communautés de primates les plus diversifiée au monde. Parmi les 92 pays contenant des populations de primates, Madagascar abrite, à elle seule, 21 % (14 sur 65) des genres de primates et 36 % (5 sur 14) de toutes les familles de primates. Aujourd'hui encore, le nombre d'espèces de lémuriens ne cesse d'augmenter et de nouvelles espèces de primates endémiques de Madagascar sont encore découvertes. Parmi l'étonnante diversité de primates, certains membres de la famille des Cheirogalidés figurent parmi les plus petits primates habitant Madagascar. Cette particularité fait d'eux des espèces énergétiquement défavorisées, en comparaison d'autres espèces de lémuriens de taille plus importante. Ainsi, chez ces petits primates, l'évolution a sélectionné des mécanismes adaptatifs d'épargne d'énergie et d'eau, pour survivre au sein de l'environnement malgache fluctuant. Au sein de l'ensemble des espèces de primates, seuls les membres de la famille des Cheirogalidés présentent des phases de réduction de la température et du métabolisme, correspondant à l'utilisation de la torpeur journalière et/ou de l'hibernation, au cours des périodes de disponibilités réduites en eau et en énergie. En particulier, un des membres de cette famille, le Microcèbe (Microcebus murinus) est largement distribué à travers toute l'île, colonisant une large variabilité d'habitats aux conditions climatiques et de végétations très différentes. Ainsi, ce petit primate malgache semble utiliser des stratégies hautement efficaces pour faire face, au sein de son environnement naturel, à des variations climatiques extrêmement marquées.

Dans le contexte des changements globaux, incluant les modifications naturelles du climat et les impacts multiples et démesurés de l'homme sur son environnement, les modèles climatiques prévoient un **accroissement** de l'**intensité** et de la **fréquence** d'occurrence des phénomènes anormaux, comme les tempêtes et cyclones tropicaux. Ainsi, une augmentation des épisodes récurrents de l'oscillation australe d'El Niño provoquera des pénuries alimentaires, de relativement longue durée, plus fréquente et d'une sévérité accrue et ce, tout au long de l'année, créant une pression croissante sur les espèces vivantes. Les espèces malgaches sont particulièrement menacées puisque demeurant dans un habitat insulaire aux saisons contrastées, où la migration et les phénomènes de radiation sont limités.

L'objectif principal de ce travail a été de **déterminer la nature et les limites physiologiques des mécanismes d'économie d'énergie** mis en place par le microcèbe pour faire face à des contraintes environnementales gradées qui, en fonction de la saison, sont considérées comme prédictibles (hiver) et non-prédictibles (été). Quatre études complémentaires ont été réalisées. Les deux premières correspondent à la caractérisation des stratégies d'économie d'énergie, et les deux dernières s'attachent à déterminer les mécanismes potentiels de l'expression ou de la répression de la torpeur, en se focalisant sur des questions récentes émergeant dans la littérature.

Chapitre 2

# Revue bibliographique





#### 1. Définition de la torpeur

La torpeur a été observée chez les petits endothermes, de moins de 10 kg, et chez quelques gros carnivores, comme l'ours et le blaireau. Ce mécanisme d'économie d'énergie se caractérise par une **réduction** concomitante, périodique et facultative, de la **température corporelle** (hétérothermie) et du **métabolisme énergétique**, conduisant à un état d'hypo métabolisme, épargnant l'eau et l'énergie, durant lequel l'animal se trouve à jeun et inactif. Cette stratégie unique a été observée de l'Arctique aux régions tropicales (72, 253) chez plusieurs espèces d'oiseaux et chez, au moins, six ordres de mammifères : monotrèmes, marsupiaux, insectivores, chiroptères, rongeurs et primates (80).

Bien que la stratégie de la torpeur soit utilisée par une large variété d'espèces animales et que de nombreuses études se soient attachées à la caractériser, la définition de ce mécanisme reste relativement floue. Certains auteurs ont adopté une définition plutôt conservative de la torpeur, et selon eux, deux états physiologiques distincts existeraient : torpides et non-torpides. L'état torpide correspondrait à une température corporelle régulée juste au-dessus de la température ambiante, i.e. état de thermoconformité (8), alors que l'état non-torpide inclurait l'ensemble des autres réponses thermiques, incluant la normothermie et la température d'activité. Une telle définition ne considère pas la température comme une variable continue, avec une multitude de possibilités de réponses, entre deux états extrêmes de torpeur et de normothermie. En tenant compte du fait que même une légère baisse de température corporelle entraîne une réduction des coûts métaboliques (73), une définition moins conservative semblerait plus adéquate. Plusieurs études utilisent une température spécifique, le plus souvent arbitraire, en dessous de laquelle la période d'hypothermie est considérée comme de la torpeur. Cependant, dans un tel cas, les températures de normothermie et d'activité ne sont pas prises en considération. De ce fait, la diminution thermique entre la valeur normothermique et celle d'entrée en torpeur, et donc la réduction de la dépense énergétique, varie grandement d'une espèce à l'autre. Par exemple, une réduction de la température corporelle en dessous de 30°C pour une chauve-souris, comme Natalus *tumidirostrus*, ayant une température d'activité/normothermie de 32,2°C, n'aura pas la même signification, en terme d'économie énergétique, qu'une chute de température corporelle en

dessous de 30°C chez le microcèbe (Microcebus murinus) dont la température corporelle d'activité est de 37°C (215). Dans cette définition encore, une légère baisse de température corporelle ne sera pas comptabilisée dans une réduction du taux métabolique. Peu d'études ont tenu compte de la température normothermique pour définir une température corporelle, espèce-dépendante, en dessous de laquelle les valeurs correspondent à des phases de torpeur. Pourtant, en adoptant une définition des épisodes de torpeur, prenant en considération la valeur de température de normothermie, il est possible d'éviter certains des problèmes soulevés par les autres définitions. Notamment, en définissant la torpeur lorsque la température corporelle chute en dessous de la température normothermique de maintien de l'activité corporelle minimale, même les faibles réductions, énergétiquement significatives, sont prises en considération dans l'épargne énergétique. Par exemple, le microcèbe (M. *murinus*) présente, au cours de ses cycles journaliers bien marqués de température corporelle, un plateau thermique considéré comme « basal », subséquent à la phase de torpeur et précédant la phase d'activité nocturne. Cet état stable représenterait la température corporelle de base (33°C) et s'assimilerait à une dépense énergétique de repos, pouvant correspondre à une température de normothermie. Enfin, plus important pour répondre aux questions des coûts et des bénéfices de la torpeur sont les mesures de la profondeur et de la durée des épisodes de torpeur.

#### 2. Caractéristiques de la torpeur

Parmi le large éventail des mammifères et oiseaux hétérothermes, une des classifications de la torpeur s'effectue selon la synchronisation, la durée et la profondeur de l'événement : on parle de torpeur **saisonnière** ou torpeur **non-saisonnière**.

La torpeur saisonnière correspond à l'estivation (été) et à l'hibernation (hiver) et les animaux utilisant ce type de torpeur montrent deux états physiologiques distincts au cours de l'année. En dehors de la période de torpeur, la masse corporelle de l'individu est relativement stable et ces animaux répondent à l'exposition au froid (0-5°C) comme des espèces non-hétérothermes : augmentation de la production et de la conservation de la chaleur pour maintenir une température corporelle élevée. Au fur et à mesure que l'hiver approche, l'hétérotherme engraisse dramatiquement (jusqu'à 50% de sa masse corporelle initiale) par des processus d'hyperphagie et d'accumulation de réserves adipeuses. Dès qu'une masse corporelle optimale est atteinte, l'animal entre dans une phase d'anorexie et la période d'hibernation proprement dite commence. Ainsi, l'exposition à des températures froides (0-

5°C) conduit à la mise en place des **phases d'hibernation**, dont le cycle annuel est déterminé par une horloge endogène (155) probablement liée au comportement supra chiasmatique (117). La durée des torpeurs saisonnières varie de plusieurs semaines à plusieurs mois, la température minimale est relativement basse (6°C), le taux métabolique est réduit en moyenne à 5% du métabolisme de repos (80). Cependant, chez certaines espèces, comme l'écureuil arctique, les besoins métaboliques peuvent diminuer jusqu'à 1% du métabolisme de repos, et même plus au cours des expositions au froid, avec l'apparition d'un état de « super-cooling » (80, 230). Les mécanismes, sous-tendant cette réduction du métabolisme, restent très controversés. Par exemple, chez le possum pygmé, la réduction du taux métabolique durant la phase de torpeur précède la chute de température, suggérant une suppression active du métabolisme plutôt qu'une descente thermique passive (228). De façon intéressante, quelques carnivores (ours et blaireaux), plus gros que les endothermes hétérothermes, ne correspondent pas à la description des hibernants faite ci-dessus. En effet, ces animaux présentent des températures corporelles plus hautes au cours de l'hibernation (28-30°C) et, comme c'est le cas au moins pour les ours, ils n'urinent, ni ne défèquent durant cette période (13, 162). De plus, ils n'émergent pas périodiquement de leur phase d'hibernation, comme c'est le cas habituellement chez l'hibernant. Le retour périodique à des températures normothermiques constitue la phase énergétiquement coûteuse de l'épisode de torpeur. En effet, pour revenir à des températures élevées et lui permettre de retrouver un état actif, l'hétérotherme doit produire une grande quantité de chaleur, et ce à partir d'une température abaissée et d'un niveau métabolique réduit. Ainsi, cette phase de réchauffement est réalisée sous l'effet d'une augmentation brutale et très importante du métabolisme énergétique. Cette large augmentation métabolique durant les périodes de réchauffement périodiques de l'hibernant correspond environ à 85-90% du budget énergétique au cours de la saison d'hibernation (39, 252). Puisque ces phases de retour à la normothermie sont si coûteuses en énergie pour l'hibernant, il est donc intéressant de se questionner quant aux raisons de ces « émergences » régulières au cours de la période d'hibernation. Les fonctions sont mal connues et celles qui ont été proposées jusqu'à aujourd'hui concernent la restauration des mécanismes de défenses anti-oxydantes, d'immunocompétence, de la fonction rénale, la restauration du sommeil, et plus récemment, les fonctions de mémoire (106).

La torpeur non-saisonnière, par définition, implique que la torpeur a lieu à n'importe quel moment de l'année, et peut-être induite par divers stimuli comme la réduction partielle ou totale de ressources énergétiques, et par l'exposition au froid ou à la sécheresse, bien que ce mécanisme puisse aussi s'exprimer en l'absence de tous ces stimuli. La représentation typique de cette torpeur est la **torpeur journalière** qui dure plusieurs heures en moyenne et dont la température minimale moyenne est d'environ 17°C, avec une large variabilité selon les espèces. Le taux métabolique est réduit à environ 30% du métabolisme de repos et peut être diminué jusqu'à 90%, lors d'expositions au froid (74). La torpeur journalière concerne de nombreuses espèces d'oiseaux mais aussi de mammifères, et les changements dans les fonctions physiologiques opérant durant cette phase, sont grandement similaires à ceux de l'hibernation, différant cependant du point de vue quantitatif (253). Néanmoins, ces mécanismes physiologiques sous-jacents demeurent très peu caractérisés.

Ainsi, deux types d'utilisation de la torpeur semble émerger : l'une saisonnière (hibernation) correspondant exclusivement aux zones dont les variations climatiques et de ressources trophiques sont hautement prévisibles (zones holarctique et montagneuses), et l'autre journalière, pouvant avoir lieu tout au long de l'année, et caractérisant des zones aux variations environnementales imprévisibles (zones afro tropicale et australiennes) (134). Néanmoins, il semble exister un troisième type d'utilisation de la torpeur, intermédiaire aux deux premiers et correspondant au recours à la torpeur journalière à caractère saisonnier, traduisant des expressions différentielles des phases d'hétérothermie selon la saison (été/hiver). Il s'agit d'un type de torpeur utilisé par les espèces tropicales vivant au sein d'environnements caractérisés par une saisonnalité marquée. Ainsi, le Cheirogaleus medius entre en torpeur journalière et/ou en hibernation au cours de la saison sèche, et sa température corporelle suit passivement la température ambiante, se plaçant juste un niveau en dessus de cette dernière (42). A l'inverse, ce primate hibernant ne présente pas systématiquement des phases d'hétérothermie durant la saison humide (41, 55). De même, certaines espèces de microcèbes, dont Microcebus murinus et M. myoxinus, utilisent les épisodes de torpeur toute l'année, en réponse aux variations atrophiques, avec une fréquence et une profondeur accrues au cours de l'hiver (11, 83, 218, 224). Nous verrons, au cours de cette étude, à travers l'exemple du Microcèbe (Microcèbe murinus), en quoi l'utilisation de ce type de torpeur diffère des torpeurs saisonnières et des torpeurs journalières non-saisonnières.

#### 3. Facteurs environnementaux influençant l'expression de la torpeur

#### a. Photopériode

La variation de photopériode, traduisant le changement de saison dans la nature, constitue un élément central dans l'expression des torpeurs. Chez la souris des bois

(*Apodemus sylvaticus*), les acclimatations à une longue photopériode et à une longue scotophase provoque une augmentation des capacités thermorégulatrices au sein de milieux, respectivement caractérisés par des températures hautes et basses (93). Ces résultats originaux suggèrent que le changement de photopériode constitue un élément d'acclimatation des mécanismes de thermorégulation. De même, chez les hamsters djungariens (*Phodopus sungorus*), la régulation saisonnière de la torpeur dépend principalement des variations annuelles de photopériode (99). Lors de l'exposition à une photopériode courte, simulant la saison hivernale, la fréquence de leurs épisodes de torpeur augmente et atteint un maximum après 130 jours sous cette condition (118).

De plus, l'organisation temporelle de la torpeur journalière est synchronisée par le cycle jour/nuit, chez de nombreuses espèces (122, 185), et dépend directement d'une horloge circadienne endogène (118), contrôlée principalement par le noyau supra chiasmatique. La variation photopériodique est captée par la rétine et l'information est transmise au noyau supra chiasmatique (NSC), qui est ainsi synchronisé. Le NSC transmet, à son tour, le message à la glande pinéale qui constitue le site à partir duquel l'information nerveuse est convertie en un message chimique, la molécule de mélatonine, dont la sécrétion s'effectue durant la nuit, chez les espèces nocturnes comme diurnes. La mélatonine joue un rôle important dans la régulation des ajustements de température corporelle, au cours des épisodes de torpeur (210). En l'absence du NSC, l'expression de la torpeur, chez le hamster sibérien, est désorganisée et présente une occurrence aléatoire (207). Les résultats de cette étude suggèrent donc que le NSC n'est pas essentiel pour l'expression de la torpeur mais joue un rôle crucial dans son organisation temporelle. De façon analogue, les écureuils terrestres (Spermophilus lateralis), dont le NSC a été retiré, expriment des épisodes de torpeur continuellement durant les 2,5 années de l'expérimentation, alors que les animaux contrôle hibernent durant environ 6 mois à chaque cycle circannuel (205).

#### b. Température ambiante

Alors que les variations photopériodiques (i.e. saisonnières) déterminent les capacités thermorégulatrices des animaux, et particulièrement celles des hétérothermes, les changements de température ambiante constituent un **facteur environnemental** modulant fortement la température corporelle. Généralement, les fluctuations de température ambiante surviennent de façon concomitante avec les changements de photopériode, reflétant les variations saisonnières. Les nombreuses études testant les effets de la température ambiante

sur l'expression de la torpeur s'accordent, pour la grande majorité, sur le fait que plus les températures extérieures sont basses, plus la propension des torpeurs est importante. Chez le hamster djungarien, l'exposition au froid (température ambiante de 5°C) conduit à une anticipation de l'apparition des premiers épisodes de torpeur (jour 52-97 vs. jour 83-99) et à une fréquence plus élevée de ceux-ci (48 vs. 20%) (209). De même, la marmotte exposée à des températures ambiantes de 5 et 15°C affiche des températures corporelles de 7,8 et 17,6°C, respectivement, au cours de sa période d'hibernation (167). Les cycles d'hibernation des écureuils terrestres dorés (Spermophilus lateralis) maintenus en chambres froides (9,5°C) sont également plus longs que ceux des animaux exposés à des températures ambiantes élevées (21°C) (155). De plus, cette influence de la température extérieure a aussi été démontrée chez des espèces en milieu naturel. Ainsi, l'expression de la torpeur est fortement corrélée avec les basses températures ambiantes, chez la musaraigne (*Elephantulus myurus*) en conditions naturelles (159). En outre, ces effets ont été reportés chez de nombreuses autres espèces animales hétérothermes, comme la souris (Mus musculus) (245), le colocolo (Dromiciops gliroides) (22), le microcèbe murin (Microcebus murinus) (224) et le dunnart à tête rayée (Sminthopsis macroura) (228).

Néanmoins, le retour aux valeurs normothermiques, à partir de températures abaissées et de métabolisme réduit, constitue un mécanisme extrêmement coûteux en énergie. Ainsi, certaines espèces hétérothermes recourent au réchauffement passif comme mécanisme limitant les coûts énergétiques liés à la remontée thermique au cours de la torpeur. Par exemple, le dunnart à tête rayée (Sminthopsis macroura), petit marsupial, présente un coût du réveil de la torpeur plus faible lorsqu'il est exposé à un cycle de température ambiante, recourant ainsi au réchauffement passif exogène durant une partie seulement de sa phase de remontée thermique (de 17-18 à 22,6°C ; soit 5°C). Ce mécanisme de réchauffement passif a également été observé chez deux espèces de microcèbes (Microcebus murinus et M. *myoxinus*) qui utilisent les larges variations de températures ambiantes, entre la nuit et le jour, caractérisant le climat malgache (169, 216, 218). Ces microcèbes augmentent passivement leur température corporelle jusqu'à atteindre environ une valeur de 28°C, à partir de laquelle la remontée thermique à des valeurs plus élevées (37-38°C) s'effectue par l'intermédiaire de la thermogenèse, probablement de non-frisson. En effet, il a été reporté l'existence d'un tissu thermogénique, le tissu adipeux brun, chez le microcèbe murin (M. murinus) (82). Ainsi, la plupart du temps, ce mécanisme de réchauffement passif intervient durant une partie du réveil, la seconde moitié étant sous contrôle actif de la thermogenèse (de frisson ou sans frisson). Néanmoins, cette stratégie est largement utilisée par de nombreuses espèces

hétérothermes et permet une économie énergétique importante, au cours du cycle de torpeur.

#### c. Disponibilité alimentaire

Au même titre que la température ambiante, la disponibilité alimentaire constitue aussi un élément influençant fortement l'expression des torpeurs. Par exemple, des musaraignes d'Afrique du sud (Elephantulus rozeti et E. myurus) entrent en torpeur spontanément lorsqu'elles sont nourries ad-libitum, mais augmentent la fréquence de leur torpeur lorsque la nourriture se fait rare (136), et ceci en été comme en hiver. De manière analogue, la fréquence des torpeurs est négativement corrélée avec la consommation alimentaire chez le hamster djugarien (Phodopus sungorus) (208)et une diminution de la disponibilité en ressources trophiques conduit à une expression prolongée des torpeurs, chez le dunnart à tête rayée (Sminthopsis macroura) (229). En situation de pénurie alimentaire, la souris épineuse dorée (Acomys russatus) utilise, notamment, la stratégie de torpeur pour survivre (49, 92). Ainsi, la profondeur de leurs épisodes de torpeur augmente graduellement jour après jour, passant d'une température corporelle minimale de  $32,6 \pm 0,1$  à  $29,0 \pm 0,4$ °C, en 3 semaines de régime hypo calorique, jusqu'à atteindre un taux métabolique minimal de  $16,1 \pm 1,1$  mlO<sub>2</sub>.h<sup>-1</sup>, soit 83% de dépression métabolique (49). D'autres études menées sur des espèces hétérothermes montrent un effet stimulateur de la restriction calorique sur l'expression des torpeurs, en termes de profondeur, durée, fréquence ou anticipation (83, 155, 171). Puisque au cours des variations saisonnières, le cycle d'allocation énergétique est étroitement lié avec celui de la température ambiante, des études ont testé, **de manière concomitante**, les effets de ces deux composants sur l'expression de la torpeur. Ainsi, chez le microcèbe murin (Microcebus *murinus*), la combinaison de la restriction alimentaire et de l'exposition au froid provoque une augmentation de la durée et de la profondeur des épisodes de torpeur dans une proportion plus importante que les réponses observées lors de l'exposition à ces deux stimuli séparément (224). De plus, l'effet combiné des basses températures et de la restriction alimentaire provoque des phases de torpeur, chez ce microcèbe, commençant plus tôt, durant la période nocturne d'activité, comme également reportée chez certaines espèces de rongeurs (238).

#### d. Facteurs sociaux

Chez certaines espèces, l'utilisation de la torpeur peut être combinée avec une stratégie de thermorégulation sociale, conduisant à un accroissement de la réduction des

coûts métaboliques déjà réalisée via la torpeur. Le gain additif de cette stratégie comportementale s'explique facilement du point de vue thermodynamique. La thermorégulation sociale permet de réduire les pertes de chaleur, en diminuant le rapport surface/volume et donc en minimisant les surfaces corporelles par lesquelles se produit l'échange de chaleur. Par exemple, ce mécanisme permet à des souris regroupées ensemble de sélectionner une température ambiante un degré en dessous de celle choisie par une souris seule (90). Au sein d'environnement naturel, cette stratégie d'économie d'énergie contribue de manière significative à la survie de certaines espèces l'employant. Ainsi, chez la marmotte, l'épargne énergétique résultant des épisodes d'hibernation ne suffit pas durant les hivers froids, affectant la survie des jeunes, dépendant grandement du comportement social de thermorégulation (9). De même, cette thermorégulation sociale est aussi largement décrite chez le seul oiseau se reproduisant durant l'hiver antarctique, le manchot empereur. En se regroupant en « tortue » (les manchots se serrent les uns contre les autres sur la banquise), ces oiseaux réduisent leur taux métabolique de 16%, ce qui constitue un élément essentiel pour le maintien des réserves corporelles chez cette espèce, durant l'éclosion de l'œuf (4). De nombreux animaux utilisant la torpeur saisonnière comme non-saisonnière recourent également à cette stratégie. Parmi ces espèces, nous pouvons citer le Coliou à dos blanc (Colius colius) (147), la souris sylvestre (Peromyscus maniculatus) (6) et le campagnol de Townsend (7).

Cette stratégie de thermorégulation sociale permet de diminuer la température interne des individus au sein du groupe. Ainsi, les manchots empereurs maintiennent des températures rectales inférieures de 1°C lorsqu'ils constituent des « tortues », comparées à celles obtenues lorsqu'ils sont maintenus en petits groupes, et inférieures de 2°C par rapport aux températures affichées par des individus isolés, dans les mêmes conditions environnementales (154, 194, 195). Il est intéressant de noter que deux espèces de primates malgaches, malgré le fait qu'ils soient non-grégaires, se regroupent au cours de la saison sèche. L'une de ces deux espèces (*Microcebus murinus*) se regroupe durant les phases diurnes, au cours de la saison sèche, et présentent des épisodes de torpeur journalière (215). Exposés à des températures basses et/ou à un jeûne, ces microcèbes montrent une augmentation accrue de la durée de la phase de torpeur lorsqu'ils sont regroupés en binôme, comparés aux animaux isolés (224).

#### 4. Énergétique de la torpeur

De manière générale, la plupart des études disponibles ne fournissent pas de solides connaissances sur la réorganisation de l'homéostasie énergétique au cours des épisodes de torpeur saisonnière, et encore moins concernant la torpeur non-saisonnière (journalière). Cependant, des études investiguant le métabolisme énergétique au cours de l'hibernation sont disponibles, et même si elles n'amènent pas à des conclusions claires, les données en résultant apportent des notions importantes de changements métaboliques au cours de ces épisodes de vie ralentie.

Bien qu'il existe parmi les hibernants, des espèces, comme le chipmunk, constituant des réserves alimentaires, la majorité des hibernants ne peuvent compter seulement que sur leurs réserves corporelles, comme combustibles durant leur phase d'hibernation. Ainsi, l'engraissement automnal peut correspondre jusqu'à 50% de leur masse corporelle et constitue un pré requis incontournable en préparation de la saison hivernale, sans quoi l'animal ne peut entrer en période d'inactivité et d'hypo métabolisme. Au cours de l'hibernation, les réserves corporelles permettent de continuer à alimenter le fonctionnement minimal qui persiste à basses températures, et leur utilisation doit également produire l'énergie nécessaire au réchauffement corporel survenant durant la phase de retour à des températures normothermiques. En outre, durant la période d'inactivité, les hibernants doivent aussi faire face à des restrictions alimentaires totales ou partielles, et de longue durée. La confrontation et la résistance au jeûne requièrent, comme pour l'homme et les autres espèces non-hétérothermes, de privilégier la disponibilité des réserves lipidiques, la gluconéogenèse et l'épargne des protéines. La conservation de la gluconéogenèse trouve son intérêt dans le fait que certains organes comme le cerveau, la partie médullaire du rein et les érythrocytes recourent principalement au métabolisme du glucose comme source énergétique. De même, l'importance de l'épargne protéique réside dans le fait qu'une masse musculaire fonctionnelle est nécessaire pour un fourragement optimal au cours de la saison d'activité qui suit, mais aussi en amont, lors des phases de remontée thermique, faisant intervenir le mécanisme du frisson.

#### a. Les lipides : principale source de carburant énergétique durant la torpeur

Comme il est largement décrit au cours du jeûne (111), les acides gras, stockés sous forme de triglycérides, au sein du tissu adipeux, deviennent la principale source d'énergie

mobilisée. En effet, de nombreuses études ont reporté des valeurs de quotient respiratoire de 0,7 durant les phases de jeûne (39), suggérant une utilisation exclusive des lipides en tant que substrat énergétique. De nombreuses données physiologiques, issues de travaux sur les marmottes (60), confortent l'idée d'un shift métabolique en faveur des réserves adipeuses. Par exemple, la capture du glucose, qui dépend de l'insuline, est réprimée ; la lipolyse est stimulée sous l'effet noradrénergique ; et la cétogenèse est maximisée.

Cependant, l'ensemble des résultats obtenus sur diverses espèces animales ne converge pas systématiquement vers une telle hypothèse. Ainsi, l'activité de lipolyse du tissu adipeux blanc du loir gris (*Glis glis*), mesurée par la libération de glycérol durant l'incubation de coupes tissulaires in vitro, n'est pas modifiée au cours de l'hibernation (3). Chez le hérisson, l'activité enzymatique de la glycérol-phosphate déshydrogénase, catalysant l'entrée du glycérol dans la voie glycolytique (forme cytosolique) et/ou son oxydation directe (forme mitochondriale), est plus élevée dans le cœur durant l'hibernation, tandis qu'elle reste inchangée dans le foie et le tissu adipeux (166). Chez l'écureuil terrestre à 13 bandes, l'activité de la lipase pancréatique (PTL), une enzyme hydrolysant les triglycérides et libérant les acides gras disponibles à être oxydés, augmente de 30% à une température de 0°C (5). Au sein du tissu adipeux, les activités de l'hormone sensitive lipase (HSL) (62) et de la PTL (15) permet un flux constant d'acides gras non estérifiés, qui peuvent être ré-estérifiés en triglycérols dans d'autres tissus. Ainsi, dans le cœur, ces triglycérides sont stockés dans des gouttelettes associées aux mitochondries et fournissent la génération de l'ATP (26). Concernant les taux d'oxydation lipidique, peu d'études récentes sont disponibles. Entenman *et al.* (51) ont montré que la production de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, résultant de l'oxydation *in vitro* du  $[^{14}C]$ palmitate, est réduite de 66% sur des coupes isolées de cœur, chez le souslik à 13 bandes (Spermophilus tridecemlineatus). Cependant, les acides gras saturés semblent être sélectivement oxydés comme substrat énergétique (176). D'un autre côté, les données disponibles suggèrent un ralentissement de la synthèse lipidique. L'incorporation de  $[^{14}C]$ glucose et de [<sup>14</sup>C]-acétate dans les triglycérides de coupes de foie, chez l'écureuil terrestre, est fortement réduite durant l'automne (septembre) comparé au printemps (juin). De plus, l'activité des enzymes, impliquées dans la synthèse lipidique, durant le mois de septembre correspond à 5% de celle qui est mesurée au cours du mois de juin, bien qu'une différence entre les diverses espèces d'écureuils terrestres existe. Par exemple, cette activité durant l'automne est réduite de moitié durant l'hibernation, chez l'écureuil terrestre arctique (Spermophilus parryii) (94) tandis qu'aucune différence existe chez le hérisson (166). Cette réduction de la synthèse lipidique a aussi été reportée au niveau hépatique chez le hamster

syrien (*Mesocricetus auratus*) (16). Ainsi, cette **utilisation préférentielle des acides gras** résulte en une **cétogenèse**, augmentant la concentration tissulaire et plasmatique de corps cétoniques, tel qu'il a été reporté durant l'hibernation chez l'écureuil spermophile de Belding (*Spermophilus beldingi*) (124). Ces mécanismes d'oxydation préférentielle des lipides conduisent donc à **épargner le glucose**, et puisque les animaux jeûnent, cette épargne du substrat glucidique permet également de **conserver les protéines**, qui constituent les majeurs précurseurs pour la synthèse de glucose, au même titre que le lactate et le glycérol.

En ce qui concerne les types d'acides gras synthétisés, il est important de noter que les animaux sont capables de synthétiser uniquement les acides gras saturés (AGS) et monoinsaturés (AGMI) de novo, mais sont incapables de synthétiser les acides gras poly-insaturés (AGPI). Ainsi, ils sont obligés de se les procurer au sein de leur régime alimentaire, la majorité des plantes étant capables de synthétiser de telles molécules. Par exemple, la présence des AGPI, dans le tissu adipeux blanc, chez l'écureuil terrestre doré (Spermophilus lateralis) et la marmotte (Marmota marmota) provient de la consommation de plantes qui en contiennent (60, 61). L'AGPI, d'origine végétale, le plus consommé par ces deux espèces hibernantes de rongeurs correspond à l'acide linoléique (60, 61). Ainsi, la nature des acides gras incorporés dans les triglycérides varie selon la composition lipidique du régime alimentaire et il est également intéressant de savoir qu'au cours de la phase pré-hibernante, la plupart des animaux incorporent une quantité donnée d'AGPI, en prévision de la période d'hibernation qui suit. En effet, pour tolérer, durant la torpeur, de basses températures corporelles, qui sont réduites bien en dessous des points de fusion des acides gras de la plupart des mammifères, les hétérothermes augmentent le degré d'insaturation de leur organisme. Ainsi, en incorporant des AGPI, ils permettent le maintien de la fluidité de l'ensemble des tissus et membranes de l'organisme, en particulier du tissu adipeux blanc et des organes vitaux, conservant alors leurs fonctionnalités à basses températures. De nombreuses études ont montré qu'un régime enrichi en AGPI augmente la propension d'entrer en torpeur, en particulier la durée et la profondeur des épisodes de torpeur sont augmentées (59, 61, 75, 242). En d'autres termes, les AGPI réduisent les points de régulation de la température corporelle durant les épisodes de torpeur, ce qui conduit à une réduction du taux métabolique, en augmentant la durée des torpeurs, impactant sur la dépense énergétique totale.

Cependant, une augmentation illimitée dans le tissu adipeux blanc de la quantité d'AGPI ne se traduit pas toujours nécessairement par une augmentation de la profondeur et de la durée des épisodes de torpeur. En effet, un régime excessivement enrichi en AGPI

augmente la température minimale au cours de la torpeur et réduit la durée de l'épisode d'hibernation, de la même manière qu'un régime appauvrit en AGPI (64, 65). Cet effet surprenant est lié au fait que les AGPI sont beaucoup plus susceptibles d'êtres peroxydés que les autres types de lipides (AGMI et AGS). De manière générale, plus les acides gras contiennent de doubles liaisons, i.e. plus ils sont insaturés, plus la susceptibilité de s'autooxyder augmente, conduisant ainsi à la génération d'un stress oxydatif plus important. Ainsi, le taux de peroxydation lipidique dans le tissu adipeux blanc du chien de prairie à queue blanche est plus important que celui du chien de prairie à queue noire, ce qui pourrait refléter des épisodes de torpeurs plus longs et plus profonds chez les premiers (95)). Des taux plasmatiques et érythrocytaires accrus de lipo-peroxydes ont également été reportés chez des ours hibernants, dont les valeurs de températures corporelles sont abaissées uniquement de 2°C environ, comparées à l'état euthermique au cours de l'été (35). En réponse à ce stress, les hibernants développent des mécanismes endogènes de défense anti-radicalaire, au cours des épisodes de torpeur (32-34, 45). Par conséquent, il existerait un niveau optimal du degré d'insaturation de l'organisme, au cours des phases d'hibernation, et l'hétérotherme modulerait ainsi sa prise alimentaire pour atteindre cette valeur avant d'entrer en période d'hibernation (61).

#### b. Inhibition de la voie glycolytique et néoglucogenèse

Au cours des épisodes d'hibernation, la **voie glycolytique** est **fortement inhibée**, conduisant à de faibles taux d'oxydation de glucose. Tamisha *et al.* (239) ont montré, chez l'écureuil terrestre, que l'apparition de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, à partir d'injection intra aortique de [<sup>14</sup>C]glucose, correspond, au cours de l'hibernation, à seulement 16% de celle des animaux actifs. Ces résultats sont renforcés par des activités réduites des enzymes clefs de la glycolyse (phosphofructo kinase et pyruvate kinase), observées, à de nombreuses reprises, dans les muscles squelettiques de diverses espèces. Ces différentes espèces correspondent au Vespertilion brun hibernant (*Myotis lucifugus*) (19), à l'écureuil terrestre arctique (*Spermophilus parryii*) (17), à la gerboise (50), à la souris sauteuse des champs (*Zapus hudsonius*) (50), à l'écureuil terrestre doré (*Spermophilus lateralis*) (23), et ces observations ont été confirmées par des analyses moléculaires (32, 231, 232). En effet, des taux d'ARNm et des niveaux d'activités enzymatiques élevés de la pyruvate déshydrogénase kinase (isoenzyme 4), chez l'écureuil terrestre hibernant, inhibent l'activité de la glycolyse (5, 24). La réduction de l'expression des ARNm et protéique et de l'activité de la glycéraldéhyde 3phosphate déhydrogenase et de l'acétyle coenzyme A carboxylase ont également été reportées respectivement, dans le muscle squelettique de gerbilles et dans le muscle cardiaque de l'écureuil terrestre, au cours de l'hibernation (231, 232).

De plus, puisque 1) le lactate ne s'accumule pas dans le sang et dans les tissus de l'hibernant (2, 69), et 2) les réserves de glycogène sont épuisées (69, 94), il est fortement probable que la faible utilisation du glucose dérive de la néoglucogenèse. En effet, une capacité de **néoglucogenèse plus importante** a été observée sur des coupes de tissu hépatique (190) et de cortex rénal (91) des écureuils terrestres hibernants, en comparaison aux animaux actifs en été. Dans la même veine, sur des coupes rénales de souslik à 13 bandes (*Spermophilus tridecemlineatus*), la capacité de néoglucogenèse est double en hiver comparée au printemps (27).

Néanmoins, lorsqu'il s'agit de néoglucogenèse, l'origine du précurseur revêt une importante particulière, notamment durant une période de jeûne. Dans leur étude, Burlington et Klain (27) ont observé une augmentation de 2 fois de la synthèse de glucose, via le glycérol. Des estimations récentes ont suggéré que la production de glycérol par la lipolyse, au cours des épisodes d'hibernation, suffit pour restaurer les 2/3 des réserves glucidiques. Tenant compte de la quantité d'urée excrétée, la contribution des protéines à la néoglucogenèse ne correspondrait pas à plus de 20% (68). Cependant, une étude menée sur des coupes hépatiques, chez l'écureuil terrestre, en hibernation, a mis en évidence une augmentation de 2 à 3 fois de la fixation du  $^{14}CO_2$  dans le glucose (119) et le glycogène, et une autre étude a montré une hausse de 14 fois de la synthèse du glycogène, à partir du  $[^{14}C]$ alanine (255). De plus, la chauve-souris brune montre une préférence pour les précurseurs d'acides aminés pour la néoglucogenèse, résultant en une perte de la masse protéique de plus de 47%, à la fin de la période d'hibernation. Au cours d'un jeûne, une perte de plus de 50% de la masse protéique provoque inévitablement la mort de l'animal (145). Ainsi, concernant la régulation de l'homéostasie glucidique, chez la plupart des espèces (à l'exception de la chauve-souris brune), les taux d'insuline et de glucagon sont réduits (253). En effet, chez plusieurs espèces de rongeurs, une réduction progressive du taux de glucose, tout au long de l'hibernation, suggère une utilisation de glucose plus rapide que sa production ou sa libération (2, 69, 211). Il est aussi intéressant de noter, au cours de l'hibernation, une réduction majeure de l'activité des systèmes endocriniens, à l'exception des cellules bêta du pancréas ; suggérant que le glucagon joue un rôle dans l'homéostasie glucidique et protéique.

Une récente revue a proposé un modèle pour le shift de substrats énergétiques, à partir du glucose vers une utilisation lipidique, durant la torpeur, au niveau du cœur, chez l'écureuil terrestre (247). Selon ce modèle, une expression génique différentielle, au cours de l'hiver, conduit à des niveaux réduits d'acétylcoenzymes A carboxylase et des taux plus élevés de pyruvate déshydrogénase kinase et de lipase pancréatique. Une activité augmentée de la pyruvate déshydrogénase kinase mène à une inhibition de la glycolyse et réduit l'accumulation d'acétylcoenzyme A. La formation de malonylcoenzyme A, à partir de l'acétylcoenzyme A, est d'autant plus réduite que le taux d'acétylcoenzyme A carboxylase est diminué, et en l'absence de malonylcoenzyme A, la carnitine palmitoyl transférase I délivre les acides gras, libérés par la phospholipase, à la mitochondrie. Néanmoins, l'implication fonctionnelle de cet intéressant modèle au niveau intégré de l'organisme et chez d'autres espèces animales reste à déterminer.

### c. Épargne protéique au cours de la torpeur

Les premières études ont montré que l'incorporation de  $[{}^{14}C]$ -méthionine dans les protéines de coupes hépatiques de souslik à 13 bandes (*Spermophilus tridecemlineatus*) est réduite de 2/3, durant l'hiver en comparaison de l'été (255). D'un autre côté, Tashima *et al.* (239) ont étudié la distribution *in vivo* du  $[{}^{14}C]$ -glucose et ont montré, malgré une réduction globale de l'utilisation de glucose, une augmentation de 5 fois de la fraction de glucose utilisé, incorporée dans les protéines. De plus, l'incorporation nette de glucose est réduite, de façon moindre dans les muscles squelettiques que dans le foie, le cœur et le tissu adipeux. Cependant, la possibilité que ces réductions soient liées à des changements au niveau des glycoprotéines n'a pas été testée. En utilisant un marquage *in vivo* et la biologie moléculaire, Frerichs *et al.* (67) ont confirmé que le taux de synthèse protéique est fortement réduit dans le foie, le cœur et le cœur, chez le souslik à 13 bandes (*Spermophilus tridecemlineatus*), au cours de l'hibernation, et cette réduction est due à une inhibition des phases d'initiation et d'élongation de la synthèse protéique.

À l'échelle de l'organisme, le métabolisme protéique, au cours de l'hibernation, a été relativement bien étudié ces dernières années. Les plus élégantes expérimentations et données disponibles *in vivo* concernent les études menées sur l'ours brun. La disparition d'albumine et l'incorporation de leucine, toutes les deux radio marquées, révèlent une augmentation de 3 à 5 fois de son taux de renouvellement protéique (137). Cependant, la production nette d'urée est réellement faible et la cétogenèse n'a pas lieu (162, 163). Nelson (162) suggère que, durant l'hibernation, les produits azotés sont capturés par fixation à l'ammoniac et produisent de l'acide alpha-kétoglutarique, par transamination. Le pyruvate utilisé dans ce processus résulte

de la lipolyse. Ainsi, l'absence d'une production nette de produits terminaux d'origine protéique, précédemment décrite, ne reflète pas l'absence de catabolisme, mais plutôt d'un renouvellement protéique accéléré. En effet, 32% des coûts énergétiques au cours de l'hiver sont consacrés à la synthèse protéique, qui, de surcroît, est d'origine lipidique à 91,5% (13). De plus, il existerait chez l'ours, un processus d'adaptation dynamique au jeûne, durant l'hibernation, et une épargne protéique avec une mobilisation du groupe des protéines structurales de collagène non-fibrillaire, et probablement des réserves protéiques des muscles lisses (129). Ainsi, ces mécanismes accrus de renouvellement protéique permettent à l'ours de ne perdre que 23% de sa force musculaire, au cours des 130 jours d'hibernation, là où l'homme en perdrait environ 90% sur la même durée de temps (96). De même, l'étude de Lohuis et al. (131) démontre qu'après 110 jours d'anorexie et de confinement, l'ours perd environ 29% de sa force musculaire et ne subit aucune altération fonctionnelle de ses muscles, durant la phase d'hibernation. En outre, une étude menée sur l'ours captif (101) reporte aussi une atrophie minime, ce qui est en accord avec les résultats obtenus sur les animaux sauvages. L'ours semble être également en balance azoté nulle au cours de l'hibernation, puisque sa synthèse et son catabolisme protéiques sont identiques, tout au long de l'hiver (130). À l'inverse, au cours de l'été, l'ours présente un anabolisme protéique plus élevé que la dégradation, suggérant une accumulation de protéines musculaires, au cours de la saison d'abondance alimentaire (130). Concernant les autres espèces, des mesures indirectes basées sur l'accumulation d'urée plasmatique et urinaire, durant l'hibernation, chez le hérisson, la marmotte, et l'écureuil terrestre suggèrent une faible oxydation nette des protéines (253). En effet, des écureuils terrestres placés sous un régime très faible en protéines sont capables d'épargner totalement leurs protéines corporelles, durant cette période (114), suggérant que les hibernants économisent leur masse protéique, au cours des phases de perte pondérale, survenant en hibernation.

Les études moléculaires sur le contrôle de l'expression protéique convergent vers une **réduction de la synthèse protéique et possiblement de la dégradation**, au cours des phases de torpeur. Ainsi, il est reporté une réduction de 40% de l'initiation transcriptionnelle, au niveau hépatique, chez les hamsters sibériens ayant atteint des taux métaboliques minimum durant la torpeur, comparé aux animaux restés normothermiques (18). De plus, il a été récemment démontré que le processus transcriptionnel d'initiation était contrôlé saisonnièrement, chez l'écureuil terrestre doré (*Spermophilus lateralis*) (248). En effet, les écureuils en été ne présentent pas le régulateur 4E-BP1 qui apparemment inhiberait l'activité du facteur d'élongation eIF4E, par phosphorylation. Au cours de l'hiver, eIF4E se lie à 4E-

BP1, et durant les périodes d'euthermie qui séparent les épisodes de torpeur, 4E-BP1 est hyperphosphorylé pour promouvoir l'initiation. À l'inverse, au cours de la phase de torpeur, 4E-BP1 est hypophosphorylé et l'initiation de la transcription, nécessitant la liaison de 4E-BP1 à eIF4E, ne peut s'effectuer. De plus, il semblerait que la protéolyse soit également réduite (249).

#### 5. Facteurs intrinsèques régulant l'expression de la torpeur

a. Système nerveux

Au cours de l'hibernation, l'interrelation entre l'activité de reproduction et l'homéostasie énergétique suggère un rôle de l'**hypothalamus** dans la thermorégulation, dans le contrôle endocrinien et le rythme au cours des épisodes de torpeur. Des évidences indiquent aussi que le **système nerveux autonome** jouerait un rôle crucial durant l'entrée et la maintenance des épisodes de torpeur (43).

L'hypothalamus antérieur préoptique (HAPO) semble jouer un rôle important dans la thermorégulation de l'organisme, puisque le refroidissement de l'HAPO initie le frisson et d'autres réponses énergétiques lorsque la température cérébrale chute en dessous d'une température minimale autorisée (100). Ainsi, au cours des épisodes de torpeur, la diminution du niveau de la température de consigne permet la réduction progressive de la température corporelle, sans déclenchement immédiat de la thermogenèse (100). L'hypothalamus abrite des neurones sensibles aux variations de température (104) et les neurones thermosensibles de l'HAPO pourraient moduler le comportement au cours de l'hibernation, par l'intermédiaire d'une inhibition des systèmes de réchauffement.

L'adénosine est un neuro-modulateur inhibiteur dont l'application exogène provoque une hypothermie, par l'intermédiaire d'une action sur le système nerveux central (149). L'administration d'un agoniste de l'adénosine (cyclohexyladénosine) induit, chez le hamster, une réduction de la température corporelle, comparable à ce qui est observé chez les espèces hibernantes (226), et l'administration d'un antagoniste (8-cyclopenthylthéophylline) provoque la sortie de la torpeur, seulement lorsqu'il est administré au début de l'épisode d'hibernation (237). Ensemble, ces résultats suggèrent que l'adénosine semble jouer un rôle dans les changements de thermorégulation durant l'entrée et les premières phases de maintenance des épisodes de torpeur. Alternativement, l'adénosine régulerait l'entrée en torpeur par
l'intermédiaire d'une neuromodulation des mécanismes du sommeil (43), puisque des études supportent l'hypothèse selon laquelle la torpeur pourrait être une extension de ce processus (116, 174, 236, 251).

Comme nous l'avons dit précédemment, le **noyau supra-chiasmatique** (NSC) est impliqué dans la régulation photopériodique de l'expression de la torpeur et constitue un composant principal dans la circuiterie, au cours de l'hibernation.

Au cours de l'entrée et de l'émergence des épisodes de torpeur, les changements fonctionnels (activité cardiaque, consommation d'oxygène, ventilation, flux sanguin cérébral,...) précéderaient les variations de température corporelle (77, 141, 244). Les actions opposées des systèmes nerveux parasympathique (SNP) et sympathique (SNS) seraient, en partie, responsables des **transitions** opérant au cours du cycle de l'hibernation. Ainsi, les changements d'activité de ces systèmes nerveux suggèrent que le **tonus parasympathique** coordonne l'**entrée dans un état hypo métabolique**, tandis que l'augmentation du **tonus sympathique** initie la **sortie de torpeur** (97, 150, 246).

En dehors des périodes de transition, le rôle du système nerveux autonome dans la régulation de l'hétérothermie est controversé. Deux hypothèses distinctes expliqueraient le mécanisme de régulation de l'état hypo métabolique « stable », au cours de l'hibernation. La première hypothèse suggère que le SNP supprime activement le SNS, et donc la sortie de torpeur, au cours de l'épisode d'hibernation (246). La seconde théorie, plus largement acceptée, soutient que les variations du tonus parasympathique disparaissent progressivement au cours de la phase de torpeur (138). Il semblerait que l'activité du SNP diminue au fur et à mesure que la température corporelle chute, puisque les faibles températures, associées à ces états d'hypo métabolisme que constituent les torpeurs profondes, sont incompatibles avec le fonctionnement du SNP (97, 138, 139). Durant les épisodes de torpeur, l'atropine et la vagotomie augmentent la fréquence cardiaque et, au moins pour l'atropine, abolie les arythmies cardiaques, chez l'écureuil terrestre (246). Plusieurs espèces hétérothermes montrent des changements périodiques et intermittents de la respiration, séparés par des apnées au cours des épisodes de torpeur. Ces périodes de ventilation spontanée sont associées à des arythmies sinusales. L'amplitude de ces tachycardies respiratoires diminue avec la température durant la torpeur (97, 150, 262). Récemment, des variations de tachycardie respiratoire ont été reportées au cours des états d'hypométabolisme de torpeur, chez le dunnart à queue adipeuse et le possum pygmé (265, 266). Ces études démontrent que l'antagonisme du SNP élimine la variabilité et réduit le

rythme cardiaque, de la même manière que la vagotomie chez l'écureuil terrestre (246). Ces divers résultats suggèrent fortement que les influences parasympathiques (via le nerf vague notamment) sont partiellement inhibées durant les épisodes de torpeur.

#### b. Hormones

Parmi la grande variété des hormones, celles bien connues pour réguler l'homéostasie énergétique semblent fortement impliquées dans les modulations des processus de torpeur. Ainsi, la leptine, une hormone anorexigène, sécrétée par le tissus adipeux blanc, régulent l'expression des torpeurs. Un traitement de leptine réduit de moitié la durée des épisodes de torpeur, augmente la température minimale journalière moyenne de 4,5°C et multiplie le taux métabolique par 2,2 fois, conduisant à une augmentation de 9% de la dépense énergétique (78). Dans cette étude, ces changements ne concernent que l'épisode de torpeur puisque la température corporelle, au cours de la phase active, n'est pas modifiée. De manière concordante, il a été proposé qu'une réduction drastique des concentrations de leptine constitue un signal déclenchant un mécanisme, encore inconnu, initiant l'occurrence de la torpeur (66). La leptine inhibe la libération du neuropeptide Y (NPY) au niveau de l'hypothalamus et l'injection de NPY induit l'expression de la torpeur (175). Ainsi, lors de l'épuisement des réserves adipeuses, les faibles concentrations de leptine sont permissives pour l'expression de la torpeur, probablement par l'intermédiaire de la levée de l'inhibition de sécrétion du NPY. Il est aussi intéressant à noter que l'étude, menée par Gavrilova et al. (71), démontre que, chez la souris déficiente en tissu adipeux blanc et présentant de faibles taux de leptine, la torpeur, induite par une période de jeûne, n'est pas inhibée par l'administration de leptine. Le même traitement à la leptine abolit complètement l'expression de la torpeur, chez la souris obèse (masse abondante de tissus adipeux) n'exprimant pas la leptine. Ainsi, les données de cette étude suggèrent l'existence d'au moins deux signaux pour l'entrée en torpeur chez la souris : une faible concentration de leptine et un autre signal indépendant du taux de leptine. Une autre hormone, sécrétée par le tractus gastro-intestinal, la ghréline (oréxigène), est impliquée dans les mécanismes de régulation de la torpeur puisqu'une injection périphérique de cette hormone induit, chez la souris, un approfondissement des épisodes de torpeur d'environ 4°C, par l'intermédiaire de la signalisation neuronale impliquant le NPY, au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus (86). Enfin une seconde hormone d'origine intestinale, le glucagon-like peptide 1 (GLP-1), régule la température corporelle. Sousha et al. (227) ont démontré que l'injection intra-péritonéale et intra-cérébroventriculaire de GLP-1

diminue la température corporelle, chez la caille japonaise, 2 heures après l'administration.

Les hormones liées à l'activité reproduction influencent également l'occurrence des épisodes de torpeur. En effet, la capacité limitée des animaux à entrer en torpeur résulte de leur activité de reproduction, comme reporté chez l'engoulevent de Nuttall (*Phalaenoptilus nuttallii*) (38) et la souris mâle (*Saccostomus campestris*) (160). En particulier, la **testostérone** inhibe l'expression de la torpeur chez ce dernier mais aussi chez le hamster sibérien (*Phodopus sungorus*) (170, 206). En effet, les épisodes de torpeur chez les animaux acclimatés à l'été sont complètement inhibés, après castration, lors d'un traitement avec la testostérone, alors qu'une infusion en continue de **prolactine** n'a aucun effet sur ces animaux (206). En revanche, les hamsters sibériens, acclimatés à l'hiver, cessent immédiatement d'exprimer des torpeurs au cours de l'infusion de prolactine, en continue. Dans les 3 jours qui suivent, les épisodes de torpeur sont restaurés dès le retrait de la pompe osmotique diffusant la prolactine. Ainsi, la prolactine est incompatible avec l'expression des torpeurs, chez les animaux en été, s'exprime via un mécanisme indépendant de la prolactine.

#### 6. Conclusions

La torpeur correspond donc à un extraordinaire mécanisme d'économie énergétique par **diminution de la température interne** associée à un **ralentissement des flux métaboliques**, et permet à de nombreuses espèces animales, des régions arctiques aux tropiques, de survivre au sein d'habitats aux fortes contraintes environnementales. Néanmoins, l'utilisation de la torpeur est associée à de nombreux **coûts physiologiques**, comme la génération d'un stress oxydant élevé ou des altérations du sommeil dont l'implication n'a été que récemment prise en compte. Ainsi, le non-recours à la torpeur par l'utilisation de stratégies alternatives d'épargne énergétique existerait pour faire face à un environnement fluctuant. Un bon modèle animal pour étudier de tels mécanismes correspond au Microcèbe (*Microcebus murinus*), primate malgache énergétiquement défavorisé du fait de sa petite taille, et recourant à la torpeur pour survivre au sein de son habitat au climat très contrasté.

A unique model to study the strategies of energy economy in contrasted climates

#### 1. <u>Phylogeny and morphology</u>

#### a. Phylogeny

Malagasy primates, one of the six groups of living primates in the world (144), are endemic of Madagascar and their particularity is the monophyletic character of their evolution. Therefore, ancestral common *Lemuridae* colonized, in one time and by an unknown mean, the island between 47 and 54 million years ago, giving rise to an astonishing diversity of Malagasy primates (240). Cytogenetic studies have demonstrated that karyotype of *Cheirogaleidae* family would have diverged the latest from ancestral karyotype, remaining almost identical to the latter (260). The sub-family of *Cheirogaleidae* includes four genus: *Allocebus, Cheirogaleus, Mirza* and *Microcebus*. In particular, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*) belongs to the genus *Microcebus* (*Figure 1*), which the shape is considered as the most representative of the ancestral primate stock (47).

Historically, we have known little about the diversity of mouse lemur taxonomy. Though, scientists initially considered the genus *Microcebus* as monotypic, containing only *M. murinus* (Miller in 1777). In 1972, based on the study of Martin (142), realized in the southeast of Madagascar (Mandena), the two sub-species previously described, *M. murinus* and *M. Rufus*, were recognized as two distinct species (241). *Microcebus murinus* also named the grey mouse lemur colonizes dry forests of the western Madagascar whereas *M. rufus* also named rufous mouse lemur (Geoffroy in 1834) lives in the wet forests in the east of the island (*Figure 2*).

Then, this taxonomy remained unchanged until the nineties with the discovery of two new species (*Figure 2*), morphologically different from *M. rufus* and living in sympatry with *M. murinus*: *M. myoxinus* also called pygmy mouse lemur (Peters in 1852), the smallest primate known in the world and remaining in synonymy during a long time, and *M. ravelobensis* also called golden mouse lemur (263).



From Yoder et al. 2000

<u>Figure 1</u>: Phylogeny of Microcebus from mitochondrial DNA sequences of the control region homologous with the hyper variable region 1 in humans, COII and cytochrome b. Clades are indicated in color to emphasize species diversity of mouse lemurs. From Yoder et al. 2000.



<u>Figure 2</u>: Madagascar's map showing distribution of mouse lemurs, with geographic ranges for Microcebus murinus and M. rufus (from Mittermeier et al. 1994), and ranges of other mouse lemurs re-created from Yoder et al. 2000 and Rasolorison et al. 2000. Capital letters (A-D) indicate the localities of the proposed Microcebus species. From Louis et al. 2008.

Since new species of *Microcebus* were discovered (*Figure 2*), searchers carried out news studies in the western and northern Madagascar, re-examined rigorously museum materials and added genetic data. Results of such investigations clarified *Microcebus* taxonomy of the western island, by discovering four new species: *M. tavaratra* also called northern rufous mouse lemur and only known at Ankarana (204), *M. sambiranensis* (204) also known at Manongarivo, *M. berthae* (204) at Kirindy and previously described as *M. myoxinus* by Schmid and Kappeler (221), *M. griseorufus* (Kollman in 1910) also named red-and-grey mouse lemur at Beza Mahafaly. In addition to the eight accepted species (the four species previously named plus *M. murinus*, *M. rufus*, *M. myoxinus* and *M. ravenlobensis*), three species (*M. jollyae*, *M. mittermeieri* and *M. simmonsi*) have been newly described and four others have been proposed (132, 165).

#### b. Morphology

The grey mouse lemur, one of the smallest primates in the world, shows an average length head-tail of 258 mm and a head-body/tail ratio of 0.95. Due to the fact of its browngrey fur, *M. murinus* is able to pass unnoticed through thick tree branches, where it sleeps and lives in order to escape from predation. According to its arboreal lifestyle, the grey mouse lemur also has the ability to easily jump on several meters from branch to branch, thank to its powerful posterior legs each provided by opposable thumb and dermatoglyphics for adhesion and stability improved on such surface. Its eyes are voluminous (1.5% of the body mass) and are localized in a frontal position with prominent and open cornea, which allow a wide visual field (230°, e.g. 50° more than that of human). As prosimians, it has anatomic adaptations for a nocturnal vision, like the *tapetum lucidum*, a structure that upholsters the substance of the eye, and for limiting the amount of light, during the daytime, that activates photoreceptors, like a nyctitante membrane and a large oval ward with a vertical axis (173, 212). In addition, all the studies conclude that the grey mouse lemur does not have a color vision. The ear flags are highly developed, particularly mobile and wrinkled, and may be headed toward a sound source independently of each other (212).

In wild, *M. murinus* shows average body mass of 60 and 90 g in summer and in winter, respectively (*Figure 3*). It is noteworthy that females *M. murinus* are heavier than males, whatever the season. In the study conducted in Mandena by Martin in 1973 (143) on adult wild grey mouse lemurs, only one male (on 37 studied) over 70 g was found, whereas almost 25% of the females, weighted prior their gestation, were heavier than 70 g. Body mass of *M. murinus* decreases with increasing ambient temperature from south to north when comparing data from 3 populations of grey mouse lemurs inhabiting the evergreen littoral rain forest of the south (Madena), the dry deciduous forest of the west (Kirindy) and the dry deciduous forest of the northwest (Ampijoroa) of Madagascar (127). Therefore, constraints of thermoregulation for *M. murinus* result in the latitudinal gradient of their body masses.



Figure 3: Adult grey mouse lemur (Microcebus murinus) in summer.

#### 2. Distribution and habitat

Spread over 587.000 km<sup>2</sup>, Madagascar, the worlds fourth largest island, has a diverse topography as well as diverse regional climates. The east coast and the west side, represent two bio-geographical zones separated by the central plateau. Lemur communities are present in the three distinct types of habitats differentiated by their vegetation and climatic characteristics (*Figure 4*).



<u>Figure 4:</u> Madagascar maps showing the 3 different habitats of dry spiny desert, deciduous tropical and rain forests, as well as the geographical distribution of the grey mouse lemur on the West and South sides of the island. Main study sites on mouse lemurs are indicated. The map is modified from Wright (1999). North is up.

The south of island is characterized by a dry spiny desert environment interspersed with gallery forest, the western side shows deciduous tropical forests and the eastern coast of the island is covered by rain forests (*Figure 5*). Madagascar also undergoes strong seasonal climatic fluctuations that vary along the wide latitudinal expanse, from the north to the south (*Figure 6*). Mean winter/summer ambient temperatures vary between 18/25°C in the south of the island, and 24/27°C and 24/28°C in the west coast and east side, respectively. Annual precipitation levels also largely differ between the 3 habitats.



**Primary forest** 



Secondary forest

<u>Figure 5</u>: Photos of primary (A), secondary (B) and dry (C) Malagasy forests



Dry forest

It goes from the low level of 500 mm/yr in the southern to the high rainfall level of 2000-4000 mm/yr in the east side of the island. Madagascar's west coast shows intermediate level of 700-1200 mm/yr and is characterized by a pronounced seasonality. From April to November the food and water availability is drastically reduced compared to the rest of the year marked by the rainy season (102). Temperatures can drop to 10°C in the night and rise above 25°C in the afternoon during the dry season, in the west side of Madagascar. In addition to this marked seasonality, Madagascar experiences severe drought associated to cyclones and storms, which occur in an unpredictable way. In particular, El Niño Southern Oscillation (ENSO; *Figure 7*) occurs almost every decade and lasts up to several months in summer, as observed in 1982-1983 and 1994-1995 El Niño episodes, and results in unpredictable food shortage during the food-abundant season.

The grey mouse lemur lives in the dry deciduous and spiny desert forests of the western and southern Madagascar, respectively (*Figure 4*) (151, 241). Mouse lemurs are generally active in what can be called the fine branch niche (142). The heights at which fine branches, lianas and dense foliage are present determine the height at which mouse lemurs usually evolve. In secondary forest and pathside vegetation mouse lemurs are encountered from the ground up to heights of about 10 meters whereas they can reach up to the canopy heights (15 to 30 meters) inside the dense primary forests. Mouse lemurs also move low in the forest when they need to reach a destination otherwise out of leaping range (more than 3 meters) if they were to use purely arboreal routes.



<u>Figure 6</u>: Seasonal patterns of ambient temperatures (Ta, minimal and maximal) and rainfall level in 3 study sites along the West coast of Madagascar, from North to South: Ampijoroa (A), Kirindy (B) and Mandena (C). The dry period is indicated into shaded and the black bar at the bottom of the graphs mentions the rainy season. Seasonal fluctuation of food resources is reported only for the Mandena site.



<u>Figure 7</u>: El Niño phenomenon as a factor of selective pressure for energy strategies. The nature of the different impacts of El Niño is categorized into wet, dry and warm effects. From "Biogéographie de Madagascar" (1996; edition WR Lorenço, ORSTOM, Paris).

Due to its small size and its insectivorous-omnivorous diet the *M. murinus* is well adapted to the secondary forests. Moreover the nesting habits of the grey mouse lemur make such forests very attractive. Mouse lemurs usually nest in spherical leaf nests or in tree-hollow nests lined with a small number of leaves. Such sleeping sites provide shelter from the high daily temperature fluctuations as well as from predators. The Mandena area, covered mainly with secondary littoral forests, probably contains a vast number of suitable nest-hollows. The relatively small sized trees of the area have a natural growing feature which combined with the action of fungi, insects or other agents is responsible for the high frequency of propitious nesting hollows. Such hollows also appear with great regularity in other forest areas of Madagascar thus providing a wide range of nesting opportunities for the mouse lemurs. Grey mouse lemurs are common in secondary forests and are potentially able to survive in the absence of primary forests. This is certainly not the case for the other small Malagasy primates, as the other species of *Microcebus*, which are locally distributed on the island and then threatened by anthropization, especially deforestation.

#### 3. Feeding behavior

*M. murinus* forage alone at night. Their primary food resources are fruits, flowers, leaves, insects, arachnids, gums, insect secretions and probably small vertebrates (37, 143). Insect secretions account for up to 40% of their feeding time, especially during the late dry season when it represents the main feeding resource of the *Mircocebus murinus* (199). This correlates to the fact that insect secretions determine the habitat usage patterns and with the conclusions of the study conducted in the Kirindy forest of the west-Madagascar during the austral winter (July-August 1993) by Corbin and Schmid (37): the ranging behavior of a female *M. murinus* is strongly influenced by the presence of Homeopteran secretions, from which they are nourished. Field studies showed that the mouse lemur diet also includes sap (142, 199). The sap is collected by using their dentition, particularly the tooth-scraper as a sap-collecting instrument. The author reports having seen a male grey mouse lemur using characteristic tooth-scraper movements and tongue movements to eat sap from a tree. He also mentioned an animal, which was using self-grooming like movements of its tooth-scraper over an area of tree bark covered with small insects. Insects and small quantities of sap were probably ingested.

The determination of the feeding behavior of the *M. murinus* is based more on drawn interferences from repeated association with certain known food-plants than on direct observation. Observations of mouse lemurs on the two main food-plants (*Vaccinium emirnense* and *Uapaca sp.*), during the study conducted by Martin (142), represent 43% of the total observations, despite the relative rarity of the two plants in the study area. Mouse lemurs probably depend more on food derived from a small number of plant species than on insects or small animal preys, which are can be caught rapidly in an opportunistic fashion. The two studies conducted by Martin in 1968 and 1970 in the Mandena area support the suggestion that the mouse lemur specializes on particular local food resources.

#### 4. Social structure and population dynamics

#### a. Social structure and home range

Female dominance for feeding priority is a common trait among lemur species. In the case of the grey mouse lemur it is the base of the social organization of grey mouse lemur populations (201). Mouse lemurs are organized around females and dominant males, which constitute the center of population nuclei. While the territories of the nuclei members seem to be superimposed, the dominated males are forced to live in the periphery. This results in a female bias in the core and a male bias in the periphery marking a profound difference in the sex ratio between the nuclei core and periphery (142).

Recent field studies showed that the home ranges of dispersed radio-collared males and females may very well overlap (54, 172, 197, 198). During the mating season, the home ranges of males increase significantly indicating an active search for estrous females (112, 197, 198). It was also noticed that home ranges in the dry forests are smaller than those in the humid littoral forests.

Mouse lemurs may regroup and share nests during their diurnal sleeping period. The size and composition of sleeping groups varies seasonally (14, 142, 172). During winter, nest-hollows can provide shelter for groups of up to ten individuals (sexes-mixed). During the mating period, male/female nest sharing occurs more frequently and in most of the mixed sex groups observed, only one male was present among a group of females. In the post-estrous period, females cluster in spatially grouped nest each containing 3 to 4 individuals. Thus, females sharing a same nest are most of the time genetically related. The study of Radespiel *et al.* (200) revealed that five out of six female sleeping groups consisted of one or more closely related dyads, whereas females that slept alone did not have close female kin in the vicinity or within the whole population. Males on the other hand nest in open vegetation and alone, for 79 and 71% of the individuals tracked, respectively, (125) and closely related female dyads live in a closer proximity than closely related male dyads (200). The nest sharing strategy plays an important role in limiting energetic costs during diurnal resting periods (181). Nest usage patterns are closely related to territory usage patterns.

Therefore, the inter-sexual resource competition and the female dominance, probably explain the sex-specific differences in the quality of sleeping sites used and the differential parental investment of both sexes.

#### b. Communication

In the grey mouse lemur, social communications are largely dependant of odorant signals (feces and urine), corresponding to a complex and long-lived, actively or passively dispersed by various marking behavior (ano-genital, anal, genital, urinary and salivary) (212). In particular, the urine is often used as chemical cues and receptive structures are specifically stimulated by urine of other individuals. Thus, these signals allow the animals to delimitate their vital domain, to inform congeners from the physiological and hierarchical status.

Mouse lemurs also emit cries in ultrasonic frequencies, which allow individual recognition and constitute a quality index of males for the females. Visual exchanges play a minor role for this nocturnal specie inhabiting dense forests. The visual language of the grey mouse lemur is relatively small compared to that of simian, as it rarely comes of use except during the resting phase. Mouse lemurs can simply express excitation, threaten, fear, submission...

#### c. Longevity: life length and predation

Few studies aimed to determine the predators of the grey mouse lemur, but, among those that are known, it mainly concerns the nocturnal raptors, small carnivores and some snakes (89). Predation at the sleeping site, for example by raptors preying upon mouse lemurs in tree holes, has been observed (88). Most probably to increase concealment and the likelihood of detecting predators, mouse lemurs adopt gregarious behaviors; a primitive character inherited from ancestor primate (113). Often females with offspring prefer using safe and thermally isolated nests while males often shift between several low quality sleeping sites as a possible risk-reducing strategy (198).

In addition to the pressure of predation, marked daily temperature fluctuations also constitute a high source of mortality and, as a result, competition over safe and thermally insulated sleeping sites exists between mouse lemurs. Lahann *et al.* (127) postulated that constraints of thermoregulation result in the latitudinal gradient of body mass, which increases as ambient temperature decreases. Ganzhorn and Schmid (70) aimed to identify the causes of low population densities of mouse lemurs in secondary forests, compared to primary dry deciduous forests. Their study revealed that fewer females go into torpor in secondary than primary forests, due to higher ambient temperatures in secondary than in primary forests, avoiding mouse lemurs to maintain prolonged torpor bouts. Furthermore, the weaker year-to-

year recapture rate in secondary than in primary forests, reported in their study, indicates that survival rates are lower in secondary than in primary forests.

Although the studies on wild mouse lemurs do not allow determining precisely the life span of this species, it is assumed that the grey mouse lemur has a short life length in the wild. The maximum lifespan reported for a mouse lemur was 6 years and the average longevity was estimated approximately to 3-4 years. This short life span in wild is associated with the high annual predation rate, compared to other primate species, which has been estimated, at least, at 25% of the whole population (88). Fed *ad-libitum* and not exposed to predation, mouse lemurs in captivity usually die before reaching 9 years of age (178) but life spans of up to 12 years were observed. These long life spans of the grey mouse lemur are rather unexpected for its size when compared with other rodents (12).

#### 5. <u>Reproduction</u>

#### a. Seasonality of reproduction

It is a striking feature of all Malagasy lemur species studied that they exhibit a strictly seasonal pattern of breeding, regardless of local climatic zone. It would appear that a major factor in the timing of the breeding season for each species is the requirement that offspring should be weaned at a time of maximum food availability. This ensures that infants, the most vulnerable members of the species, are able to accumulate sufficient tissue nutrient reserves to survive the subsequent period of poor food availability.

The breeding season is rather short and restricted to the rainy hot summer months (*Figure 8*). The reproduction is associated with sustained behavioral activity and physiological functions, and mating typically begins in mid-September, when females become in estrus. When the estrus happens, the vaginal area becomes attractive for males, by thickening and coloring itself, and then opens. This vaginal opening lasts 3 to 4 days but the female stays receptive only for few hours (4-6 hours). A vaginal plug can be formed after the mating and the suture remains visible in a free zone. The gestation period last approximately 60 days ( $60.2 \pm 1.7$  days) (182, 184) and first births occur in mid-November when the rainy season is already under way (142). This short gestation period allows theoretically, for each adult female, to produce and rear two or three successive litters in the period of September to April. This would be an important demographic factor with a small mammal, which has a typical litter-size of only 2-3 and exhibits restriction of reproduction to the short rainy period.

It has been reported that the number of litters per year is highest in the littoral rain forest (2 or 3 litters/yr) but much lower in the dry forest areas: 1 litter/yr in the western forests in Kirindy and 1 or 2 litters/yr in Ampijoroa in the northwest of Madagascar (126, 127). Male mouse lemurs anticipate the sexual activation by one month before the rainy season and their testes growth rapidly, reaching a maximal size just before that the female estrus happens. It has been reported that males can visit female sleeping sites at dusk, waiting for the females to emerge and then attempting to mate (197).



<u>Figure 8</u>: Schematic representation of the temporal organization of seasonal reproduction cycle in the grey mouse lemur according to sexes. Photos showing testis regression and recrudescence of male mouse lemurs, and female estrus are from Perret, personal data.

#### b. Photoperiodic control

In the wild, seasonal physiological and behavioral changes of the grey mouse lemur are dependent of the local photoperiod variation, which vary between 11 and 13 hours by day, in winter and in summer, respectively. Experiments have demonstrated that these seasonal changes remains unchanged in captive mouse lemurs under a natural photoperiod of our latitude or under artificial light photoperiod (11, 84, 182, 187). The light and particularly the day-length stimulate the retina as a zeitgeber and the information is transmitted to the suprachiasmatic nucleus, corresponding to the main oscillators that generate endogenous circadian rhythms. Then, the photoperiodic cue is mediated by the pineal gland that secretes the melatonin hormone and neural transmission from the retina results in an increase in the duration of melatonin secretion during the night. Therefore, these nucleuses stage the daily and seasonal rhythms of the organism. Exposure to artificial light cycles consisting of alternate periods of short- (SD) and long-days (LD) led to cyclic variations in body mass and reproductive function in both male and female mouse lemurs. Exposure to SD (< 12h of light by day) leads to a complete inhibition of reproductive functions in the both sexes, to a fattening and to metabolic reductions. Conversely, LD exposure (> 12h of light by day) stimulates the reproductive activity and triggers drastic changes in behavioral and physiological (endocrinal) parameters (185, 187).

In the male, no endogenous rhythm has been reported so far and the seasonal rhytmicity then requires alternating long and short day-lengths. Long-days exposure leads to modifications in the turnover of neurotransmitters, induced by melatonin changes, which trigger a progressive increase in prolactin secretion and counteract the inhibitory effect of endogenous opioids on the Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) generator. These secretions leads to sexual activation through a steroid-dependant mechanism involving sensitivity of the hypothalamo-pituitary feedback to testosterone and changes in luteizing hormone receptors or enzymatic activity of the testes. Plasma testosterone shows circ-annual cycle and concentrations are low (9 ng/ml) in mouse lemurs under short-days exposure and reach high levels (60 ng/ml) in animals under long-days exposure (Figure 9A) (182). Nevertheless, the control of male reproductive system is based on the existence of refractory period during which the sexual functions spontaneously regress or develop in the reverse phase of the induction signal (185). The presence of a critical photoperiod reinforces the stage acquired during the latest refractory period and temporarily determines the following refractory phase. Therefore, the duration of the reproductive season seems to be independent from the climatic environmental conditions. Conversely to the male, the female grey mouse lemur shows an endogenous rhythm of estrus emergence, independently of photoperiodic variations (Figure 9B). The circannual period of this endogenous rhythm is longer than one year (60 weeks) and is then synchronized to the annual period by the succession of photoperiods above (stimulation) or below (inhibition) the critical photoperiod. Therefore, according to the climatic conditions, this system allows certain variability in the start of the reproductive season from one year to another, but triggers a high synchronism of estrus in each population nucleus of females.



*<u>Figure 9</u>: A: Seasonal changes in testis size and testosterone level in male grey mouse lemurs. B: Seasonal variations of female estrus and birth in the grey mouse lemur. Shadow area indicates short-days exposure (winter-like state).* 

#### c. Sexual selection

The sexual male emergence takes place in a context of a strong inter-male competition for their respective vital domain (the largest and the closest to that of females) and represents high-energy costs during a period where food resources are not yet available. During the reproductive season, males establish a strict hierarchy, where only the dominant male mates with females (polygyny). Subordinate males have lower body masses than the dominant one and seem to be sexually suppressed (183), probably by volatile chemosignals in the urine of the dominant male (182). Therefore, the dominant male has the highest reproductive success (180, 182, 188, 213). A study of Fietz (53) provided evidence that heavier males were more closely associated with females than lighter males, indicating that contest competition between males may influence spatial access to females. Nevertheless, in certain conditions, mouse lemurs can mate promiscuously (males and females mate randomly). A field study (54) reported a spatial distribution of *M. murinus* where male home ranges, larger than female ones, were mutually overlapping, a lack of sexual dimorphism and relatively large testes, altogether suggesting a promiscuous rather than a polygynous mating system. Most probably, male grey mouse lemurs would exhibit several mating tactics in which switching depends on short-term local variations in monopolization potential mediated by fertilization probability, number or alternative mating opportunities and costs of defense (48). Therefore, the system of sexual selection appears extremely plastic, according to the local conditions and a dispersed multi-male system, derived from promiscuity, may be linked to ancestral conditions for primates (156).

Seasonal reproductive rhythms triggering by photoperiodic variations can also be modified by signals from the social environment. Social effects on the physiological and behavioral sexual responses strongly depend of the social organization of the grey mouse lemur and of its mode of social communication. Although olfactory communication is on great importance in mouse lemurs, acoustic signals are also employed in sexual responses (25).

In captivity, when males are grouped with females, sexual competition for the priority access to receptive females emerges as the main factor of the inter-male relation. Indeed, sexually active females produce chemical signals, which lead males to compete. Dominant males try to monopolize the female by hunting any other male who approaches, particularly when the female is close to the vaginal opening and becomes receptive (179, 182). Only dominant males show testosterone levels similar to those of isolated males, whereas the amplitude and the period of the seasonal rhythm of testosterone are modified in dominated males (179). Testosterone variations of mouse lemurs during sexual competition are reproducible by using only the odorant signals, acting as a pheromone (179, 182, 213). Therefore, only the odor of urine female triggers an increase in testosterone in isolated males and the reduction of reproductive hormones observed in dominated males can be obtained in isolated male exposed to urine of an unknown dominant male. Moreover, this exposure leads to an increase in cortisol level (214) and a reduction in testis size and body mass of the dominated male (188, 189). The nature of the inhibitory signal (active compound) of the male sexual function is unknown, but the lipophilic part of the urine contains efficient factors, which has been reported to quantitatively, rather than qualitatively, differ between dominant and dominated males. When an inhibitory pheromone signal is present, the activity of the olfactory bulbs would be modified leading to modifications of relationships between melatonin and central neurotransmitters, to rapid and elevated hyper-secretion of prolactin exerting a negative effect on the GnRH pulse generator, and to an increase in sensitivity of the testosterone negative feedback via the inhibitory effect of endogenous opioids, possible reinforced by corticoids (182).

Whereas sexual inhibitions in grouping males exist, phenomenon of estrus cycle suppression or behavioral inhibition were not reported in grouped females. The occurrence of seasonal estrus is entirely under photoperiodic control, with however synchronization reinforced when males are presents (179). Similarly, fecundity is not modified by social environment, but lengthening of estrous cycles can be observed when females are maintained in a large group of females. These modifications are linked to disturbance of the follicular phase through a hyper-corticoid secretion, which would reflect a passive competition between females. These effects of social environment (lengthening of cycles in grouped females and estrus synchronism in presence of males) disappear when females are deprived from olfactory inputs, supporting the crucial role of olfactory communication in the expression of sexual functions of the female mouse lemur. The most surprising effect concerns changes in the sex ratio at birth (184). Indeed, on 285 newborns, grouped females give birth to more males (67%), whereas females isolated before the conception produce significantly more females (60.4%). This could be due to hormonal variations triggering by a passive competition between females before estrus.

#### 6. Energy balance

#### a. Seasonal rhythm

The Cheirogaleidae family includes the only primate members able to fatten during the autumn and enter torpor in forecast to the unfavorable season. Particularly, the grey mouse lemur shows a strong seasonal cycle of body mass (*Figure 10A*) (220) and uses mechanisms of energy saving during the dry period. Thus, mouse lemurs in autumn fatten and progressively reduce their physical activity (103, 143, 217). *Microcebus murinus* shows a strong seasonal cycle of activity, both in the wild and under laboratory conditions (*Figure 11*) (48, 185).



Figure 10: Seasonal body mass variations of the grey mouse lemur in the wild (A) and in laboratory under photoperiodic control (B). Data of body mass values come from Rasoazanabary (2006) for wild animals and Perret and Aujard (2001) for captive mouse lemurs. The dry season and short-days period are indicated into shaded.



From Erkert & Kappeler 2004

*Figure 11*: Seasonal pattern and quantity of daily locomotor's activities of the grey mouse lemur. From Erkert and Kappeler (2004).

Wild mouse lemurs spontaneously enter torpor over a wide range of ambient temperature along the wintering period, but not during the rainy season (218, 223) and show a strict seasonal pattern of behavioral activity. Indeed, mouse lemurs are mainly active during the mating season and reduced their foraging activities along the sexual rest in winter. Nevertheless, the grey mouse lemur shows sex-specific activity patterns during the winter season. As reported by Schmid (217), 73.1% of adult females but only 18.9% of adult males remain inactive for several weeks to 4-5 months throughout the cool dry season. Inactive females store fat before the onset of the inactive phase and lost 31.7% of their body mass during the dry winter, but inactive males hardly store fat, and their body mass does not change all along the period of inactivity. Duration of inactivity is usually longer for females than males, due to early emergence of males. In kirindy forest, male mouse lemurs seem to remain active during all the dry season, whereas females stay inactive for this period (203). Therefore, high levels of activity during the scarce season would prepare male for the following mating period and, by remaining active throughout the dry period, certain males may position themselves to monopolize the best tree holes during the mating season. Microcebus murinus has evolved two different strategies to survive the cool dry season

(48, 217): being generally active but combined with daily torpor (< 24h), and remaining inactive for days to several weeks, which might be associated with prolonged bouts of torpor (217). Mouse lemurs also regroup themselves during their diurnal resting phase and laboratory studies reveal that both sexes reduce their energy costs by 20-40% when grouped in pairs or by three, respectively. When three or four individuals share the same nest, resting energy expenditure reach a minimal value of  $0.88 \text{ mlO}_2.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ , independently of sex and season (181). This nest sharing strategy is an important way to minimize energy costs to cope with the fluctuating Malagasy environment.

Ganzhorn and Schmid (70) demonstrated that mouse lemurs achieve lower body mass in secondary forests than in primary forests. This may be a result of reduced food availability, and this reduced body mass allows fewer animals to enter prolonged torpor bouts, as mouse lemurs show daily reduction of body temperature and metabolic rate during their diurnal resting phase. According to this point, the same number of males and females remain active in secondary forests while many females seem to remain fully inactive in the primary forests. In addition to a lower body mass, the secondary forests provide fewer options for prolonged torpor because of lower densities of large, snapped or fallen trees, which could provides holes as suitable sleeping sites. Furthermore, ambient temperatures are much higher in secondary forests than in primary forests and this feature does not allow mouse lemurs to sustain prolonged torpor bouts. Indeed, in the tree holes of primary forests, the highest daily temperatures are on average only slightly above 28°C that is the critical temperature above which *Microcebus murinus* have to terminate torpor. Ambient temperatures exceed this threshold more frequently in secondary forests.

In laboratory, annual body mass cycle (*Figure 10B*) of mouse lemurs is reproduced under constant conditions of ambient temperature and humidity, by alternating periods of summer-like long-days and winter-like short-days (185, 193). Body mass averages 70-80 g in long-days and rises to 120 g in short-days. Occurrence of short-days predicts the cold and dry season and led to specific winter-adaptations in mouse lemurs. Indeed, the exposure to shortdays triggers an increase in food intake and leads to fattening process. As short-days progress (winter season in the field), mouse lemurs reduce their resting metabolic rate by approximately 20%, reflecting a better thermal insulation due to fat stores, water is conserved and food intake is spontaneously reduced. Resting energy expenditure and water loss of mouse lemurs reach minimal values after 3 months of short-days exposure (187). Therefore, the autumnal fattening and the subsequent metabolic changes proceed from two distinct mechanisms in the grey mouse lemur. First, an increase in food intake may result in an increase in melatonin secretion, under short-days exposure. Second, a decrease of energy expenditure may be due to the melatonin-induced hypothyroidism (85). Conversely, exposure to long photoperiod leads to a body mass decrease and a clear increase in metabolic costs (187), i.e. increased resting energy expenditure and water loss, mainly through evaporation (186). In addition, plasma thyroxin levels and cortisol excretion similarly increase in both sexes following long-days exposure (84). There is an annual variation of plasma thyroxin ( $T_4$ ) level in the grey mouse lemur, averages ranging between 30 and 68 ng/ml in long-days mouse lemurs (February to July) and falling to 6 ng/ml in short-days animals (November) (192). Body temperature is also affected by the photoperiod and mouse lemurs under short-days show deeper and more frequent torpor bouts than animals under long-days (11).

#### b. Daily rhythm

Like other members of the Cheirogaleidae family, the grey mouse lemur is known for its ability to enter torpor during the dry season in response to cold temperatures and low food and water sources (20, 142, 143, 168, 169, 193, 216, 218). Under natural cycle of ambient temperature, wild mouse lemurs is active during the first hours of the night and then display spontaneous torpor occurring on a daily basis (*Figure 12*) and lasting between 3.6 and 17.6 hours (168, 169, 216, 218). Daily rhythms of body temperature and locomotor's activity are also well reproduced in captivity (*Figure 13*) (83, 185, 224). Both under short-days (winter) and long-days (summer), mouse lemurs show daily torpor that starts by a rapid and linear drop in body temperature, reaching a minimal value after 3h, followed by a spontaneous rewarming to normothermic level 3h later. Although constant in its pattern, the onset of daily torpor is triggered by the onset of the light in photoperiod from 10:14h to 15:9h light-darkness.

Measurement of oxygen consumption in mouse lemurs maintained in an outdoor enclosure reveals that metabolic rate during torpor are reduced by 70-80% of the normothermic value (169, 216). In wild animals, entries in torpor occur throughout their nocturnal activity period and termination of torpor appears to be determined by the high air temperatures found daily around mid-day (*Figure 12*).



Modified from Schmid 2000

Figure 12: Daily patterns of oxygen consumption  $(VO_2)$  and, body  $(T_b)$  and ambient  $(T_a)$  temperatures in a captive grey mouse lemur individual, held in an outdoor enclosure. The dark horizontal bar indicates the nocturnal period. Modified from Schmid (2000).



<u>Figure 13</u>: Daily patterns of body temperature and locomotor's activity in a captive grey mouse lemur maintained under winter-like short-days exposure and constant conditions of ambient temperature and humidity. a.u: arbitrary unit.

Arousal from torpor in mouse lemurs corresponds to a two-step process with an initial passive climb in body temperature with ambient temperature (oxygen consumption remains approximately constant), allowing an increase in energy saving derived from torpor. When a temperature around 28°C is reached, active heat production is initiated to raise a body temperature to normothermic level. The recent finding of brown adipose tissues in the grey mouse lemur (82) supports the existence of an active final part in the torpor arousal process. Arousal is always followed by a period of moderate normothermia until dusk, which mouse lemurs spend inside its nest box.

Mouse lemurs are considered as solitary primates since they move alone during the nocturnal phase but they also regroup themselves in tree holes during the resting diurnal period. This strategy of nest sharing is an important way to minimize energetic costs in this small solitary primate, since it allows energy savings of 20-40% according to the number of individuals sharing the nest (181). In the wild, tree holes had an insulating effect, and fluctuations of air temperatures were less extreme inside the holes than outside them. The insulation capacity of the tree holes peaked between 8 and 11 hr, when ambient temperatures

ranged between 25 and 30°C. By occupying insulating tree holes, mouse lemurs may stay longer in torpor, which increases their daily energy savings by an extra 5% (219).

The use of daily torpor by the grey mouse lemur corresponds to an adaptive strategy to survive in a challenging environment. It has been reported by captive studies that, short-term periods of food restriction and/or low ambient temperatures modulate the expression of torpor episodes in the grey mouse lemur (*Figure 14*) (83, 224). Therefore, an 8-day food deprivation of 80% triggers an increase in the frequency and the depth of torpor episodes of mouse lemurs, in both seasons (83). Similarly, winter-like short-days acclimated mouse lemurs lengthened and/or deepened their torpor bouts when faced to a 3-day period of fasting and/or exposed to low temperatures, and the combination of the two conditions of food restriction and low temperature exposure results in a further increase in the torpor depth and the duration (224). In addition, nest sharing (in pairs) modifies the effects of cold exposure and food deprivation previously reported, by lengthening torpor duration, without increasing its depth. Such experimental results strongly suggest that daily torpor appears as a rapid and adaptive response to periods of food restriction and low ambient temperatures, which occur whatever the season, although greater in animals under winter phenotype, and enhanced by social thermoregulation.



Data from Génin and Perret 2003; Séguy and Perret 2005

*Figure 14*: Daily patterns of deep torpor as a response to calorie restriction in *Microcebus murinus (Génin and Perret 2003; Séguy and Perret 2005).* 

#### 7. Conclusion

The grey mouse lemur, a small arboreal prosimian endemic to Madagascar, colonizes different various habitats characterized by a highly fluctuating environment. This nocturnal primate displayed a strict seasonal breeding during summer months, shows a strong seasonal cycle of body mass and relies to the torpor-mediated energy saving strategy to face period of limited resource availability during the scarce season. These biological rhythms confer to the grey mouse lemur a great plasticity to face both seasonal and non-seasonal unfavorable conditions, such as food shortages. Based on previous experimental studies investigating the effects of short-term period of food restriction/low ambient temperatures in mouse lemurs, it is thought that *M. murinus* has efficient mechanisms, through the use of torpor, to face periods of low ambient temperatures and food availability. Nevertheless, in the context of the ongoing global climate change, it becomes crucial to determine to which extent this physiological plasticity allows the grey mouse lemur to face chronic food scarcities of various intensities.

Chapitre 3

# Objectifs de l'étude



### **Objectifs de l'étude**

Cette étude se place dans le contexte de l'adaptation des espèces animales face aux fluctuations des contraintes environnementales. Parmi les nombreuses stratégies sélectionnées par l'évolution pour faire face à ces variations, le mécanisme de la torpeur constitue une réponse adaptative permettant de réduire les coûts énergétiques par un abaissement de la température corporelle associé à une diminution du métabolisme. Ce mécanisme évolutif a été largement décrit chez de nombreuses espèces animales, des régions arctiques aux tropiques, et son expression est réglée par des facteurs intrinsèques (système nerveux, hormones...) comme extrinsèques (photopériode, température, disponibilité alimentaire...). Le Microcèbe (Microcebus murinus), espèce primate endémique de Madagascar, utilise la torpeur afin de survivre au sein de son environnement fluctuant, à la saisonnalité très marquée. Ce lémurien, de petite taille, peut faire face à des phénomènes récurrents mais non-périodiques, comme les tempêtes et les cyclones tropicaux, survenant au cours de la saison de reproduction. En particulier, l'oscillation australe d'El Niño (ENSO : El Niño-Southern Oscillation) affecte la large zone de l'Océan Indien, au sein de laquelle se positionne Madagascar, provoquant des périodes de sécheresse associées à des pénuries alimentaires, durant la saison humide. Au cours des prochaines décennies, la fréquence et l'intensité de ces phénomènes climatiques sont amenées à s'accroître, provoquant une pression accrue sur les espèces vivantes animales et végétales.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail a été de **déterminer la nature et les limites physiologiques des mécanismes d'économie d'énergie** mis en place par le microcèbe pour faire face à des contraintes environnementales gradées qui, en fonction de la saison, sont considérées comme prédictibles (hiver) et non-prédictibles (été). Quatre études complémentaires ont été réalisées avec les objectifs spécifiques suivants : Étude 1 : Déterminer et quantifier les modulations de la <u>température corporelle</u> et de l'<u>activité locomotrice</u> du Microcèbe, au cours de 5 semaines d'une pénurie alimentaire expérimentale incrémentée (40 et 80%).

Étude 2 : Déterminer et quantifier l'impact des stratégies observées dans l'étude 1 sur le métabolisme énergétique du Microcèbe, au cours du même protocole expérimental. Le faible recours à la torpeur observé chez les animaux acclimatés à l'été, nous a conduit à examiner d'autres stratégies d'économie d'énergie, comme les stratégies d'« épargne lipidique » et d'« épargne protéique », en étudiant la <u>composition corporelle</u> et le <u>renouvellement</u> protéique du fait de son impact significatif sur les besoins énergétiques.

Étude 3 : Caractériser une partie des mécanismes impliqués dans l'expression de la torpeur et dans la régulation de la masse corporelle, en déterminant les implications potentielles des <u>hormones</u> régulant le métabolisme énergétique dans ces mécanismes.

Étude 4 : Déterminer l'existence d'un éventuel compromis coût/bénéfice entre l'épargne d'<u>acides gras poly-insaturés</u> par l'organisme et la génération, au cours des épisodes de torpeur, d'un <u>stress oxydant</u> dépendant de la saison et qui pourrait contribuer à la faible utilisation de la torpeur chez les animaux acclimatés à l'été.

Chapitre 4

## **Résultats**


# Chronic Food Shortage and Seasonal Modulations of Daily Torpor and Locomotor Activity in the Grey Mouse Lemur (*Microcebus murinus*)



Sylvain Giroud, Stéphane Blanc, Fabienne Aujard, Frédéric Bertrand, Caroline Gilbert and Martine Perret. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294: R1958-R1967, 2008.

## Introduction

Les prédictions actuelles sur le changement global envisagent un accroissement de l'intensité et de la fréquence des pénuries alimentaires imprévisibles, portant une menace accrue sur le monde animal et végétal.

Madagascar constitue une zone prioritaire pour la conservation de la biodiversité, du fait de son niveau élevé d'endémisme. Les espèces animales malgaches présentent toutefois des mécanismes adaptatifs hautement sophistiqués pour faire face aux contraintes environnementales saisonnières marquées. Dans le contexte des changements globaux c'est la plasticité de ces mécanismes adaptatifs qui déterminera la capacité des animaux à survivre.

Le Microcèbe (*Microcebus murinus*), l'un des plus petits primates malgaches, de part sa capacité originale pour un primate à réaliser des épisodes de torpeur, est un modèle unique pour étudier les limites des plasticités adaptatives mises en place pour faire face à une pénurie alimentaire chronique.

## **Objectifs**

L'objectif de cette première étude est de déterminer la nature et les limites des mécanismes saisonniers de modulation de température corporelle et d'activité locomotrice du Microcèbe en réponse à une pénurie alimentaire chronique, à deux niveaux d'intensité : modérée et sévère.

#### Matériel et méthodes

La température corporelle et l'activité locomotrice ont été mesurées par télémétrie chez des microcèbes mâles (n = 24) exposés à des jours courts (JC, acclimatés à l'hiver) et à des jours longs (JL, acclimatés à l'été), au cours de 35 jours d'une restriction calorique modérée (40%) et sévère (80%).

## Résultats

Lorsqu'ils sont exposés en JC et quelle que soit l'intensité de la restriction alimentaire, les microcèbes augmentent immédiatement, par 4,6 fois, la profondeur et la durée de leur torpeur, et entrent en torpeur 2,4 fois plus tôt, en moyenne. Ces ajustements de température corporelle sont efficaces pour maintenir une masse corporelle constante, face à une restriction énergétique de 40%, tandis qu'ils n'ont pas empêché une perte pondérale de 0,71  $\pm$  0,11 g/jr durant une restriction alimentaire sévère de 80%. Les animaux en JL, privés de 40% de leur besoin énergétique, combinent un léger abaissement immédiat de 1°C de la profondeur de leur phase de torpeur et une réduction tardive de leur activité locomotrice, résultant en une perte de masse corporelle modérée de 6%. Après 15 jours de restriction alimentaire sévère de 80%, les microcèbes en JL mettent en place un phénotype comparable aux animaux en JC, en augmentant la durée de leur torpeur et en anticipant son entrée de 16 min/jr. Ces modifications de température n'ont eu toutefois aucun impact sur leur perte pondérale (0,93  $\pm$  0,07 g/jr) puisque l'activité locomotrice augmente par 4 fois.

## **Discussion - conclusion**

La torpeur journalière permet à *Microcebus murinus* de faire face à une pénurie alimentaire modérée, quelle que soit la photopériode, mais n'enraye pas le déséquilibre énergétique engendré par une pénurie alimentaire sévère et ce, particulièrement chez les animaux exposés en JL. Bien que le rôle de la thermorégulation sociale dans les économies d'énergie nécessite des investigations supplémentaires, la survie de *M. murinus* serait menacée durant les pénuries alimentaires chroniques sévères survenant en été. Toutefois, la faible perte de masse des animaux en JL lors de restriction calorique modérée suggère le recours à d'autres stratégies d'économie que la torpeur.

Signalement bibliographique ajouté par le :

# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG Service Commun de Documentation

Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur (Microcebus murinus)

Sylvain GIROUD, Stéphane BLANC, Fabienne AUJARD, Frédéric BERTRAND, Caroline GILBERT and Martine PERRET

American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2008, vol. 294, pages R1958-R1967

## Pages 77-86 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur : http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00794.2007

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services : <u>http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/</u>



# The Grey Mouse Lemur Uses Season-dependent Fat or Protein Sparing Strategies to Face Chronic Food Restriction



Sylvain Giroud, Martine Perret, Peter Stein, Joëlle Goudable, Fabienne Aujard, Jean-Patrice Robin, Yvon Le Maho, Alexandre Zahariev, Iman Momken and Stéphane Blanc.

*American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiolgy,* Soumis.

## Résumé – Etude 2

#### Introduction

Bien que le mécanisme de la torpeur augmente les chances de survie au sein d'un environnement en ressources limitées et améliore le succès reproducteur, son utilisation ne semble pas nécessairement privilégiée, lorsque l'énergie est en quantité juste suffisante. En effet, maintenir un niveau métabolique élevé chez les endothermes est associé à de nombreux avantages, alors que le recours à la torpeur implique la cessation de toute activité et peut engendrer des coûts physiologiques importants. Dans une étude précédente, les profils d'expression de la torpeur du Microcèbe (Microcebus murinus) ont été évalués en fonction de la disponibilité alimentaire. Seuls les microcèbes sous phénotype hivernal augmentaient leur propension à entrer en torpeur, quel que soit le degré de la restriction énergétique (40 ou 80%), alors que les animaux acclimatés à l'été ne présentaient que de faibles modifications de leurs épisodes de torpeur, sous un régime modéré de 40% de réduction des besoins caloriques, mais stabilisaient leur masse corporelle à un niveau inférieur. C'est seulement après 15 jours d'une restriction calorique sévère de 80% que les microcèbes en été présentaient un phénotype hivernal, en augmentant la durée et la profondeur de leurs phases de torpeur. Le non recours à la torpeur observé chez les microcèbes sous phénotype d'été pourrait être dû aux diverses conséquences physiologiques négatives des périodes de sortie de torpeur, probablement responsables des dommages somatiques survenant au cours d'une restriction calorique sévère. Ainsi, le non recourt à la torpeur pourrait refléter l'absence de besoins énergétiques plutôt qu'une incapacité physiologique, et une stratégie alternative pourrait résider dans le type de réserves énergétiques corporelles utilisé au cours des périodes de faibles ressources trophiques. Chez les hétérothermes saisonniers, comme Microcebus murinus, les animaux en état d'hiver disposent de larges réserves adipeuses pour subvenir à leurs besoins énergétiques durant les périodes de pénurie alimentaire, tandis que les animaux en état estival pourraient épargner leur masse grasse et réduire leur masse maigre, réalisant ainsi une large économie énergétique, puisque le renouvellement protéique correspond jusqu'à environ 40% des besoins énergétiques de repos. Cette stratégie permettrait donc aux animaux de maintenir une valeur sélective, à un niveau corporel réduit. Par conséquent, il apparaît important de déterminer les changements des taux de renouvellement protéique, de la dépense énergétique et de la composition corporelle, accompagnant l'expression hivernale ou la non utilisation de la torpeur au cours de l'été, pour comprendre les stratégies d'économie

d'énergie utilisées par le Microcèbe pour régler sa balance énergétique durant les périodes prévisibles ou imprévisibles de pénurie alimentaire.

#### **Objectifs**

L'objectif de cette étude est donc de compléter les premières observations, en évaluant les métabolismes protéique et énergétique, au cours d'une restriction calorique graduée chez les microcèbes acclimatés à l'hiver ou à l'été.

#### Matériel et méthodes

Des mesures de composition corporelle, de renouvellement protéique et de dépense énergétique totale (DET) au cours d'une restriction calorique (RC) incrémentée (40 et 80%) sont réalisées chez des animaux acclimatés en jours courts (hiver; JC40 et JC80, respectivement) ou en jours longs (été ; JL40 et JL80, respectivement).

#### Résultats

Les microcèbes en JL40 présentent une balance azotée négative, résultant en une réduction de 12% de la masse maigre (MM) et aucune modification de la masse grasse (MG). Après 35 jours de RC, les animaux en JL40 atteignent un nouvel état d'équilibre énergétique, du fait d'une balance azotée positive. La réduction de 25% de la DET des animaux en JL, restreints en énergie à 40%, s'explique principalement par les changements de MM. Les animaux en JL80 présentent une perte de masse corporelle constante et sont exclus du protocole de RC au 22<sup>e</sup> jour, puisque ayant atteint des niveaux pondéraux pouvant affecter leur survie. Aucune donnée supplémentaire n'est donc disponible pour ce groupe d'animaux. Les microcèbes en JC40 diminuent significativement leur niveau de MG de 21%, tout en maintenant leur MM. L'épargne protéique est réalisée à travers la diminution de la synthèse et du catabolisme protéique, de 35 et 39%, respectivement, permettant le maintien de la balance azotée. La réduction de 21% des besoins énergétiques s'explique par une diminution de 30% du flux azoté, associée à l'utilisation de la torpeur, puisque la DET ajustée à la MM demeure 13% inférieure à la normale. Les animaux en JC80 sont incapables de maintenir leurs balances énergétique et azotée, et perdent simultanément de la MG et de la MM, après la RC.

## Discussion

Ainsi, les microcèbes en été et restreints en énergie équilibrent leur balance énergétique, en réduisant transitoirement leur masse métaboliquement active, sans recourir aux épisodes de torpeur. À l'inverse, les animaux acclimatés à l'hiver économisent leur masse protéique et de l'énergie à travers une expression accrue des phases de torpeur. Ces deux stratégies ont un impact direct sur la valeur sélective des animaux en : 1) conservant un niveau d'activité au cours de la saison de reproduction, mais à une masse corporelle ayant des besoins énergétiques réduits et 2) préserver une masse et une fonction musculaire optimales durant la période hivernale de pénurie alimentaire.

#### ABSTRACT

To understand energy saving strategies used by the grey mouse lemur to respond to predicted and unpredicted food shortages, we assessed protein and energy metabolisms associated with wintering torpor expression or summering torpor avoidance. We investigated body composition, whole body protein turnover, and total energy expenditure (TEE), during a graded (40 and 80%) calorie restriction (CR) in winter-like short-days (SD40 and SD80, respectively) and summer-like long-days (LD40 and LD80, respectively) acclimated animals. Up to day 35 of CR, LD40 animals experienced a negative nitrogen balance, resulting in a 12% reduction in fat free mass (FFM) and no change in fat mass (FM). Thereafter, a new equilibrium was reached as nitrogen balance became positive. The 25% TEE reduction, in LD40 food-deprived group was mainly explained by FFM changes. LD80 animals showed a steady body mass loss and were excluded from the CR trial at day 22, since they reached a survival-threatened body mass. No data were available for this group. SD40 food-deprived mouse lemurs significantly decreased their FM level by 21%, but maintained FFM. Protein sparing was achieved through a 35 and 39% decrease in protein synthesis and catabolism, respectively, overall maintaining nitrogen balance. The 21% reduction in energy requirement was explained by the 30% drop in nitrogen flux but also by torpor as TEE FFM-adjusted remained 13% lower compared to baseline. Food-deprived SD80 animals were unable to maintain energy and nitrogen balances and lost both FM and FFM. Thus summering fooddeprived mouse lemurs equilibrate energy balance by a rapid loss of the active metabolic mass without using torpor, whereas wintering animals spare protein and energy through increased torpor expression. Both strategies have direct fitness implication: 1) to maintain activities at a lower body size during the mating season and 2) to preserve an optimal muscle mass and function during winter.

KEYWORDS: Microcebus murinus, torpor, nitrogen balance, energetic stress

## **INTRODUCTION**

Torpor is associated with a profound reduction of energy expenditure to as little as 3% of the euthermic rates at ambient temperature (25). The fitness advantages of torpor are two folds. It likely improves survival during periods of food shortage or reproductive rest and may increase reproductive success following these periods.

Energy conservation through torpor is likely to be essential for surviving prolonged periods of restricted energy availability. Nevertheless more energy conservation may not necessarily be better if energy is available at a minimal but sufficient level. High rates of metabolism have been speculated to be beneficial for endotherms when resources are abundant (29). Given that torpor is associated with a full cessation of activity as well as relatively deep physiological disruption (18), even mammals confined in a laboratory were shown to benefit from keeping high rates of metabolism when sufficient energy was provided (10).

We found evidence for such hypothesis in a recent study in which we investigated the pattern of torpor expression of the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*) as a function of food availability (13). This heterothermic prosimian shows marked seasonal changes in body mass to the predictable Malagasy cycle of food allocations. During the summer season, mouse lemurs are in an active reproductive state. After autumnal fattening, there is an increase in periods of torpor to conserve energy, in order to cope with the drastic food shortages of the dry and cold season. We found that only wintering mouse lemurs increase their torpor propensity, either during moderate (40%) or severe (80%) calorie restriction (13). Conversely, animals in the summer phenotype show little change in their torpor patterns when energy intake is moderately restricted by 40% and are able to stabilize their body mass at a lower level. It is only after 15 days of a severe 80% food deprivation that mouse lemurs in summer exhibit a winter phenotype, by increasing the duration and depth of their torpor bouts (13).

The torpor avoidance observed with the summer phenotype may be associated to the several reported negative physiological consequences of torpor arousal. Furthermore, because of the potential euthermic restoration, detectable somatic damage and loss of function may only occur in increased torpor episodes reported during severe energy limitation. The accumulating evidence for important and widespread costs of torpor raises the question of whether the assumption that optimal energy economy necessarily involves maximizing the depth and duration of torpor bouts is valid. Indeed the lack of torpor expression may reflect an absence of energy availability rather than a lack of physiological capability. An alternative

strategy might be linked to the type of energy stores used as fuel during the period of food shortage.

Seasonal heterotherms such as *Microcebus murinus* accumulate and subsequently loss energy stores in a yearly body mass gain-loss cycle. Most of the increase in mass is due to an increase in lipid stores; accordingly endogenous lipids are the main source of energy utilized during periods of food scarcity and protein are spared. Protein sparing is facilitated during food shortage by an increase in lipolysis and ketogenesis. Hibernators spontaneously experience a starvation-like state during the body mass-loss phase of the weight cycle. Hibernating ground squirrels on a very low calorie diet have been shown to spare protein during this period (15). Caloric deprivation during the normal period of fattening, however, may result in hibernators experiencing "fat sparing". Bachman (1) found that partially fooddeprived Belding ground squirrel lost fat-free mass but not lipid mass during the summer. Furthermore, food-restricted arctic ground squirrels increase lipid mass even as body mass decreases during the summer. Given that the energy costs of protein turnover can account for 20 to 40% of the basal metabolic rate (24), any modulation of the fat-free mass may represent an important strategy of energy economy that will maintain fitness at a lower body size.

Knowing the changes in the rate of whole body protein turnover, energy expenditure, and body composition that accompany torpor expression during winter and torpor avoidance during summer is essential to understand the strategies of energy economy used by the grey mouse lemur to face predicted and unpredicted food shortage and thus regulate energy balance. The present study extended our previous observations by investigating the protein-energy interrelationship during graded calorie restriction in the winter and summer acclimated mouse lemurs (13). We specifically hypothesized that this species use both protein and fat sparing strategies according to the season to face moderate food shortage in order to ultimately preserve fitness.

#### **MATERIAL AND METHODS**

## Animals

The 34 adult male grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*, Cheirogaleidae, Primates) used in this study were born in the laboratory breeding-colony of Brunoy (UMR7179 CNRS/MNHN, France; European Institutions Agreement # 962773) from a stock originally caught along the southwestern coast of Madagascar 40 years ago. Seasonal Malagasy rhythms were reproduced by alternating 6-month periods of long-days (light:dark

14:10) and short-days (light:dark 10:14). Mouse lemurs were transferred in our laboratory at Strasbourg (UMR7178 CNRS/ULP, France) and housed individually in cages (70 x 68 x 52 cm), visually separated from each other, in order to minimize social influences. The relative humidity in animal rooms was maintained constant (55%), mouse lemurs were kept at ambient room temperatures of 25°C, under long-days (LD) and short-days (SD) exposures, respectively.

### Energy intake and calorie restriction

After a month of acclimatization to their new environment, individual calorie intakes were measured during a 10-day period, in order to calculate subsequent food-restricted energy allotments. Animals were fed, in *ad-libitum* conditions, on fresh banana and a standardized homemade mixture containing baby cereals, spice bread, egg, concentrated milk, white cheese, vitamins and dietary minerals (Vitapaulia/MR, Intervet, France and Toison d'or, Clément Thékan, France). Since grey mouse lemurs, and particularly those under winter phenotype, tend to overfeed when isolated and thus gain mass during the *ad-libitum* period, energy intake was clamped to the level required to stabilize their body mass. This was necessary to avoid significant underestimation of the calorie restriction (CR) needed for the test diets. Each individual was initially fed *ad-libitum* with banana and the homemade mixture and progressively, daily energy intake was narrowed according to the body mass time-course, as already done in our previous study (13).

Half of the animals in each photoperiod were then provided with 60% (=40% CR) or 20% (=80% CR) of these individually derived energy requirements, during 35 days. Food-restricted allotments were available every day at the onset of the dark phase. Water was always provided *ad-libitum*. Daily food intake was calculated from the difference between provided and remaining food weights and was corrected for dehydration. Energy equivalents of 3.7 kJ/g for the banana and 4.6 kJ/g for the mixture were used to convert grams of food intake to kJ. During the 35-day food restriction period, mouse lemurs in the 40% CR received an energy allotment of either 47.5  $\pm$  1.3 kJ/day (LD40, long day, 40% restriction) or 45.8  $\pm$  3.3 kJ/day (SD40, short day, 40% restriction). The 80% food-restricted LD (LD80) and SD animals (SD80) were provided with an energy allocation of 16.5  $\pm$  2.5 kJ/day and 15.5  $\pm$  0.6 kJ/day, respectively. The LD80 mouse lemur group weighed 78  $\pm$  2 g under *ad-libitum* diet weighed, 52  $\pm$  1 g after 22 days on the 80% restriction diet. According to the data from the Brunoy colony, weights of 50 g are survival threatening for this photoperiod (21). Therefore, these animals were excluded from the study before the end of the food-deprived

trial, replaced in the breeding colony and re-fed with an *ad-libitum* diet. No urine samples were collected or energy measurements were performed in the CR period for this group.

## **Protocol overview**

Each animal was studied during the *ad-libitum* period and again after 35 days of CR. The tests were identical in both conditions and consisted of the measurement of total energy expenditure (TEE), fat-free mass (FFM), fat mass (FM), water flux rate (rH<sub>2</sub>0), energy expenditure by the doubly labeled water (DLW) method, resting energy expenditure (REE) by respirometry, protein turnover by using [<sup>15</sup>N]-glycine, and catecholamine concentrations in a 24-hr pooled urine.

## Total energy expenditure, body composition and water turnover

TEE was determined during a 2-day period by the multipoint DLW methodology (27). A baseline urine sample was quickly collected from gentle pressure on the bladder and a premixed 2 g/(kg estimated total body water, TBW) dose of DLW was intravenously injected to the animals. The dose was composed of 0.55 g/(kg estimated TBW) 97%  $H_2^{18}O$  (Rotem Industries Ltd., Israel) and 0.15 g/(kg estimated TBW) 99.9% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) and was diluted with 3% NaCl to physiological osmolarity. We assumed a percentage of hydration of 0.60 and 0.55 for LD and SD animals, respectively, to calculate doses. The doses were calculated to ensure an *in vivo* enrichment of about 250 and 1200 ‰ for 18-oxygen and deuterium, respectively [‰ (delta per mil) =  $(R_{sample} / R_{standard} - 1) * 1000$  with R being the ratio heavy to light isotope]. Isotopic equilibration in body water was determined from a blood sample collected at 1-h post-dose from quick sampling of the saphenous vein. Immediately after collection, blood-containing capillaries were rapidly flame-sealed. The mouse lemur was then released inside is own cage and urine samples were collected in cryogenically stable tubes 24 and 48 h after blood collection. Blood and urine samples were respectively stored at 5°C and -20°C until analyses by isotope ratio mass spectrometry.

Water from serum and urine samples were extracted by cryo-distilation, as previously described (39). 0.1µL of water was reduced to hydrogen and carbon monoxide by reduction on a glassy carbon reactor held at 1400°C in an elemental analyzer (Flash HT; ThermoFisher Germany). Hydrogen and carbon monoxide gases were separated by a GC column held at 104°C coupled to a continuous-flow Delta-V isotope ratio mass spectrometer. Isotopic abundances of deuterium and 18-oxygen in hydrogen and carbon monoxide gazes were

measured in quintuplicate and repeated if SD exceeded 2 and 0.5 ‰, respectively. All enrichments were expressed against International Atomic Energy Agency standards.

CO<sub>2</sub> production was calculated according to the single pool equation of Speakman (28):

 $rCO_2 = (N / 2.078) \cdot (k_o - k_d) - 0.0062 \cdot k_d \cdot N$ , where N represents the average isotope dilution space of oxygen-18 calculated from Coward (5) by the plateau method using the 1-hour postdose sample.  $k_o$  and  $k_d$  represents the isotope constant elimination rates calculated by linear regression of the natural logarithm of isotope enrichment as a function of elapsed time from day 1 samples. TEE was calculated by the Weir's equation (37) using a food quotient of 0.823 estimated from the animal's diet. Total body water (TBW) was measured from the dilution space of 18-oxygen after correction for exchange by the factor 1.007 (23). FFM was calculated from TBW by assuming hydration coefficient of 73.2% that was shown not affected by chronic CR (2). FM was calculated by the difference of FFM from the body mass. rH<sub>2</sub>0 was assessed by the multiplication of the average isotope dilution space of oxygen-18 (N) with the deuterium constant elimination rate (K<sub>d</sub>) and corrected for isotope fractionation (28).

## **Resting energy expenditure (REE)**

Oxygen (O<sub>2</sub>) consumption was measured using an open-circuit respirometry system (Sable Systems International, Las Vegas, USA). The concentration of O<sub>2</sub> in the outgoing air was successively measured in four cages (27 x 27 x 27 cm) including one cage left vacant as reference for the ambient gas concentrations. Measurements were performed continuously over 48 h, excluding a daily 20-min period required for calibration of O<sub>2</sub> analyzer. Calculations of O<sub>2</sub> consumption were derived from the second day of respirometry measurement, the first day being considered for mouse lemurs as a habituation period to confinement. The system was rinsed for 90 s between each measurement. Each cage was sampled during 180 s (1 sample per second) every 9 min and final values of O<sub>2</sub> concentration was the mean of values recording during 60 s. Energy expenditure was calculated by using an energy equivalent of 20.1 J/ml O<sub>2</sub>. As mouse lemur shows marked daily rhythm of body temperature (Tb) and metabolic rate with an active state restricted during the dark phase. REE was estimated during the resting normothermic period, which follows torpor bout and precedes the dark phase, and expressed as kJ.min<sup>-1</sup>.

## Nitrogen balance and protein turnover

Animals were individually placed in metabolic cages for 24 hours after one week on

the *ad-libitum* control diet and after the 35 days of calorie restriction. During those 24-hour periods, food intake was measured and cumulated feces and urine were collected on ice. Total nitrogen in urine was measured by chemo luminescence (Antek 7000, ALYTECH – Juvisy Sur Orge – France) and by the Kjedkhal method in feces and food, as previously described (4). Nitrogen balance was calculated as difference between nitrogen intake and the excretions in urine and feces.

During those 24 hours, protein turnover was determined by means of the [<sup>15</sup>N]-glycine end-product technique (36). After the collection of basal urine samples and right before the dark phase, the animals were gently force-feed 7 mg/kg body weight of a [<sup>15</sup>N]-glycine solution. <sup>15</sup>N-urea and <sup>15</sup>N-amonia enrichments were measured in the 24-hr urine pools, as previously described (14). Protein turnover was calculated according to a single-pool model. Nitrogen flux (Q) was calculates as Q = d/e where d is the dose given and e is the cumulated excretion of <sup>15</sup>N end-products in urine. Synthesis and catabolism rates were then calculated from the following equation Q = S + E = C + I, where S is the synthesis rate of protein, E is excretion of nitrogen (urine plus feces), C is the catabolism rate, and I is dietary nitrogen intake.

#### Metabolite assays

Concentrations of normetanephrine and metanephrine were determined by high performance liquid chromatography with electrochemical detection (9) on the 24-hour urine samples.

#### **Data analysis and Statistics**

Throughout the analysis, the sample size of analyzed data varied to a small extent due to limitations imposed by the 24hr urine volume collected or to the difficulty encountered in collecting spot urine or blood samples, especially after calorie restriction. The exact sample sizes for each variable are indicated on the figures. Except body mass, all data were normally distributed and parametric tests were used. During the *ad-libitum* period, differences between LD and SD groups were assessed using a Student *t* test. In each animal group, Student paired *t* test compared the *ad-libitum* and food-restricted levels for each parameter studied. To determine differences between food-restricted animal groups, an analysis of variance was used and Fisher's protected least significant difference (PLSD) tests were performed. A generalized linear (GLZ) model, with gamma error distribution and log-link function, was used to analyze effects of photoperiod and calorie restriction intensity (40 vs. 80%) on the

time courses of body mass, along the 35 days of food deprivation. Then, each time course of body mass was analyzed with a Friedman's analysis of variance. TEE and REE were adjusted for differences in the active metabolic mass by analysis of covariance using FFM as covariate. All reported values are means  $\pm$  SE, and p < 0.05 was considered significant. All statistic analyses were performed by Jump (V5.1.1, NC, USA), except for the GLZ model that was realized with Statistica (V7.1.515.0, Statsoft, France).

## RESULTS

## Body mass and composition

Under *ad-libitum* condition, LD and SD mouse lemurs displayed significant different body mass levels of  $79 \pm 2$  and  $118 \pm 3$  g, respectively (t = -7.47, p < 0.001; Figure 1A). During food restriction, an overall decrease in body mass was found (F = 161.4, df = 22, n = 23, p < 0.001). Mouse lemurs under 40% CR (LD40 and SD40) and those under 80% CR (LD80 and SD80) had significantly reduced body mass after food restriction (LD40:  $\aleph^2 = 228.0$ , p < 0.001; LD80:  $\aleph^2 = 64.1$ , p < 0.001; SD40:  $\aleph^2 = 102.1$ , p < 0.001; SD80:  $\aleph^2 = 347.2$ , p < 0.001) at a respective average rate of -0.3 ± 0.1 and -0.9 ± 0.1 g.day<sup>-1</sup>, values that significantly differed from each other (p < 0.001).

During the *ad-libitum* period, FFM of LD and SD mouse lemurs did not differ from each other  $(73 \pm 2 \text{ vs. } 76 \pm 1 \text{ g}, t = -1.0, p = 0.34;$  **Figure 1B**). Conversely, FM was higher in SD than in LD animals  $(7 \pm 2 \text{ vs. } 42 \pm 3 \text{ g}, t = -11.5, p < 0.001;$  **Figure 1C**). During the calorie restriction period, SD40 mouse lemurs did not reduce their FFM, but significantly decreased their FM level by 21%. As a result, FFM and FM levels represented 69 and 31% of body mass after CR, respectively. Conversely, SD80 and LD40 food-restricted animals displayed a significant 13% and 12% decrease in FFM levels, respectively, reaching values of  $68 \pm 2$  and  $64 \pm 3$  g. LD40 group had only a 31% decrease in FM that did not reach significance (p = 0.11), whereas SD80 mouse lemurs reduced by 47% FM.



<u>Figure 1</u>: Body mass time courses (A) and, changes in fat-free mass (B) and fat mass (C) during 5 weeks of food deprivation. The statistics, mentioned on the right side of the graph, show overall effects of photoperiod (P) and calorie restriction (CRi) on the body mass time courses during a 35-day food deprivation (time) in long-days (LD) and short-days (SD) mouse lemurs under 40% (LD40 and SD40, respectively) and 80% food restriction (LD80 and SD80, respectively). Please, note that LD80 animals were excluded at day 22, before the end of the food-restricted trial. Values are expressed as means  $\pm$  SE. # LD vs. SD groups under ad-libitum. \*\*p < 0.01.

#### Water turnover

Under *ad-libitum* condition, no differences in water turnover rate were found between LD and SD mouse lemurs (t = 0.5, p = 0.64, **Figure 2**). LD40 and SD40 food-restricted mouse lemurs significantly reduced their rH<sub>2</sub>O levels by 37% and 32%, respectively. There was a 2-fold larger (63%) decrease in rH<sub>2</sub>O (p < 0.01) with the SD80 group.

## Total and resting energy expenditures

LD and SD mouse lemurs did not show any differences in FFM-adjusted TEE (TEE<sub>FFM</sub>), under an *ad-libitum* diet ( $80.1 \pm 6.2 vs. 75.8 \pm 4.2 \text{ kJ.day}^{-1}$ , p = 0.58,  $n_{LD} = 7$ ,  $n_{SD} = 17$ ). With food deprivation, all mouse lemurs decreased their TEE by 25, 21 and 47% in LD40, SD40 and SD80 groups, respectively (**Figure 3A**). For the LD40 the reduction in TEE could be accounted for the reduction in FFM, as TEE<sub>FFM</sub> after calorie restriction was no longer different from baseline (p = 0.32). Conversely TEE<sub>FFM</sub> from SD40 and SD80 animals remained significantly lower after food deprivation by 13 and 40%, respectively.

During the *ad-libitum* period, FFM-adjusted REE did not differ between photoperiods  $(0.033 \pm 0.02 \text{ vs.} 0.034 \pm 0.01 \text{ kJ.min}^{-1}, \text{ p} = 0.51, \text{ n}_{\text{LD}} = 7, \text{ n}_{\text{SD}} = 17)$ . After adjustment for FFM, only the SD80 animals showed a significant (23%) reduction in REE after calorie restriction (Figure 3B).

#### Nitrogen balance and flux

Under *ad-libitum* condition, mass-specific nitrogen balance was positive around 200 mg/kg/d and did not differ between LD and SD mouse lemurs (Figure 4A). After food restriction, no changes were further noted in the LD40 and SD40 animals. Only in SD80 animals mass-specific nitrogen balance decreased by 800 mg/kg/d became strongly negative (p < 0.001). During the *ad-libitum* period, mass-specific nitrogen flux (Figure 4B) was significantly higher in LD than in SD mouse lemurs (2958 ± 206 *vs.* 1615 ± 145 mg.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>, t = 5.33, p < 0.001). After food restriction, only SD40 animals significantly reduced their mass-specific nitrogen flux by 30% on average.

## **Protein turnover**

Under *ad-libitum* condition, the rates of protein synthesis and breakdown significantly differed between photoperiods (**Figures 4C** and **4D**, respectively). In LD40 mouse lemurs, both protein synthesis and breakdown remained unaffected after the 35 days of CR. After severe calorie restriction the loss in body protein observed in winter-acclimated mouse lemurs

was essentially explained by a 130% increase in breakdown without significant changes in synthesis. Conversely, the rates of protein synthesis and catabolism were reduced in food-restricted SD40 mouse lemurs, by 35 and 39% respectively, although non-significant for protein catabolism (p = 0.08).



<u>Figure 2</u>: Water turnover changes induced by 5 weeks of food deprivation in long-days (LD) and short-days (SD) mouse lemurs under 40% calorie restriction (LD40 and SD40, respectively) and SD animals facing a severe 80% food restriction (SD80). Values are means  $\pm$  SE. \*\*p < 0.01 vs. ad-libitum value.



<u>Figure 3</u>: Changes in fat-free mass (FFM)-adjusted total (TEE, A) and resting energy expenditure (REE, B) in long-days (LD) and in short-days (SD) mouse lemurs under 40% food restriction (LD40 and SD40, respectively) and SD animals facing an 80% calorie restriction (SD80). Values are means  $\pm$  SE. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. ad-libitum value.



Protein and energy metabolism in mouse lemurs

<u>Figure 4</u>: Changes in mass-specific nitrogen balance (A), nitrogen flux (B), protein synthesis (C) and catabolism (D), normalized by body mass, in long-days (LD) mouse lemurs under a moderate 40% food deprivation (LD40) and in short-days (SD) animals under a 40% or an 80% calorie restriction (SD40 and SD80, respectively). Values are means  $\pm$  SE. # LD vs. SD groups under ad-libitum. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. ad-libitum value

#### Catecholamines

During the *ad-libitum* period, no difference was reported between LD and SD mouse lemurs in catecholamine levels (**Table 1**). After food deprivation there was a threefold increase in normetanephrine and metanephrine in the-SD80 animals.

	NMN	MN
	(g/mmol.creatinine <sup>-1</sup> )	(g/mmol.creatinine <sup>-1</sup> )
LD-AL	30.1 ± 7.0	$20.2 \pm 4.0$
LD40	38.2 ± 8.3	31.4 ± 6.3
SD-AL	$37.2 \pm 4.8$	22.6 ± 2.4
<b>SD40</b>	$40.5 \pm 8.6$	32.3 ± 8.9
<b>SD80</b>	88.2 ± 16.1*	57.7 ± 14.2*

Table 1: Catecholamine levels in long-days (LD) and short-days (SD) mouse lemurs under ad-libitum diet (LD-AL and SD-AL, respectively) and under a 40% calorie restriction (LD40 and SD40, respectively) or an 80% food deprivation (SD80). \*p < 0.05 vs. ad-libitum condition.

## DISCUSSION

Mouse lemurs spare protein during 'winter' but fat in 'summer' under moderate food shortage

Under a moderate food shortage, mouse lemurs in 'winter' spared lean body mass, unlike animals in summer who showed a reduction in fat-free mass. These results suggest that animals in the winter phenotype rely on fatty acids for energy during food restriction. This might be due to 1) the 6-fold larger amount of fat mass in mouse lemurs in winter compared to those in summer and 2) the seasonal metabolic shift in substrates-type oxidation under hibernating phenotype.

Prior to hibernation, much of the increase in body mass is due to an accumulation in stored lipid, and this endogenous lipid reserves constitutes the primary source of energy utilized during hibernation, which is a prolonged state of food restriction (22). It has also been reported in fasting Svalbard ptarmigans that the sparing of body protein is more efficient in fat than lean birds, indicating that the initial body fat of animals plays a major role in determining the proportion of fat mass/fat-free mass oxidized during fasting (16). This feature is all the more relevant under food deprivation since glycogen stores of the organism are

partly replenished after each daily allotment. Along the journey, glycogen stores are rapidly depleted and lipid reserves are gradually mobilized for fuelling energy demands of the remaining daytime. Under food restriction, the low fat mass level of mouse lemurs in summer would be rapidly depleted, and therefore fat-free mass would be progressively used to meet energy needs.

Bachman (1) reported that partially food-deprived Belding ground squirrels lost fatfree mass but not lipid mass during summer, indicating protein oxidation in lean animals. Conversely, the large fat reserves of wintering mouse lemurs would be exclusively used during a moderate food shortage, sparing protein mass. Such conservation of muscle mass would have adaptive values for the grey mouse lemur during the wintering period. Indeed, mouse lemurs in winter would need to maintain sufficient level of fat-free mass to keep muscle functionality in order to be competitive in beginning of the mating season.

## Energetic consequences of fat sparing in summer acclimated mouse lemurs

In mouse lemurs in summer under a moderate food restriction, the decrease in energy costs (total and resting energy expenditures) could be fully accounted for by the reduction in fat-free mass. Since the fat-free mass account for the major part of the energy consumption, this decrease constitutes the major mechanism, for mouse lemurs to reduce energy demands during a moderate food deprivation. Other species show similar responses. A recent study demonstrated that the Chilean mouse-opossum (Thylamus elegans) reduced maintenance costs mainly by reducing visceral mass, principally the digestive tract and liver (3). These organs are probably the most expensive ones to maintain in term of energy and protein metabolism (19, 34). Therefore, a reduction of fat-free mass, such as the size of energyconsuming organs, would contribute to maintain a stable energy balance during food scarcity in the grey mouse lemur. Faced with a moderate food shortage, mouse lemurs under summerlike long-days would respond to food deprivation like all typical mammals, by decreasing protein synthesis and elevating protein catabolism, resulting in net nitrogen loss (21, 35). In our study, although long-days mouse lemurs showed no changes in nitrogen balance after 35 days of food deprivation, these animals might have had an acute and severe negative nitrogen balance, during the early stage of the food deprivation. Therefore, the fact that summering mouse lemurs had attained nitrogen equilibrium, after a 35-days of food restriction was because they had already reached an adaptive low energy state.

In association with the reduction in metabolism triggered by the decrease in fat-free mass, water turnover was also reduced in mouse lemurs in summer facing a moderate food

#### Protein and energy metabolism in mouse lemurs

shortage. Our findings with the summering mouse lemurs are similar to findings with the Arabian Oryx. With the Oryx, the rate at which water is processed is directly linked to the metabolic rate. Oryxes decrease their field metabolic rate by 50% and their water influx rate by 60% from spring to summer, concomitantly with a reduction in body mass reduction (38). Moreover, the decrease in water turnover described in *M. murinus* in summer under a moderate food shortage could fully be accounted for by the reduced fat-free mass because the animals does not change their activity levels during food restriction (13). In the wild, this adaptive reduction in energetic costs would allow mouse lemurs to conserve a sufficient level of reserve for future physical activity to allow them to be competitive for the female access during the summer breeding season (26). Indeed, by remaining active when food availability is reduced in summer, mouse lemurs would ensure a high reproductive success during the mating period.

## Protein turnover changes in mouse lemurs in winter and also in summer

Under *ad-libitum* conditions, mouse lemurs in winter displayed a significantly reduced rate of protein turnover when compared to the summer state. A similar phenomenon is found with hibernating black bears. Protein synthesis and breakdown are both lower in wintering compared to summering black bears, indicating a lowered metabolism in animals in winter (17). This seasonal difference in protein metabolism may be due to changes in the activity of molecular regulators, which can differ in animals between seasons. Indeed in the golden ground squirrel there is a seasonal variation in a potent regulator of an elongation factor that promotes protein translation in the liver. Summer squirrels lack this inhibitor, which down-regulates initiation of translation and thus protein expression, in wintering animals during torpor (31).

Winter-like short-days mouse lemurs were able to maintain their fat-free mass during moderate food restriction. Sparing of fat-free mass would be likely to contribute to rewarming the body from the low body temperatures of the torpor state. Although rewarming involves the activation of brown adipose tissue, resulting in non-shivering thermogenesis (7, 12, 40), other processes, for example a high level of active metabolic mass from the shivering mechanism, are likely to contribute.

Mouse lemurs acclimated to summer maintain a high nitrogen flux and a balanced protein turnover even after 35 days of food restriction. This implies that the negative protein balance that contributed to the reduced fat-free mass observed in this group is an early and rapid episode.

#### Protein and energy metabolism in mouse lemurs

There are obvious advantages to such an adaptive response. The lower active metabolic mass reduces energy requirements and thus allows animals to downwardly adjust their energy balance to reflect the reduced body size while maintaining full ability to do physical activity. Doing so would allow for aggressive inter-male competitive behavior for female access and so would contribute to a high reproductive success rate, even during a moderate lowering of energy supply.

Conversely, in mouse lemurs in winter, the enhanced reduction in protein turnover would be likely to contribute to the decrease in total energy expenditure during the moderate food deprivation period. Maintenance of protein pools is the result of a balance between protein synthesis and degradation. In some tissues, protein synthesis and degradation account for as much as 20-40 and 4%, respectively, of oxygen consumption (24). It has been reported in a non-hibernating rodent that inhibition of protein synthesis may reduce metabolic demands (8). Hibernators also depress protein synthesis during torpor, slowing-down metabolic processes (11, 30). During hibernation the golden ground squirrel accumulates ubiquitylated proteins due to a decreased ability to degrade the tagged proteins (32). Another recent study (6) reported that activity of protein degradation pathways was reduced during torpor, through a down regulation of ubiquitylation-related transcripts. This lowered activity under torpid state may be advantageous by reducing the overall energetic costs associated with protein degradation. Taken together, all these data suggest global changes in protein turnover during torpor triggers an overall reduction in metabolism, and consequently energy conservation.

Conversely to winter animals under moderate food shortage, mouse lemurs facing a severe food deprivation showed a significant chronic negative balance and were unable to reduce their nitrogen flux because of a dramatic rise in their protein catabolism. This increase led to a reduction in fat-free mass and was similar to a food starvation response in term of protein utilization (33). Nevertheless, due to their high initial level of fat mass, wintering mouse lemurs were also able to oxidized fatty acids to meet their energy needs, under a severe food shortage, thereby limiting the rate of protein loss. This assumption is supported by the significant increase in normetanephrine, which reflects the overall activity of the sympathetic nervous system (SNS), found in this food-deprived animal group. During calorie restriction, activity of SNS is repressed in most tissues (41) except white adipose tissue (WAT), in which SNS activity is enhanced (20). Therefore, as fat mass is progressively reduced, the proportion of energy derived from protein gradually increased. This enhanced loss of protein toward a critical mass, such as that probably reached by summering mouse lemurs under severe food

shortage, leads to an increased emergency signal and triggers a high stress level in animals in winter, facing a severe 80% food deprivation. This later fasting-like state of an overall stress is supported by the high level of metanephrine, which constitute the hormonal signal of an emergency state, as reported in this animal's group.

## Conclusion

Under moderate food shortages, mouse lemurs use distinct efficient mechanisms of energy savings depending on the season. With the summer phenotype energy costs are reduced mainly through an early and rapid decrease of the active metabolic mass. This strategy allows a rapid re-equilibration of energy balance, and thus serves to maintain fitness at a lower body size. Conversely, wintering mouse lemurs under a moderate food deprivation conserve fat-free mass, through an overall reduction in the nitrogen flux in conjunction with a larger drop in protein catabolism as compared to synthesis. In addition to its adaptive role in shivering thermogenesis during torpor arousal, this muscle-sparing mechanism would have another adaptive value for *M. murinus*, namely maximizing-reproductive success during the mating season. Nevertheless, when faced to a severe food scarcity, wintering mouse lemurs reached a critical state of a high level of stress, leading them to destructively oxidize their protein mass. In summary, this fasting-like energy shortfall in the long term would affect the fitness and thus the survival of *Microcebus murinus*.

## ACKNOWLEGEMENTS

The authors thank Dr Cottet-Emard and Mrs. Vouillarmet and Cottet-Emard for performing the catecholamines assay.

#### GRANTS

S. Giroud is supported by an MNRT fellowship. This work was supported by ANR AlimH, the FRM and the GIS Longévité. This protocol received all ethic authorizations and was conducted under the authorization number 67-223 (CNRS).

## LITERATURE CITED

1. **Bachman GC**. Food restriction effects on the body composition of free-living ground squirrels, *Spermophilus beldingi*. *Physiol Zool* 67: 756-770, 1994.

2. Blanc S, Colman R, Kemnitz J, Weindruch R, Baum S, Ramsey J, and Schoeller D. Assessment of nutritional status in rhesus monkeys: comparison of dual-energy X-ray absorptiometry and stable isotope dilution. *J Med Primatol* 34: 130-138, 2005.

3. **Bozinovic F, Munoz JL, Naya DE, and Cruz-Neto AP**. Adjusting energy expenditures to energy supply: food availability regulates torpor use and organ size in the Chilean mouse-opossum *Thylamys elegans. J Comp Physiol B* 177: 393-400, 2007.

4. **Concon JM, and Soltess D**. Rapid micro Kjeldahl digestion of cereal grains and other biological materials. *Analyt Biochem* 53: 35-41, 1973.

5. **Coward W**. Calculation of pool sizes and flux rates. In: *The Doubly Labelled Water Method: Technical Recommendations for Use in Humans Report of an IDECG Expert Working Group* edited by Prentice AM. Vienna, Austria: AERA, 1990, p. 48–68.

6. Crawford FI, Hodgkinson CL, Ivanova E, Logunova LB, Evans GJ, Steinlechner S, and Loudon AS. Influence of torpor on cardiac expression of genes involved in the circadian clock and protein turnover in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Physiol Genomics* 31: 521-530, 2007.

7. **Dark J**. Annual lipid cycles in hibernators: Integration of physiology and behavior. *Annu Rev Nutr* 25: 20.21-20.29, 2005.

8. Evans MC, Diegelmann RF, Barbee RW, Tiba MH, Edwards E, Sreedhar S, and Ward KR. Protein synthesis inhibition as a potential strategy for metabolic down-regulation. *Resuscitation* 73: 296-303, 2007.

9. Filaire E, Legrand B, Bret K, Sagnol M, Cottet-Emard JM, and Pequignot JM. Psychobiologic responses to 4 days of increased training and recovery in cyclists. *Int J Sport Med* 23: 588-594, 2002.

10. **French AR**. Interdependency of stored food and changes in body temperature during hibernation of the eastern chipmunk, *Tamias striatus*. *J Mammal* 81: 979-985, 2000.

11. Frerichs KU, Smith CB, Brenner M, DeGracia DJ, Krause GS, Marrone L, Dever TE, and Hallenbeck JM. Suppression of protein synthesis in brain during hibernation involves inhibition of protein initiation and elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14511-14516, 1998.

12. Genin F, Nibbelink M, Galand M, Perret M, and Ambid L. Brown fat and nonshivering thermogenesis in the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R811-R818, 2003.

13. Giroud S, Blanc S, Aujard F, Bertrand F, Gilbert C, and Perret M. Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1958-R1967, 2008.

14. **Howell RR, Speas M, and Wyngaarden JB**. A quantitative study of recycling of isotope from glycine-1-C14, alpha-N15 into various subunits of the uric acid molecule in a normal subject. *J Clin Invest* 40: 2076-2082, 1961.

15. Karmann H, Mrosovsky N, Heitz A, and Le Maho Y. Protein sparing on very low calorie diets: ground squirrels succeed where obese people fail. *Int J Obes Relat Metab Disord* 18: 351-353, 1994.

16. Lindgard K, Stokkan KA, Le Maho Y, and Groscolas R. Protein utilization during starvation in fat and lean svalbard ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*). *J Comp Physiol B* 162: 607-613, 1992.

17. **Lohuis TD, Harlow HJ, and Beck TD**. Hibernating black bears (*Ursus americanus*) experience skeletal muscle protein balance during winter anorexia. *Comp Biochem Physiol B* 147: 20-28, 2007.

18. Lyman CP, Willis JS, Malan A, and Wang LCH. *Hibernation and torpor in mammals and birds*. New York: Academic Press. 1982.

19. **McBride BW, and Kelly JM**. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: a review. *J Anim Sci* 68: 2997-3010, 1990.

20. **Migliorini RH, Garofalo MA, and Kettelhut IC**. Increased sympathetic activity in rat white adipose tissue during prolonged fasting. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 272: R656-R661, 1997.

21. Mitch WE, and Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *New Engl J Med* 335: 1897-1905, 1996.

22. Mrosovsky N, and Faust IM. Cycles of body fat in hibernators. *Int J Obes* 9(1): 93-98, 1985.

23. **Racette SB, Schoeller DA, Luke AH, Shay K, Hnilicka J, and Kushner RF**. Relative dilution spaces of <sup>2</sup>H- and <sup>18</sup>O-labeled water in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 267: E585-E590, 1994.

24. **Rolfe DF, and Brown GC**. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77: 731-758, 1997.

25. **Ruf T, and Heldmaier G**. The impact of daily torpor on energy requirements in the djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Physiol Zool* 65: 994-1010, 1992.

26. **Schmid J.** Sex-specific differences in activity patterns and fattening in the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*) in Madagascar. *J Mammal* 80: 749-757, 1999.

27. Schoeller DA, Ravussin E, Schutz Y, Acheson KJ, Baertschi P, and Jequier E. Energy expenditure by doubly labeled water: validation in humans and proposed calculation. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 250: R823-R830, 1986.

28. **Speakman JR**. *Doubly Labelled Water: Theory and Practice*. London: Chapman and Hall. 1997.

29. **Speakman JR**. The cost of living: field metabolic rates of small mammals. *Adv Ecol Res* 30: 177-297, 2000.

30. Van Breukelen F, and Martin SL. Translational initiation is uncoupled from elongation at 18 degrees C during mammalian hibernation. *Am J physiol Integr Comp Physiol* 281: R1374-R1379, 2001.

31. Van Breukelen F, Sonenberg N, and Martin SL. Seasonal and state-dependent changes of eIF4E and 4E-BP1 during mammalian hibernation: implications for the control of translation during torpor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R349-R353, 2004.

32. Velickovska V, Lloyd BP, Qureshi S, and van Breukelen F. Proteolysis is depressed during torpor in hibernators at the level of the 20S core protease. *J Comp Physiol B* 175: 329-335, 2005.

33. Wang T, Hung CC, and Randall DJ. The comparative physiology of food deprivation: from feast to famine. *Annu Rev Physiol* 68: 223-251, 2006.

34. Wang Z, O'Connor TP, Heshka S, and Heymsfield SB. The reconstruction of Kleiber's law at the organ-tissue level. *J Nutr* 131: 2967-2970, 2001.

35. **Waterlow JC**. Protein turnover with special reference to man. *Quart J Exp Physiol* 69: 409-438, 1984.

36. Waterlow JC, Golden MH, and Garlick PJ. Protein turnover in man measured with <sup>15</sup>N: comparison of end products and dose regimes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 235: E165-E174, 1978.

37. Weir JB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol* 109: 1-9, 1949.

38. Williams JB, Ostrowski S, Bedin E, and Ismail K. Seasonal variation in energy expenditure, water flux and food consumption of Arabian oryx (*Oryx leucoryx*). *J Exp Biol* 204: 2301-2311, 2001.

39. Wong WW, Lee LS, and Klein PD. Deuterium and oxygen-18 measurements on microliter samples of urine, plasma, saliva, and human milk. *Am J Clin Nutr* 45: 905-913, 1987.

40. **Wunder BA, and Gettinger RD**. Effects of body mass and temperature acclimation on the nonshivering thermogenic response of small mammals. In: *Adaptations to the cold: Tenth Hibernation Symposium* edited by Geiser F, Hulbert AJ, Nicol SC. Armidale, Australia: University of New England Press, 1996, p. 131-139.

41. Young JB, and Landsberg L. Suppression of sympathetic nervous system during fasting. *Science* 196: 1473-1475, 1977.

# Gut Hormones in Relation to Body Mass and Torpor Pattern Changes During Food Restriction and Re-feeding in the Gray Mouse Lemur



Sylvain Giroud, Martine Perret, Yvon Le Maho, Iman Momken, Caroline Gilbert and Stéphane Blanc. *Journal of Comparative Physiology B Biochemical, Systemic and Environmental Physiology*, 2008. doi 10.1007/s00360-008-0294-4

## Résumé – Etude 3

#### Introduction

Depuis ces dernières années, un nombre croissant d'études reporte un rôle prépondérant des hormones gastro-intestinales dans la régulation de l'homéostasie énergétique chez diverses espèces animales. Ainsi, le peptide YY (PYY) diminue la dépense énergétique et contribue à l'utilisation lipidique, le glucagon-like peptide 1 (GLP-1) réduit la température corporelle, inhibe la prise alimentaire et diminue la dépense énergétique, et la ghréline provoque un gain de masse corporelle en augmentant la prise alimentaire et en réduisant l'oxydation des acides gras.

De façon intéressante, il a été démontré récemment chez la souris que l'administration périphérique de ghréline durant le jeûne, provoque un approfondissement des épisodes de torpeur et induit une anticipation dans le rythme d'activité locomotrice, après 30h de restriction alimentaire. Par conséquent, il apparaît fort probable que les hormones gastrointestinales jouent un rôle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique chez les espèces hétérothermes. En particulier, la non-utilisation de la torpeur chez les microcèbes sous phénotype d'été pourrait être compensé par l'implication de ces hormones dans la régulation de leur balance énergétique.

## Objectifs

Le but de cette étude est de déterminer les implications potentielles de ces hormones dans les changements de masse corporelle et d'organisation temporelle des torpeurs et de l'activité locomotrice, chez le Microcèbe.

#### Matériel et méthodes

Les taux plasmatiques d'hormones gastro-intestinales (ghréline, PYY, GLP-1, peptide P ou PP et glucose-dependant insulinotropic polypeptide ou GIP), et les changements de masse corporelle et d'organisation temporelle de la torpeur et de l'activité locomotrice, induits par 35 jours de restriction alimentaire incrémentée (40 et 80%), sont mesurés chez des microcèbes exposés en jours longs (JL, acclimatés à l'été) et en jours courts (JC, acclimatés à l'hiver).
#### Résultats

Seuls les microcèbes en JL et en JC exposés à une restriction calorique sévère de 80% affichent une perte pondérale continue, conduisant à une réduction de masse de 10 et 15%, respectivement. Dans tous les groupes d'animaux sous-alimentés, le taux de ghréline augmente en moyenne de 2,6 fois et reste élevé après la réalimentation, tandis que le niveau de PYY s'élève de 3,8 fois, seulement chez les animaux en JL soumis à une pénurie alimentaire sévère de 80%. Dans le groupe des microcèbes en JC, après réalimentation, la masse corporelle est positivement associée au taux de ghréline et négativement corrélée à celui du PYY, tandis qu'aucune relation n'est reportée chez les animaux en JL, après réalimentation. Le taux plasmatique de GLP-1 augmente de 2,9 fois seulement chez les microcèbes en JL, soumis à une restriction alimentaire, et est négativement associé à la température corporelle minimale. Aucune corrélation significative n'est mise en évidence chez les animaux restreints en calorie, en JC.

#### Discussion

Ces résultats suggèrent que la ghréline, le PYY et le GLP-1 pourraient êtres impliqués dans les mécanismes d'engraissement saisonnier et dans la modulation de l'expression des phases de torpeur, respectivement. De telles observations nécessitent clairement des investigations complémentaires, mais ouvrent des perspectives nouvelles de recherche portant sur la régulation des épisodes de torpeur.

Signalement bibliographique ajouté par le :

### UNIVERSITÉ DE STRASBOURG Service Commun de Documentation

Gut hormones in relation to body mass and torpor pattern changes during food restriction and re-feeding in the gray mouse lemur

Sylvain GIROUD, Martine PERRET, Yvon LE MAHO, Iman MOMKEN, Caroline GILBERT and Stéphane BLANC

Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 2009, vol. 179, n° 1, pages 99-111

#### Pages 119-131 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur : http://dx.doi.org/10.1007/s00360-008-0294-4

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services : <u>http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/</u>



## Dietary Palmitate and Linoleate Oxidations, Oxidative Stress and DNA Damage Differ According to Season in Mouse Lemurs Exposed to a Chronic Food Deprivation



Sylvain Giroud, Martine Perret, Caroline Gilbert, Fabienne Aujard, Alexandre Zahariev, Yvon Le Maho, Hugues Oudart, Stéphane Blanc and Iman Momken.

American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism, Soumis.

#### Résumé – Etude 4

#### Introduction

L'hétérotherme se trouve confronté à la réalisation d'un compromis coût/bénéfice, durant ses épisodes de torpeur. En effet, l'un des défis, pour survivre à basses températures, consiste à maintenir une fluidité suffisante des tissus et membranes, nécessaire au bon fonctionnement physiologique, en augmentant le degré d'insaturation, bien que fortement corrélé au stress oxydant des tissus et membranes de l'organisme. La difficulté, pour l'hétérotherme, réside dans l'établissement d'une balance entre 1) l'économie d'énergie réalisée à bas niveau métabolique et 2) le stress oxydatif lié à la proportion importante d'acides gras insaturés au sein des tissus et membranes de son organisme. L'absence d'une expression accrue des épisodes de torpeur, observée chez les microcèbes acclimatés à l'été, soumis à une restriction alimentaire modérée, pourrait être associée à une incapacité de faire face aux effets adverses au cours des phases de torpeur.

#### **Objectifs**

L'objectif de cette étude est de déterminer, chez le Microcèbe (*Microcebus murinus*), dans quelle mesure l'augmentation de l'expression de la torpeur, induite par une restriction alimentaire graduée, est modulée par le compromis entre l'épargne d'acides gras polyinsaturés par l'organisme et le stress oxydatif subséquent, qui est généré au cours de la torpeur journalière.

#### Matériel et méthodes

Les changements de la fréquence des torpeurs, de la dépense énergétique totale (DET), des oxydations du linoléate (acide gras poly-insaturé) et du palmitate (acide gras saturé) ainsi que des taux de hexanoyl-lysine (HEL), un produit de la peroxydation du linoléate, et du 8-hydroxydéoxyguanosine (80HdG), un marqueur des dommages sur l'ADN, sont mesurés sur des microcèbes. Les animaux sont exposés en jours longs (JL, acclimatés à l'été) et en jours courts (JC, acclimatés à l'hiver), et soumis à 35 jours d'une restriction de 40% (JL40 et JC40) et de 80% (JL80 et JC80) de leurs besoins énergétiques.

#### Résultats

Au cours du régime alimentaire, tous les groupes de microcèbes ont réduit leur masse corporelle et les animaux en JL80 ont atteint un niveau pondéral risquant d'affecter leur survie au 22<sup>e</sup> jour. Ils ont en conséquence été exclus du protocole et replacés sous régime *ad-libitum*. Uniquement les microcèbes en JC augmentent leur fréquence de torpeur au cours du régime hypo calorique et réduisent leur DET ajustée pour la masse maigre. À la suite de la restriction alimentaire, les animaux en JC40 modifient la proportion de l'oxydation des acides gras d'origine alimentaire, en faveur du palmitate, épargnant le linoléate. Un tel changement n'est pas observé chez les microcèbes en JL et au cours d'une réduction sévère des besoins énergétiques, durant laquelle l'oxydation des deux acides gras alimentaires est augmentée. De façon concomitante, le taux de HEL corrèle positivement avec l'oxydation du linoléate, confirmant *in vivo* la relation substrat/produit démontrée *in vitro*, et négativement avec la DET ajustée pour la masse maigre, suggérant la génération de stress oxydatif plus élevé au cours de l'augmentation de l'expression des torpeurs.

#### Discussion

Ces résultats suggèrent un compromis coût/bénéfice entre la maximisation de la propension de l'expression des torpeurs et la minimisation du stress oxydatif, associé à la conservation, au niveau de l'organisme, des acides gras poly-insaturés d'origine alimentaire, au cours de l'expression du phénotype hivernal. À l'inverse, le non recourt aux épisodes de torpeur, observé chez les animaux sous phénotype d'été, se traduirait par une minimisation du niveau de stress oxydant.

#### ABSTRACT

This study investigated in the grey mouse lemur the extent to which the increase in torpor expression, due to graded food restriction, is modulated by a trade off between a whole body sparing of polyunsaturated dietary fatty acids and the related oxidative stress generated during daily torpor. We measured changes in torpor frequency, total energy expenditure (TEE), linoleate (polyunsaturated fatty acid) and palmitate (saturated fatty acid) oxidation and, hexanoyl-lysine (HEL), the product of linoleate peroxidation, and 8hydroxydeoxyguanosine (8OHdG), a marker of DNA damage. Animals under summeracclimated long days (LD) or winter-acclimated short days (SD) were exposed to a 40% (LD40 and SD40) and 80% (LD80 and SD80) 35-day calorie restriction (CR). During CR, all groups reduced their body mass but LD80 animals reached survival-threatened levels at day 22 and were then excluded from the CR trial. Only SD mouse lemurs increased their torpor frequency with CR and displayed a decrease in their TEE adjusted for fat-free mass. After CR, SD40 mouse lemurs shifted the dietary fatty acid oxidation towards palmitate and spared linoleate. Such shift was not observed in LD animals and during severe CR, during which oxidation of both dietary fatty acids was increased. Concomitantly, HEL increased in both LD40 and SD80 groups, whereas DNA damage was only seen in SD80 food-restricted animals. HEL correlated positively with linoleate oxidation confirming in vivo the substrate/product relationship demonstrated in vitro, and negatively with TEE adjusted for fat-free mass suggesting higher oxidative stress associated with increased torpor expression. This suggests a cost-benefit trade-off between maximizing torpor propensity and minimizing oxidative stress that is associated with a shift towards sparing of dietary polyunsaturated fatty acids that is dependent upon expression of a winter phenotype.

**KEYWORDS:** oxidative stress, polyunsaturated fatty acid, energy savings, *Microcebus murinus* 

#### **INTRODUCTION**

To cope with an unfavorable environment, heterothermic mammals increase energy and water savings by extending their ability to display bouts of reduced body temperature (Tb) and metabolic rate (25), i.e. torpor or hibernation. This state of lowered Tb requires biochemical adjustments to ensure that physiological functions can be maintained at low temperatures (2). In ectotherms that are also able to tolerate low Tb, an important adaptation for low thermal tolerance appears to be a high proportion of unsaturated fatty acids in cell membranes, because of their low melting point. In heterotherms, the role of unsaturated fatty acids for thermal tolerance is less clear-cut than in ectotherms (29, 37) but they appear to play an important role in the maintenance of cell membrane function and white adipose tissue fluidity at varying tissue temperatures.

The importance of polyunsaturated fatty acids (PUFA) for mammalian heterotherms is highlighted by their positive effects on hibernation and daily torpor. Increased PUFA content in the diet enhances the propensity of animals to enter torpor and, at least in several studies, lowers minimal Tb tolerated, increases torpor bout duration and energy savings, as reported in hibernating marmots, ground squirrels and chipmunks (18, 20, 28, 29, 59). This PUFAinduced increase in torpor propensity was associated with a rise of PUFA content in lipid membranes (17, 26). In a study by Geiser (26), deer mice under saturated and unsaturated diet showed significant differences in the total unsaturated fatty acid content of depot fat (55.7 vs. 81.1%, respectively) and leg muscle (56.4 vs. 72.1%, respectively). In the echnida, fatty acid composition of fat pads during the pre-hibernation season was almost identical to that of the most abundant prey species, which including 60% of a monounsaturated lipid, the oleic acid (17). Interestingly, such a differential distribution of lipids was also observed independently of dietary selection (30, 49). Indeed, modifications of torpor patterns (frequency and depth) triggered by a shift in photoperiodic regimen occur in concomitance with changes in total lipid composition of muscle tissue (30). This suggests that if dietary selection plays a role in the unsaturation processes of the cell membranes and adipose tissue, a season-dependent differential partitioning of dietary fatty acids between oxidative and synthetic pathways is likely to occur in seasonal heterothermic mammals. Echidnas, ground squirrels and yellowbellied marmots were indeed reported to rely on monounsaturated fatty acids (MUFA) and saturated fatty acids (SFA) as fuel for hibernation in order to spare PUFA (17, 19, 23). Therefore, it is likely that tissue unsaturation, when on a constant diet, is associated with differential changes in PUFA and SFA oxidations. A study conducted by Paulsrud and Dryer

(45) on bat brown adipose tissue demonstrated that the *in vitro* rate of palmitic acids is higher than that of oleic acids, when homogenates were incubated at temperatures below 20°C. Nevertheless, there are no direct *in vivo* measures of dietary fatty acid oxidation, varying according to their biochemical structures, in seasonal heterothemic species, so far.

An undisputed adverse effect of high PUFA content is, however, their high susceptibility to peroxidation by radical oxygen species, which are massively generated during the mitochondrial respiration burst of the arousal phase from torpor (11, 60). Lipid peroxidation leads to deleterious products such as reactive aldehydes that cause damages to membranes as well as enzymes, and alters DNA and protein functions (for an overview, see (38)). Frank and Storey (23) demonstrated that when the contents of dietary linoleic acid (a PUFA highly susceptible to peroxidation), are either below or above natural levels, hibernation ability in golden-mantled ground squirrels is greatly reduced. In the mean time, the activities of anti-oxidant enzymes increased in brown adipose tissue whereas trends for increases were observed in other tissues in the high linoleic diet, suggesting a higher oxidative stress response. Therefore, it has been argued that optimal levels of PUFA intake and fat depots in hibernators result from a trade off between their beneficial effects on membrane function and white adipose tissue fluidity at low Tb during torpor bouts, and the oxidative stress-related cellular damage (21, 23). The relationship between the seasonal use of different dietary fatty acids and the oxidative stress in relation to torpor optimization has however not been thoroughly studied.

The grey mouse lemur (*Microcebus murinus*) is a good model to investigate such trade-offs as the factors regulating its heterothermia are well-characterized and reproducible in captivity (1, 31, 47, 48, 57). This small primate uses daily torpor and shows marked seasonal rhythms (1, 32, 46). Under short-days (SD < 12h of daylight), mouse lemurs enter a resting state, fatten and increase their torpor depth and duration. Conversely, long-days (LD > 12h of daylight) trigger an increase in behavioral activities, a reduction of body mass and a low expression of daily torpor. This season-dependent plasticity in torpor use was further demonstrated through food restriction paradigms (31, 34).

Therefore, we hypothesize that the aforementioned cost-benefit trade-off between torpor optimization, differential lipid oxidative metabolism and oxidative stress is dependent on season. As such, seasonal optimization is likely to occur only during moderate food deprivation in mouse lemurs in winter phenotype. To test this hypothesis, we determined the extent to which 1) the oxidative metabolism of dietary palmitate (saturated) and linoleate (polyunsaturated) fatty acids varies seasonally when the torpor expression is extended by graded calorie restriction (CR) and 2) how it relates to oxidative stress, through the measurement hexanoyl-lysine (HEL), the product of linoleate peroxidation, and 8-hydroxydeoxyguanosine (80HdG), a marker of DNA damage (16, 36).

#### **MATERIAL AND METHODS**

#### Animals

The 34 adult male grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*, Cheirogaleidae, Primates) used in this study were born in the laboratory breeding-colony of Brunoy (UMR7179 CNRS/MNHN, France; European Institutions Agreement # 962773) from a stock originally caught along the southwestern coast of Madagascar, 40 years ago. Seasonal Malagasy rhythms were reproduced by alternating 6-month periods of long-days (light:dark 14:10) and short-days (light:dark 10:14). Mouse lemurs were transferred in our laboratory at Strasbourg (UMR7178 CNRS/ULP, France) and housed individually in cages (70 x 68 x 52 cm), visually separated from each other, in order to minimize social influences. The relative humidity in animal rooms was maintained constant (55%), LD and SD mouse lemurs were kept at ambient room temperatures of 25°C, under long-days and short-days exposures.

#### **Energy intake and calorie restriction**

After a month of acclimatization to their new housing, individual calorie intake was measured during a 10-day period, in order to calculate subsequent food-restricted energy allotments. Animals were fed, in *ad-libitum* conditions, on fresh banana and a standardized homemade mixture containing baby cereals, spice bread, egg, concentrated milk, white cheese, vitamins and dietary minerals (Vitapaulia/MR, Intervet, France and Toison d'orR, Clément Thékan, France). Since grey mouse lemurs, and particularly those under winter phenotype, tend to overfeed when isolated and thus gain mass during the *ad-libitum* period, energy intake was clamped to the level required to stabilize their body masses. Such procedure was required to avoid a significant underestimation of the CR intensities. Each individual was initially fed *ad-libitum* with banana and the homemade mixture and progressively, daily energy intake was narrowed according to the body mass time-course (34).

During CR, LD and SD mouse lemurs were then provided either with 60% (=40% CR) or 20% (=80% CR) of these individually derived energy requirements. Food-restricted allotments were available every day at the very onset of the dark phase and water was always

provided *ad-libitum*. Daily food intake was calculated from the difference between provided and remaining food masses and was corrected for dehydration. Energy equivalents of 3.7 kJ/g for the banana and 4.6 kJ/g for the mixture allowed us to convert grams of food intake to kJ. Throughout the food restriction period, mouse lemurs under 40% CR received an energy allotment of  $47.5 \pm 1.3$  kJ/day (for LD animals, named LD40) and  $45.8 \pm 3.3$  kJ/day (for SD animals, designated SD40). The 80% food-restricted animals were provided with an energy allotment of  $16.5 \pm 2.5$  kJ/day (for LD animals, named LD80) and  $15.5 \pm 0.6$  kJ/day (for SD animals, designated SD80). All LD80 mouse lemurs reached, on the *day 22*, a body mass of  $52 \pm 1$  g (*vs.*  $78 \pm 2$  g under *ad-libitum* diet), which we defined as survival-threatening body mass level, based on the lowest value (50g) reported in the colony of Brunoy for this photoperiod (48). Therefore, these animals were excluded from the study before the end of the food-deprivation trial and returned to the colony on an *ad-libitum* diet. Neither urine sample nor energetic measurements were therefore performed in the CR period for this group and no data can be reported.

#### **Protocol overview**

Each animal was studied during the *ad-libitum* period and after 35 days of CR. The tests were identical in both conditions and consisted in the measurement of total energy expenditure (TEE) and fat-free mass (FFM) by the doubly labeled water (DLW) method, 24-hr palmitate and linoleate oxidation by using stable and radio-isotope labeling and HEL and 80HdG concentrations in 24-hr pooled urine. Torpor frequency was measured by telemetry using implanted Tb recorders (characteristics detailed below) in a different group of animals submitted to the same protocol. This protocol was conducted under the authorization number 67-223.

#### Total energy expenditure and fat-free mass

TEE was determined during a 2-day period by the multipoint DLW methodology (56). Urine sample was collected by providing gentle pressure on the bladder. Premixed 2 g/(kg estimated total body water, TBW) dose of DLW was then intra-peritoneally injected to the animals. The dose was composed of 0.55 g/(kg estimated TBW) 97%  $H_2^{18}O$  (Rotem Industries Ltd., Israel) and 0.15 g/(kg estimated TBW) 99.9%  $^{2}H_2O$  (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) and was diluted with 3% NaCl to physiological osmolarity. We assumed a percentage of hydration of 0.60 and 0.55 for LD and SD animals, respectively, to narrow the doses. The doses were calculated to ensure an *in vivo* enrichment

of about 250 and 1200 ‰ for 18-oxygen and deuterium, respectively [‰ (delta per mil) =  $(R_{sample} / R_{standard} - 1) * 1000$  with R being the ratio heavy to light isotope]. Isotopic equilibration in body water was determined through a blood sample collected at 1-h post-dose from quick sampling in the saphenous vein. Immediately after collection, blood-containing capillaries were rapidly flame-sealed. Mouse lemurs were then released inside their own cage and urine samples were taken 24 and 48 h after the equilibration time, in cryogenically stable tubes. Blood and urine samples were respectively stored at 5°C and -20°C until analyses by isotope ratio mass spectrometry.

Water from serum and urine samples was extracted by cryo-distilation, as previously described (66). 0.1µL of water was reduced to hydrogen and carbon monoxide by reduction on a glassy carbon reactor held at 1400°C in an elemental analyzer (Flash HT; ThermoFisher Germany). Hydrogen and carbon monoxide gases were separated by a GC column held at 104°C coupled to a continuous flow-Delta-V isotope ratio mass spectrometer. Isotopic abundances of deuterium and 18-oxygen in hydrogen and carbon monoxide gazes were measured in quintuplicate and repeated if standard deviation exceeded 2 and 0.5 ‰, respectively. All enrichments were expressed against International Atomic Energy Agency standards.

 $CO_2$  production was calculated according to the single pool equation of Speakman (58):

 $rCO_2 = (N / 2.078) \cdot (k_o - k_d) - 0.0062 \cdot k_d \cdot N$ , where N represents the average isotope dilution space of oxygen-18 calculated from Coward (13) by the plateau method using the 1-hour post-dose sample.  $k_o$  and  $k_d$  represent the isotope constant elimination rates calculated by linear regression of the natural logarithm of isotope enrichment as a function of elapsed time from day 1 samples. TEE was calculated by the Weir's equation (64) using a food quotient of 0.823 estimated from the animal's diet. Total body water (TBW) was measured from the dilution space of 18-oxygen after correction for exchange by the factor 1.007 (50). FFM was calculated from TBW by assuming hydration coefficient of 73.2% that is not affected by chronic CR (4).

#### Dietary palmitate and linoleate oxidations

The dietary fat oxidation tests were all performed five days after the DLW test to avoid deuterium isotopic interferences in the TEE and FFM calculations by DLW. After the collection of basal urine samples and right before the dark phase, the homemade diet mixture, including 40mg/kg body weight d<sub>31</sub>-palmitate (Cambridge Isotope Laboratories, Andover,

MA, USA) and 1.40µCu /kg body weight [9,10,12,13-<sup>3</sup>H] linoleate (American Radiolabeled Chemicals, Inc St Louis USA), was orally administrated. The dose of deuterated palmitate was twice the dose given in humans to ensure an in vivo enrichment well above the enriched baseline due to the prior DLW dose. In the ad-libitum animal, the enrichment 24hr post dose was on average 80‰ above an average baseline of on average 200‰. This represents a highly significant signal-to-noise ratio given our analytical precision of 0.5% and our precision of 2‰. Those fatty acids represent the main saturated ( $\sim$ 20%) and polyunsaturated ( $\sim$ 20%) fatty acids of the diet. The oxidation of palmitate and linoleate was measured as the recovery of deuterium and tritium, respectively, in TBW sampled through spot urine voids collected 24hr after dosing. The technique of deuterium labeling for the measurement of dietary fatty acid oxidation was validated in humans at rest and during exercise (51, 63). Several dietary oxidation studies have since been published using both radio-active or stable hydrogen labeling (3, 53, 61, 62). Voids were stored at -20°C in cryogenically stable tubes until analysis. For deuterium, urine samples were cryo-distilled as previously described (66). The extracted water was then reduced to hydrogen gas by the zinc reduction method as previously described (33). Deuterium enrichments in hydrogen gas were then measured on a dual-inlet isotope ratio mass spectrometer (Optima, Fisons, UK) in duplicate and analyses were repeated if the standard deviation exceeded 3  $\infty$ . Recovery of  $[d_{31}]$  palmitate was calculated as the cumulated recovery of <sup>2</sup>H in TBW using the formula:

% dose recovery = [TBW • 2 •  $\Delta\delta_{2H}$  • R<sub>STD</sub> / 1000] / [D • P • n/(MW • 100)] • 100 where  $\delta_{2H}$  represents delta per mil = (R<sub>sample</sub> / R<sub>standard</sub> - 1) \* 1000 with R being the ratio <sup>2</sup>H/<sup>1</sup>H,  $\Delta$  represents  $\delta_{2H}$  values corrected for each individual's baseline, R<sub>STD</sub> represents <sup>2</sup>H/<sup>1</sup>H of the standard H<sub>2</sub>, P represents purity ([d<sub>31</sub>]palmitate, 98%), n represents the number of labeled atoms per molecule (i.e. 31), MW is the molecular weight (i.e. 287 g/mol), TBW represents the total body water in moles, derived from the DLW data, and D the dose ingested (in grams). We correct for the loss of label over the 24-hr period due to water turnover. To do so  $\Delta\delta_{2H}$  values were corrected using the formula, as previously done (3)

 $\Delta \delta_{2H}$  at time t (corrected) =  $\Delta \delta_{2H}$  at time t (uncorrected) • (1-exp(-k<sub>D</sub> •  $\Delta t / 60*24)$ ) where  $\Delta t$  represents the time between two samples and k<sub>D</sub> the deuterium daily turnover rate derived individually from the DLW study performed.

Recovery of  $[9,10,12,13-{}^{3}H]$  linoleate was also calculated as the cumulated recovery of  ${}^{3}H$  in TBW. 200µL of urine samples and 20µL of every labeled meals was diluted into 3mL of liquid scintillation counting (Ultima Gold XR, PerkinElmer, Boston, MA, USA) and

counted in triplicate in a scintillation counter (Wallac 1409 DPM model, Turku, Finland). We tested that quenching did not affect the measures. The formula used was:

% dose recovery =  ${}^{3}H$  TBW /  ${}^{3}H$  in meals • 100

Where <sup>3</sup>H TBW is calculated by the product of TBW (g) by the measured <sup>3</sup>Hdpm/mL urine and <sup>3</sup>H in meals represents the product of the meal amount (g) by the measured <sup>3</sup>Hdpm/mL meal. <sup>3</sup>H TBW was correction for water loss over the 24hr post dose period previously above described for  $d_{31}$  palmitate.

#### Metabolite assays

Mouse lemurs were individually placed in metabolic cages for 48hr, during which the last cumulative 24hr urine samples were collected on ice and stored at -20°C until analysis. Urine concentrations of HEL and 80HdG were determined in duplicate by ELISA kits, (JaICA, Nikken Seil Corp, Japan). Levels of HEL and 80HdG were normalized by urinary creatinine measured by the classical Jaffe method.

#### Body temperature recording and torpor frequency

A telemetric transmitter (TA10TA-F20, 3.2 g, Data Science Co., Minnesota, USA) was implanted into the abdominal cavity, under general anesthesia (pre-anesthesia: Valium 10 mg, 2 mg/100g IM; anesthesia; Ketamine Imalgene 500 mg, 10 mg/100g IM) as routinely done in the laboratory (57). Animals were included in the experimental protocol one month after surgery. The receiver board (RPC-1, Data Science Co., Minesota, USA) positioned in front of the nest-box, collected the radio frequency signals. Tb was recorded for 10 s every 5 min. Data were analyzed by the software Dataquest (LabPro Data Science Co., Minesota, USA). After the study, transmitters were removed by surgery and animals returned to their groups.

Telemetry data provided in this study were obtained from other groups of mouse lemurs ( $n_{LD40} = 6$ ,  $n_{LD80} = 4$ ,  $n_{SD40} = 5$ ,  $n_{SD80} = 6$ ) than those used to determine changes in lipid-type oxidation, metabolite levels and resting metabolic rate. This group of animals was under the same laboratory conditions. In our study, torpor bout was considered when Tb dropped below 33°C and torpor frequency, which corresponds to the number of torpor bouts per week, for each animal group was then calculated along the 5 weeks of food restriction.

#### **Data analysis and Statistics**

Throughout the analysis, the sample size of analyzed data varied to a small extent due to limitations imposed by the 24hr urine volume collected or to the difficulty encountered to collect spot urine or blood samples, especially after calorie restriction. In LD40, LD80, SD40 and SD80 animal groups, the sample sizes for each variable are indicated in the legends of each figure. All data were normally distributed and parametric tests were used, excepted for torpor frequency, which showed a poisson distribution. During *ad-libitum* period, differences between LD and SD groups were assessed using a Student t test. In each animal group, Student paired t test compared the *ad-libitum* and food-restricted levels for each parameter studied. To determine differences between food-restricted animal groups, an analysis of variance was used and Fisher's protected least significant difference (PLSD) tests were performed. A generalized linear model, with a poisson error distribution and a log-link function, analyzed effects of photoperiod (LD vs. SD) and calorie restriction (40% vs. 80%) on the time-courses of torpor frequencies during the 5 weeks of food restriction. Bonferroni tests were used to compare weeks of food restriction with ad-libitum condition. A Mann-Whitney U-test compared difference in torpor frequency between LD and SD mouse lemurs under ad-libitum condition. Finally, Pearson's correlation analyses were performed between hexanoyl-lysine and, TEE, FFM-adjusted TEE and linoleate oxidation, in mouse lemurs.

All reported values are means  $\pm$  SE, and p < 0.05 was considered significant. Statistic analyses for parametric and non-parametric tests were performed by Statistica (V7.1.515.0, Statsoft France), and the generalized linear model was realized with SPSS (V16.0.2, Illinois, USA).

#### RESULTS

#### **Body mass (Figure 1)**

During the control period, SD mouse lemurs showed a 31% higher average body mass value compared to LD animals ( $79 \pm 2 vs. 118 \pm 3 g$ , t = -10.0, n<sub>LD</sub> = 10, n<sub>SD</sub> = 17, p < 0.001). All animal groups significantly reduced their body mass after 35 days of food deprivation, compared to baseline values. This corresponds to a body mass loss of 15%, 33%, 8% and 23% for LD40, LD80, SD40 and SD80 mouse lemurs, respectively, at the end of the 35-day food restriction.

#### **Dietary lipid oxidation**

*Palmitate (Figure 2A).* During the control period, palmitate oxidation rates of  $18.2 \pm 3.4$  and  $14.7 \pm 2.3$  % of recovery in LD and SD groups, respectively, did not differ (t = 0.9,  $n_{LD} = 11$ ,  $n_{SD} = 18$ , p = 0.39). After a 35-day food restriction, SD mouse lemurs significantly increased their palmitate oxidation. LD40 animals also increased palmitate oxidation by 52% but this increase was associated with only a statistical trend (p = 0.09). An overall difference in palmitate oxidation, after food restriction, was reported between animal groups (F = 4.2,  $n_{LD40} = 8$ ,  $n_{SD40} = 7$ ,  $n_{SD80} = 8$ , p < 0.05) and post-hoc analysis revealed that palmitate oxidation rates of SD40 and SD80 mouse lemurs differed from each other ( $20.8 \pm 3.6$  vs.  $33.2 \pm 3.2$  % of recovery, p < 0.05).

*Linoleate (Figure 2B)*. Under *ad-libitum* condition, LD and SD mouse lemurs showed similar values of linoleate oxidation rate of  $38.9 \pm 3.0$  and  $39.6 \pm 2.7$  % of recovery, respectively (t = -0.16, n<sub>LD</sub> = 10, n<sub>SD</sub> = 18, p = 0.87). After food restriction, only SD40 animals did not change the rate of linoleate oxidation compared to baseline value (p = 0.86). Conversely, both LD40 and SD80 mouse lemurs increased by respectively 47% and 92% their linoleate oxidation rate after food deprivation, compared to control values.



<u>Figure 1</u>: Body mass changes in summer-like long-days and winter-like short-days mouse lemurs facing a 40% (LD40 and SD40, respectively) and 80% food deprivation (LD80 and SD80, respectively) of 35 days. Values are means  $\pm$  SE. # p < 0.05 vs. LD group ad-libitum. \*p < 0.05 \*\*p < 0.01 vs. control.



<u>Figure 2</u>: 35-day food restriction-induced changes in palmitate (A) and linoleate (B) oxidations in summer-like long-days (LD) and winter-like short-days (SD) mouse lemurs. LD40 corresponds to LD mouse lemurs facing a moderate 40% energy restriction. Palmitate and linoleate levels (a) of SD mouse lemurs under a moderate 40% (SD40) food restriction

#### **Oxidative stress**

*Hexanoyl-lysine (Figure 3A)*. Mouse lemurs under summer and winter phenotypes displayed similar levels of HEL, during the control period  $(4.4 \pm 0.3 \text{ vs.} 4.6 \pm 0.4 \text{ nmol/mmol.creatinine}, t = -0.2, n_{\text{LD}} = 11, n_{\text{SD}} = 17, p = 0.82)$ . After 35 days of food restriction, HEL levels increased in both LD40 and SD80 mouse lemurs by 48% and 160%, respectively, compared to baseline values. Conversely, food-restricted SD40 animals did not show significant increase in HEL level, compared to control values (p = 0.44).

*8-hydroxydeoxyguanosine (Figure 3B)*. During the control period, 8OHdG level was similar in LD and SD mouse lemurs  $(2.9 \pm 0.4 \text{ vs. } 2.9 \pm 0.4 \text{ nmol/mmol.creatinine}, t = 0.1, n_{\text{LD}} = 11, n_{\text{SD}} = 17, p = 0.93)$ . After food restriction, only SD80 animals showed a 3-fold increase in 8OHdG level, compared to control values, whereas both LD40 and SD40 groups did not show significant changes in 8OHdG level.

#### Total energy expenditure

Mouse lemurs under summer and winter phenotypes did not show different values of TEE ( $82.1 \pm 6.3 vs. 81.3 \pm 4.8 \text{ kJ.day}^{-1}$ , t = 0.1,  $n_{LD} = 7$ ,  $n_{SD} = 17$ , p = 0.93; Figure 4A). Along food restriction, all animal groups reduced their TEE by 25%, 21% and 47% in LD40, SD40 and SD80, respectively. However, these decreases in TEE were mainly explained by

reductions of fat-free mass (FFM), particularly in LD40 and SD80 mouse lemurs. Under *ad-libitum* condition, SD mouse lemurs showed a lower, although non significant, FFM-adjusted TEE of  $75.8 \pm 4.2$  kJ.day<sup>-1</sup>, compared to LD animals, which displayed value of  $80.1 \pm 6.2$  kJ.day<sup>-1</sup> (t = 0.57, n<sub>LD</sub> = 7, n<sub>SD</sub> = 17, p = 0.58; Figure 4B). After food-restriction, only SD40 and SD80 mouse lemurs reduced their FFM-adjusted TEE by 13% and 39%, respectively. An overall difference in FFM-adjusted TEE was reported between food-restricted groups (F = 9.5, n<sub>LD</sub> = 7, n<sub>SD40</sub> = 8, n<sub>SD80</sub> = 8, p < 0.01) and post-hoc analysis revealed that SD80 mouse lemurs showed lower FFM-adjusted TEE values compared to LD40 and SD40 animals, after food deprivation (SD80 *vs.* LD40:  $43.0 \pm 3.8$  *vs.*  $61.2 \pm 3.8$  kJ.day<sup>-1</sup>, p < 0.01; SD80 *vs.* SD40:  $43.0 \pm 3.8$  *vs.*  $63.9 \pm 2.3$  kJ.day<sup>-1</sup>, p < 0.05).

We observed a significant negative correlation between TEE and HEL level  $(R^2 = 0.26, p < 0.001;$  Figure 5A). As changes in FFM, the active metabolic mass, account for TEE variations, it was interesting to note that the relation between HEL and FFM-adjusted TEE remains significant ( $R^2 = 0.14$ , p < 0.05; Figure 5B). A significant positive correlation between linoleate oxidation and HEL level was also reported ( $R^2 = 0.30$ , p < 0.001; Figure 6).



<u>Figure 3</u>: Changes in Hexanoyl-Lysine (HEL, A) and 8-hydroxydeoxyguanosine (80HdG, B) levels, after a 35-day food deprivation, in mouse lemurs under summer-like long-days (LD) and winter-like short-days (SD). LD40 corresponds to LD mouse lemurs under moderate 40% energy restriction. HEL level (a) of SD mouse lemurs under a moderate 40% food restriction (SD40) and that (b) of SD animals facing a severe 80% food restriction (SD80) significantly differed from each other. Values are means  $\pm$  SE. \*p < 0.05 \*\*p < 0.01 vs. control.



<u>Figure 4</u>: Changes in Total Energy Expenditure (TEE, A) and Fat-Free Mass (FFM)adjusted TEE (B), after 35 days of food restriction, in summer-like long-days (LD) and winter-like short-days (SD) mouse lemurs. FFM-adjusted TEE levels (a) of LD and SD mouse lemurs under a moderate food restriction (LD40 and SD40, respectively) differ from that (b) of SD mouse lemurs under a severe 80% food deprivation (SD80). Values are means  $\pm$  SE. \*p < 0.05 \*\*p < 0.01 vs. control.



<u>Figure 5</u>: Correlations between Hexanoyl-Lysine (HEL) and, Total Energy Expenditure (TEE, A) and Fat-Free Mass (FFM)-adjusted TEE (B). Correlative data includes values of summerlike long-days (LDAL) and winter-like short-days (SDAL) mouse lemurs under ad-libitum and food-restricted condition. LD40, SD40, SD80: LD and SD mouse lemurs under a moderate 40% or 80% energy restriction, respectively.



<u>Figure 6</u>: Correlation between Hexanoyl-Lysine (HEL) and linoleate oxidation, which includes ad-libitum and food-restricted values of summer-like long-days (LD) and winter-like short-days (SD) mouse lemurs. LDAL and SDAL: respectively, LD and SD mouse lemurs under ad-libitum condition. LD40, SD40, SD80: LD and SD mouse lemurs under a moderate 40% or 80% energy restriction, respectively.

#### **Torpor frequencies (Figure 7)**

LD and SD mouse lemurs did not displayed significant different torpor frequency, during the control period  $(0.0 \pm 0.0 \ vs. \ 1.3 \pm 0.7, \ U = 24, \ n_{LD} = 6, \ n_{SD} = 11, \ p = 0.4)$ . However, a differential effect of the 5 weeks of food deprivation, according to photoperiod, can be observed (W = 2508.4, df = 5,  $n_{LD40} = 6$ ,  $n_{SD40} = 5$ ,  $n_{SD80} = 6$ , p < 0.001). Post-hoc tests revealed that torpor frequency increased only in SD food-deprived mouse lemurs compared to control value and reached significance from the second week of food restriction (SD40:  $5.8 \pm 0.7 \ vs. \ 1.4 \pm 0.8$ , p < 0.001; SD80:  $6.5 \pm 0.2 \ vs. \ 1.2 \pm 1.1$ , p < 0.001).



<u>Figure 7:</u> Changes in torpor frequency along 5 weeks of food deprivation. LD40 corresponds to summer-like long-days mouse lemurs facing a moderate 40% energy restriction. SD40 and SD80 correspond to winter-like short-days animals under moderate 40% and severe 80% food restriction, respectively. A generalized linear model was used to determine the differential time course of torpor frequency during the 5 weeks of food deprivation between the 3 groups of mouse lemurs. In each group, Bonferroni tests were conducted to compare weeks of food restriction with control value. Values are means  $\pm$  SE. \*\*p < 0.01

#### DISCUSSION

Our study investigated the extent to which the increase in torpor expression in the grey mouse lemur during graded food restriction is associated with a trade-off between a whole body sparing of polyunsaturated dietary fatty acids and the related oxidative stress generated upon daily torpor. Our results support the existence of such trade-off on a diet with a fixed macronutrient composition that is dependent on both the season and the intensity of energy restriction. Differential use of lipid-type occurs only in mouse lemurs in winter under moderate food shortage

A shift in dietary fat oxidation emerges after moderate food restriction in mouse lemurs expressing the winter phenotype. An increased reliance upon dietary saturated palmitate for oxidation together with a full sparing of dietary polyunsaturated linoleate was observed in winter-acclimated animals subjected to moderate food shortage. This was concomitant with a 7-fold increase in torpor frequency. Although the same magnitude of torpor expression was observed during severe calorie restriction, the shift in dietary fatty acid oxidation did not pertain; both dietary fatty acid oxidations were increased, and contributed equally to the fuel mix being oxidized. The same results were noted in the summer-acclimated animals but torpor frequency was unaffected by the moderate calorie restriction. The differential fatty acid oxidation may reflect changes in lipid stores that were previously reported when heterothermic animals are placed on a cafeteria diet (22). It has been recently reported in deer mice (30) that functional changes in torpor occurrence and length, induced by photoperiod or season and linked to changes in the composition of somatic fatty acids, can be observed independently of dietary selection. In particular, unsaturated fatty acids (including PUFA – melting point in the range of -1 to -15°C) increased in the short photoperiod group in comparison with the equinox and long photoperiod groups. Conversely, saturated fatty acids  $(SFA - melting point of +70^{\circ}C)$  during long photoperiod were two-times more abundant than under short photoperiod. Therefore, these differences in lipid tissue composition reflected the differential lipid-type utilization between animals under long and short photoperiods that we observed in the present study. In addition, since  $\omega 3$  and  $\omega 6$  PUFA (such as linolenic and linoleic acid, respectively) are not naturally synthesized by mammals and are therefore required in daily diet, storage and catabolism of these fatty acids might be particularly important in heterotherms. In support of our results, a study on yellow-bellied marmots throughout the hibernation season, showed a tendency for a preferential metabolization of SFA as compared to essential fatty acids of the  $\omega 6$  series, such as linoleate (18:2  $\omega 6$ ) (19). Recently, it was hypothesized that the ratio of  $\omega 6$  to  $\omega 3$  PUFA, rather than total membrane PUFA content, appears to play a crucial role for heterotherms to survive at low Tb. This appears especially true for the heart functioning (52). The high  $\omega 6$  to  $\omega 3$  PUFA ratios, by their positive effect for cardiac function, allow hibernators and daily heterotherms to decrease minimal Tb, increase torpor bout duration, and maximize energy savings. Therefore, this beneficial role, during torpor or hibernation bouts, of  $\omega 6$  fatty acid series, to which linoleate

#### Dietary lipid oxidations in mouse lemurs

belongs, would be one possible explanation for the linoleate sparing in the organism, as suggested by our results on differential lipid-type oxidation in wintering mouse lemurs. Clearly, further studies are needed to test this hypothesis. Similarly, further experiments will be necessary to characterize the mechanisms, by which such a shift in dietary fat use is achieved. Several enzymes are known to have different affinities for fatty acids, varying in chain length and saturation degrees, but their *in vivo* activity as well as their seasonal modulation is unknown. Among the potential protagonists, we can cite the steroyl-CoA desaturase 1 (SCD1), the carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1), the diacyl glycerol acyltransferase (DGAT) and the more recently characterized mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), which is co-localized with CPT1 in the outer mitochondria membrane, and showed inversed affinity towards saturated and unsaturated activated fatty acids (24, 40). Our results and published data from the literature suggest that during moderate calorie restriction, mouse lemurs displaying a winter phenotype showed an increased torpor frequency that coincide with a selective reliance on saturated dietary fat for oxidation and a sparing of polyunsaturated fatty acids.

#### Increased oxidative stress in mouse lemurs that do not express a shift in dietary fat oxidation

Our results further suggest an association between the type of fatty acids oxidized and the degree of oxidative damages. The early stage of oxidative damage was measured through the urinary excretion of hexanoyl-lysine (HEL). Oxidative stress produced hydrogen peroxide that interacts with free linoleate to produce linoleate hydroperoxide. This compound was shown to react covalently with lysine residues to form HEL, which was suggested to be a good marker for the early stage of oxidative modification by oxidized  $\omega$ 6 fatty acids (39). In support of that, we observed a good relationship between linoleate oxidation and the 24-hr urine excretion of HEL.

During extreme torpor episodes,  $O_2$  consumption can fall to 2% of basal levels but then surges to 300% of torpid levels upon arousal (6). The early work of Boveris and Chance (5) suggested that 1–2% of all oxygen-consumed escapes from mitochondria as hydrogen peroxide, thus demonstrating a link between oxidative metabolism and free radical production. The impact of a large increase in oxidative metabolism due to torpor arousal on stress production in this heterothermic species is highlighted by the negative relationship that we observed between total energy expenditure (TEE) and HEL. TEE can be divided into the basal metabolic rate, the diet-induced thermogenesis, the cost of physical activities and thermoregulation, which includes the energy fluctuations associated with torpor and arousal. Importantly, the relationship remained significant after adjustment for difference in the active metabolic mass, suggesting that HEL production is related to torpor bouts. This observation is strengthened by the results of a previous study showing that physical activity did not change to a large extent under the same experimental conditions (34). Many small mammals, including Cheirogaleidae (27, 42, 43, 54), use passive rewarming through the increase in the environmental temperature to limit the metabolic cost of arousal. Undoubtedly, such a mechanism would limit the generation of oxidative stress during the rewarming phase. Nevertheless, the use of passive arousal in *M. murinus* only concerns a part of the rewarming process (from minimal Tb to ~28°C) and the following increase to reach normothermic values remains under active thermogenic control (54, 55).

Interestingly, HEL did not change in mouse lemurs expressing the shift in dietary fat oxidation, i.e. in animals fully expressing a winter phenotype and subjected to a moderate calorie restriction. Conversely, HEL urine excretion was increased in winter and summeracclimated animals under severe and moderate calorie restriction, respectively, i.e. in animals in which no linoleate sparing was observed. Interestingly, DNA damages that can be seen as ultimate oxidative damages increased only during long-term extreme calorie restriction. These results suggest synergistic mechanisms in winter-acclimated mouse lemurs between the linoleate oxidative metabolism, oxidative stress and torpor optimization.

## Exceeded seasonal anti-oxidant defenses in mouse lemurs in winter under severe food shortage and in animals in summer

It has been well described in the literature that heterotherms developed endogenous defense mechanisms, which make them tolerant to oxidative stress during their torpor or hibernation bouts (for review, see (10)). In arctic and thirteen-lined ground squirrels, plasma ascorbate may function as an antioxidant during the hibernation season since its plasma levels increase three-to-fivefold in both species during torpor and return to euthermic levels upon arousal (15, 60). Conversely, tissue ascorbate levels increase significantly during arousal in liver and spleen, which may reflect a redistribution of plasma ascorbate pools to counteract the increased ROS production generated by the rapid increase in mitochondrial activity during torpor arousal (60). The activities of several antioxidant enzymes are also increased in brown adipose tissue (BAT) in hibernating European ground squirrels. BAT, which undergoes dramatic increases in mitochondrial activity and blood flow during arousal, displays higher activities of superoxide dismutase, ascorbate and glutathione peroxidase during hibernation (8, 9). As oxidative stress results from a balance between anti-oxidant and oxidative

molecules generated by the energy metabolism, other mechanisms do exist to reduce oxidative stress. Clearly we cannot determine from the present study if it is the mechanisms of defenses against radical oxygen species (ROS) that are increased or if it is their productions that are decreased in summer-adapted animals. Our results nevertheless suggest that the seasonal modulations of dietary fat use are closely associated with oxidative stress.

Interestingly, summer-like long-days exposed mouse lemurs increased oxidation rates of both dietary fatty acids and excretion of HEL. This suggests that summer phenotype mouse lemurs are more susceptible to lipid peroxidation than winter-acclimated animals. Seasonal differences in antioxidant defense system have been reported in several studies (7, 9, 65). In the brain of European ground squirrels, the highest activity of antioxidant defense enzymes (superoxide dismutase and catalase) was found in the spring and was much lower in summer. Moreover, the highest levels of low-molecular-weight antioxidant (ascorbic acid and glutathione) were recorded in winter in comparison with spring and summer (7). Whether or not the incapacity to increase torpor episodes in summer-acclimated mouse lemurs is a consequence of low oxidative defense capacities cannot be answered. Interestingly, over consumption of diet rich in polyunsaturated fatty acids reduces hibernating expression as many times reported in captive golden-mantled ground squirrels (20, 21, 23) and very recently in free-ranging arctic ground squirrels (22). Rather than a low anti-oxydant ability, an alternative explanation would reside in the high level of reproductive and thermogenic hormones during the mating season (summer) and their inhibiting effect on thermoregulation and torpor (14, 41, 44). Steroid hormones, particularly testosterone, have indeed been shown to inhibit hibernation in rodents (35). Furthermore, it has been suggested in rodents that the increase in testosterone, before reproduction period in spring, may result in termination of the hibernation season (14).

#### Conclusion

Taken together the results of the present study suggest in the mouse lemur a seasonal optimization of the strategies of energy economy, in which torpor optimization converges with a sparing of polyunsaturated fatty acid, likely to increase membrane and white adipose tissue fluidity at low Tb, but in the absence of oxidative stress damages. Whether or not the limited capacity of summer-adapted animals to increase torpor in response to calorie restriction is aimed at preventing the consequences of oxidative damages due to incapacity to shift the profile of dietary fat use cannot be answered, but the literature above reported suggest this hypothesis might explain part of the results. Overall the results are consistent

with the hypothesis of a cost-benefit trade-off between maximizing torpor propensity and minimizing oxidative stress, at least, in mouse lemurs facing a moderate food shortage in winter.

#### Perspective and significance

The seasonal fattening and torpor expression patterns expressed by the mouse lemurs represents a unique strategy of energy economy for a tropical primate to face the contrasted climate of Madagascar that opposes six months of dry winter with few resources and six months of summer. In the context of global changes, different scenarios predict that the Madagascar's biodiversity 'hotspot' will face an increased occurrence of unpredicted episodes of food shortage throughout the year (12). From a conservation point of view, it is critical non-only to study the strategies of energy economy used by endemic species but also the limits of plasticity of these strategies. This study demonstrates a relationship between torpor extension, dietary fat use and oxidative damages that seems essentially limited to the winter phenotype and moderate food shortages. Except for severe food restriction studies, on which no adaptation was clearly expected after 35 days of treatment, further studies are needed to determine the extent to which survival and fitness will be affected in this endangered species.

#### ACKNOWLEGEMENTS AND GRANTS

S. Giroud is supported by an MNRT fellowship. This work was supported by ANR AlimH, the FRM and the GIS Longévité.

#### LITERATURE CITED

1. Aujard F, Perret M, and Vannier G. Thermoregulatory responses to variations of photoperiod and ambient temperature in the male lesser mouse lemur: a primitive or an advanced adaptive character? *J Comp Physiol B* 168: 540-548, 1998.

2. Azzam NA, Hallenbeck JM, and Kachar B. Membrane changes during hibernation. *Nature* 407: 317-318, 2000.

3. Bergouignan A, Trudel G, Simon C, Chopard A, Schoeller DA, Momken I, Votruba SB, Desage M, Burdge GC, Gauquelin-Koch G, Normand S, and Blanc S. Physical Inactivity Differentially Alters Dietary Oleate and Palmitate Trafficking. *Diabetes*, 2008.

4. Blanc S, Colman R, Kemnitz J, Weindruch R, Baum S, Ramsey J, and Schoeller D. Assessment of nutritional status in rhesus monkeys: comparison of dual-energy X-ray absorptiometry and stable isotope dilution. *J Med Primatol* 34: 130-138, 2005.

5. **Boveris A and Chance B.** The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707-716, 1973.

6. **Boyer BB and Barnes BM.** Molecular and metabolic aspects of mammalian hibernation. *BioScience* 49: 713-724, 1999.

7. **Buzadzic B, Blagojevic D, Korac B, Saicic ZS, Spasic MB, and Petrovic VM.** Seasonal variation in the antioxidant defense system of the brain of the ground squirrel (*Citellus citellus*) and response to low temperature compared with rat. *Comp Biochem Physiol* C 117: 141-149, 1997.

8. **Buzadzic B, Spasic M, Saicic ZS, Radojicic R, Petrovic VM, and Halliwell B.** Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 2. The effect of hibernation. *Free Radic Biol Med* 9: 407-413, 1990.

9. **Buzadzic B, Spasic MB, Saicic ZS, Radojicic R, and Petrovic VM.** Seasonal dependence of the activity of antioxidant defence enzymes in the ground squirrel (*Citellus citellus*): the effect of cold. *Comp Biochem Physiol B* 101: 547-551, 1992.

10. Carey HV, Andrews MT, and Martin SL. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev* 83: 1153-1181, 2003.

11. Carey HV, Frank CL, and Seifert JP. Hibernation induces oxidative stress and activation of NK-kappaB in ground squirrel intestine. *J Comp Physiol B* 170: 551-559, 2000.

12. **Cazelles B and Hales S.** Infectious diseases, climate influences, and nonstationarity. *PLoS Med* 3: e328, 2006.

13. Coward WA, Roberts SB, Prentice AM, and Lucas A. The  ${}^{2}\text{H}_{2}{}^{18}\text{O}$  method for energy expenditure measurements - clinical possibilities, necessary assumptions and limitations. *Clin Nutr Metabol Res Proc 7th congr ESPEN, Munich*: 169-177, 1986.

14. **Darrow JM, Duncan MJ, Bartke A, Bona-Gallo A, and Goldman BD.** Influence of photoperiod and gonadal steroids on hibernation in the European hamster. *J Comp Physiol* 163: 339-348, 1988.

15. **Drew KL, Toien O, Rivera PM, Smith MA, Perry G, and Rice ME.** Role of the antioxidant ascorbate in hibernation and warming from hibernation. *Comp Biochem Physiol C* 133: 483-492, 2002.

16. Esterbauer H, Schaur RJ, and Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81-128, 1991.

17. **Falkenstein F, Kortner G, Watson K, and Geiser F.** Dietary fats and body lipid composition in relation to hibernation in free-ranging echidnas. *J Comp Physiol B* 171: 189-194, 2001.

18. Florant GL, Hester L, Ameenuddin S, and Rintoul DA. The effect of a low essential fatty acid diet on hibernation in marmots. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 264: R747-R753, 1993.

19. Florant GL, Nuttle LC, Mullinex DE, and Rintoul DA. Plasma and white adipose tissue lipid composition in marmots. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 258: R1123-R1131, 1990.

20. **Frank CL.** The influence of dietary fatty acids on hibernation by Golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Physiol Zool* 65: 906-920, 1992.

21. Frank CL, Dierenfeld ES, and Storey KB. The relationship between lipid peroxidation, hibernation, and food selection in mammals. *Amer Zool* 38: 341-349, 1998.

22. Frank CL, Karpovich S, and Barnes BM. Dietary fatty acid composition and the hibernation patterns in free-ranging arctic ground squirrels. *Physiol Biochem Zool* 81: 486-495, 2008.

23. Frank CL and Storey KB. The optimal depot fat composition for hibernation by golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *J Comp Physiol B* 164: 536-542, 1995.

24. Gavino GR and Gavino VC. Rat liver outer mitochondrial carnitine palmitoyltransferase activity towards long-chain polyunsaturated fatty acids and their CoA esters. *Lipids* 26: 266-270, 1991.

25. **Geiser F.** Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol* 66: 239-274, 2004.

26. **Geiser F.** The effect of unsaturated and saturated dietary lipids on the pattern of daily torpor and the fatty acid composition of tissues and membranes of the deer mouse *Peromyscus maniculatus. J Comp Physiol B* 161: 590-597, 1991.

27. Geiser F and Drury RL. Radiant heat affects thermoregulation and energy expenditure during rewarming from torpor. *J Comp Physiol B* 173: 55-60, 2003.

28. Geiser F and Kenagy GJ. Dietary fats and torpor patterns in hibernating ground squirrels. *Can J Zool* 71: 1182-1186, 1993.

29. **Geiser F and Kenagy GJ.** Polyunsaturated lipid diet lengthens torpor and reduces body temperature in a hibernator. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 252: R897-R901, 1987.

30. Geiser F, McAllan BM, Kenagy GJ, and Hiebert SM. Photoperiod affects daily torpor and tissue fatty acid composition in deer mice. *Die Naturwissenschaften* 94: 319-325, 2007.

31. Genin F and Perret M. Daily hypothermia in captive grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*): effects of photoperiod and food restriction. *Comp Biochem Physiol B* 136: 71-81, 2003.

32. Genin F and Perret M. Photoperiod-induced changes in energy balance in gray mouse lemurs. *Physiol Behav* 71: 315-321, 2000.

33. Gilbert C, Blanc S, Giroud S, Trabalon M, Le Maho Y, Perret M, and A. A. Role of huddling on the energetic of growth in a newborn altricial mammal. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R867-R876, 2007.

34. Giroud S, Blanc S, Aujard F, Bertrand F, Gilbert C, and Perret M. Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1958-R1967, 2008.

35. Goldman BD, Darrow JM, Duncan MJ, and Yogev L. Photoperiod, reproductive hormones, and winter torpor in three hamster species. In: *Living in the Cold: Physiological and Biochemical Adaptations, edited by Heller CH, Musacchia XJ and Wang LCH. New York, Elsevier*, 1986, p.341-350.

36. **Greenberg MM.** In vitro and in vivo effects of oxidative damage to deoxyguanosine. *Biochem Soc Transac* 32: 46-50, 2004.

37. **Hulbert AJ.** Membrane adaptations in ectotherms and endotherms. In: *Life in the cold: ecological, physiological and molecular mechanisms, edited by Carey C, Florant BA, Wunder BA, Horwitz B. Westview, Boulder,* 1993, *p.417-428.* 

38. **Hulbert AJ.** On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol* 234: 277-288, 2005.

39. Januszewski AS, Alderson NL, Jenkins AJ, Thorpe SR, and Baynes JW. Chemical modification of proteins during peroxidation of phospholipids. *J Lipid Res* 46: 1440-1449, 2005.

40. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, and Muoio DM. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metabol* 7: 45-56, 2008.

41. **Mzilikazi N and Lovegrove BG.** Reproductive activity influences thermoregulation and torpor in pouched mice, *Saccostomus campestris. J Comp Physiol B* 172: 7-16, 2002.

42. **Mzilikazi N, Lovegrove BG, and Ribble DO.** Exogenous passive heating during torpor arousal in free-ranging rock elephant shrews, *Elephantulus myurus*. *Oecologia* 133: 307-314, 2002.

43. Ortmann S, Schmid J, Ganzhorn JU, and Heldmaier G. Body temperature and torpor in a Malagasy small primate, the mouse lemur. In: *Adaptations to the Cold: Tenth Hibernation Symposium*, edited by Geiser F, Hulbert AJ, Nicol SC. Armidale, Australia: University of New England Press, 1996, p. 55-61.

44. **Ouarour A, Kirsch R, and Pevet P.** Effects of temperature, steroids and castration on daily torpor in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Comp Physiol* 168: 477-481, 1991.

45. **Paulsrud JR and Dryer RL.** Circum-annual changes in triglyceride fatty acids of bat brown adipose tissue. *Lipids* 3: 340-345, 1968.

46. **Perret M.** Environmental and social determinants of sexual function in the male lesser mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Int J Primatol* 59: 1-25, 1992.

47. **Perret M and Aujard F.** Daily hypothermia and torpor in a tropical primate: synchronization by 24-h light-dark cycle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1925-R1933, 2001.

48. **Perret M, Aujard F, and Vannier G.** Critical role of daylength in energy balance in a non human primate. *Biological Clocks: Mechanisms and Applications Proceedings of the International Congress on Chronobiology, Paris, France, 7-11 September 1997*: 415-418, 1998.

49. **Pulawa LK and Florant GL.** The effects of caloric restriction on the body composition and hibernation of the golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*). *Physiol Biochem Zool* 73: 538-546, 2000.

50. **Racette SB, Schoeller DA, Luke AH, Shay K, Hnilicka J, and Kushner RF.** Relative dilution spaces of <sup>2</sup>H- and <sup>18</sup>O-labeled water in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 267: E585-E590, 1994.

51. **Raman A, Blanc S, Adams A, and Schoeller DA.** Validation of deuterium-labeled fatty acids for the measurement of dietary fat oxidation during physical activity. *J Lipid Res* 45: 2339-2344, 2004.

52. **Ruf T and Arnold W.** Effects of polyunsaturated fatty acids on hibernation and torpor: a review and hypothesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1044-R1052, 2008.

53. Santosa S, Hensrud DD, Votruba SB, and Jensen MD. The influence of sex and obesity phenotype on meal fatty acid metabolism before and after weight loss. *Am J Clin Nutr* 88: 1134-1141, 2008.

54. Schmid J. Oxygen consumption and torpor in mouse lemurs (*Microcebus murinus* and *M. myoxinus*): Preliminary results of a study in western Madagascar. In: *Adaptations to the Cold: Tenth Hibernation Symposium, edited by Geiser F, Hulbert AJ, Nicol SC. Armidale, Australia: University of New England Press.* 1996, p.47-54.

55. Schmid J. Torpor in the tropics: the case of the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Bas Appl Ecol* 1: 133-139, 2000.

56. Schoeller DA, Ravussin E, Schutz Y, Acheson KJ, Baertschi P, and Jequier E. Energy expenditure by doubly labeled water: validation in humans and proposed calculation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 250: R823-R830, 1986.

57. Seguy M and Perret M. Factors affecting the daily rhythm of body temperature of captive mouse lemurs (*Microcebus murinus*). *J Comp Physiol B* 175: 107-115, 2005.

58. **Speakman JR.** *Doubly Labeled Water: Theory and Practice*. London: Chapman and Hall. 1997.

59. Thorp CR, Ram PK, and Florant GL. Diet alters metabolic rate in the Yello-bellied marmot (*Marmota flaviventris*) during hibernation. *Physiol Zool* 67: 1213-1229, 1994.

60. Toien O, Drew KL, Chao ML, and Rice ME. Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R572-R583, 2001.

61. Votruba SB, Atkinson RL, and Schoeller DA. Prior exercise increases dietary oleate, but not palmitate oxidation. *Obes Res* 11: 1509-1518, 2003.

62. Votruba SB, Mattison RS, Dumesic DA, Koutsari C, and Jensen MD. Meal fatty acid uptake in visceral fat in women. *Diabetes* 56: 2589-2597, 2007.

63. Votruba SB, Zeddun SM, and Schoeller DA. Validation of deuterium labeled fatty acids for the measurement of dietary fat oxidation: a method for measuring fat-oxidation in free-living subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1240-1245, 2001.

64. Weir JB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol* 109: 1-9, 1949.

65. Wilhelm Filho D, Tribess T, Gaspari C, Claudio FD, Torres AM, and Magalhaes ARM. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). Aquaculture 203: 149-158, 2001.

66. Wong WW, Lee LS, and Klein PD. Deuterium and oxygen-18 measurements on microliter samples of urine, plasma, saliva, and human milk. *Am J Clin Nutr* 45: 905-913, 1987.

Chapitre 5

# Conclusions et perspectives



#### 1. Rappel des principaux résultats

Face à une restriction alimentaire modérée, les microcèbes sous phénotype hivernal optimisent principalement l'expression de leurs épisodes de torpeur et préservent leur masse maigre, alors que les animaux acclimatés à l'été réduisent leur masse métaboliquement active (masse maigre), résultant en un rééquilibrage rapide de leur balance énergétique à des besoins inférieurs. À l'inverse, face à une restriction alimentaire sévère, les microcèbes, quelle que soit la saison, ne parviennent pas à enrayer la perte pondérale, accentuée par une augmentation drastique de l'activité locomotrice chez les animaux acclimatés à l'été, et ce malgré l'augmentation des phases de torpeur.

#### 2. <u>Réserves énergétiques durant les périodes de restriction alimentaire et de</u> <u>réalimentation subséquente</u>

En réponse à une pénurie alimentaire chronique, l'utilisation des substrats, et notamment ceux d'origine lipidique, diffère selon la photopériode (saison). Ainsi, les microcèbes acclimatés à l'hiver, contrairement aux animaux de phénotype estival, semblent oxyder préférentiellement les acides gras, épargnant les protéines. Ceci pourrait s'expliquer par l'existence 1) d'une proportion des réserves lipidiques de l'organisme largement plus élevée chez le Microcèbe en hiver que durant l'été, et 2) d'une utilisation préférentielle des substrats d'origine lipidique, durant la saison sèche. Ce caractère saisonnier des réserves énergétiques et/ou ce shift métabolique durant les épisodes de torpeur ont été très bien décrits chez de nombreuses espèces hétérothermes (98, 121, 128, 234), et notamment chez une espèce de primate tropical (Cheirogaleus medius). Ce primate malgache double quasiment sa masse corporelle, durant la période de pré hibernation, et retourne à un niveau pondéral inférieur au début de la saison de reproduction, suggérant une réduction de sa masse adipeuse au cours de l'hibernation (56, 57). Un tel cycle saisonnier pondéral associé à un shift métabolique dans l'oxydation des substrats a également été décrit chez des espèces de rongeurs hibernants. Ainsi, un cycle annuel de masse corporelle a été caractérisé chez le hamster djungarien (234). Cet animal entre spontanément en torpeur au cours de l'hiver,

épisode durant lequel survient un shift métabolique conduisant à l'oxydation préférentielle des lipides (98). De même, une étude portant sur l'écureuil terrestre (*Spermophilus lateralis*), durant la phase saisonnière de perte pondérale, révèle une épargne totale de la masse protéique de l'animal, suggérant une utilisation sélective de la masse grasse, à cette période (114). La marmotte alpine (*Marmota marmota*) montre également une variation saisonnière marquée de sa masse corporelle, en captivité, avec une masse pondérale maximale au mois d'octobre et minimale à la fin de la saison d'hibernation (121). En outre, cette réduction pondérale, au cours de la phase d'hibernation, correspond à l'utilisation quasi-exclusive des lipides (36, 121).

À l'inverse, durant la période de réalimentation (suivant la phase de restriction énergétique), les résultats obtenus chez le Microcèbe suggèrent une accélération des mécanismes de reconstitution des réserves adipeuses, en particulier chez les animaux de phénotype hivernal. En effet, la masse corporelle des microcèbes acclimatés à l'hiver est positivement corrélée au taux de ghréline plasmatique et inversement associée à la concentration plasmatique de PYY, alors qu'aucune corrélation n'apparaît significative chez les animaux de phénotype estival. Ces associations suggèrent l'existence de mécanismes favorisant la prise alimentaire et promouvant la reconstitution des réserves corporelles chez le Microcèbe au cours de l'hiver. Ce regain pondéral ou « catch-up growth » ne peut correspondre qu'à l'accroissement de la masse grasse des animaux, puisque les microcèbes en hiver n'ont pas perdu de masse maigre au cours de la restriction calorique modérée. Ce processus de reprise pondérale résulterait d'une accumulation accélérée de tissus adipeux (« catch-up fat »), s'effectuant à un taux disproportionné à la suite d'une perte de masse corporelle (46). Ainsi, la ghréline engendre un gain de masse corporelle, en réduisant l'utilisation des lipides et en augmentant la prise alimentaire (158), et le PYY, une hormone anorexigène diminue le quotient respiratoire, i.e. augmente l'oxydation des acides gras (1). D'autres hormones, qui régulent l'homéostasie énergétique, pourraient êtres impliquées dans ces mécanismes de contrôle de la masse corporelle, comme la leptine, hormone anorexigène sécrétée par le tissu adipeux blanc. Il a été démontré chez le campagnol (Microtus brandtii) que les taux de leptine plasmatique étaient corrélés positivement avec la masse adipeuse et négativement avec la prise alimentaire (261). De plus la sensibilité à la leptine semble modulée en fonction de la saison puisqu'il a été reporté, chez le hamster djungarien (Phodopus sungorus), une sensibilité plus faible à la leptine chez les hamsters en hiver, comparé aux animaux en été (120). De même, chez la chauve-souris (Myotis lucifigus), le métabolisme de repos diminue malgré une augmentation du taux plasmatique de leptine,

suggérant un état de résistance à la leptine, au cours de la phase de pré hibernation. Des modifications saisonnières de la sensibilité hormonale ont aussi été reportées pour la mélatonine, hormone sécrétée par la glande pinéale, sous l'action de l'hypothalamus et des variations de photopériode. Ainsi, les changements saisonniers de la masse corporelle, chez le hamster djungarien (Phodopus sungorus) résultent de l'action combinée de la saison et d'une modification de la sensibilité à la mélatonine et à la photopériode (234). Par conséquent, chez les microcèbes de phénotype hivernal l'implication des hormones (ghréline et PYY) dans les mécanismes de gain pondéral suggère un rôle potentiel de ces hormones dans le contrôle des phases saisonnières d'engraissement. En outre, les cycles saisonniers de masse corporelle, extrêmement marqués chez le Microcèbe, ont été largement documentés, notamment par des études menées en captivité (83, 84, 185). Lors du passage à une photopériode courte, la masse corporelle augmente linéairement, sans changement du métabolisme de repos, mais par une augmentation de la prise alimentaire spontanée (84). Dans la suite de l'exposition à des jours courts, le Microcèbe entre dans une phase d'anorexie et réduit drastiquement ses taux métaboliques (187). Lors du changement vers une photopériode longue (été), le Microcèbe réduit sa masse corporelle, ré-augmente sa prise alimentaire et élève fortement sa dépense énergétique totale et ceci, de manière concomitante à une augmentation des taux de cortisol, de thyroxine et de testostérone, hormones de régulation de la dépense énergétique (84, 182). Les auteurs de cette étude ont également suggéré que des hormones d'origine hypothalamique, gastro-intestinale ou adipocytaire (leptine) seraient impliquées dans la régulation de la masse corporelle chez le Microcèbe, notamment au cours des phases d'engraissement saisonnier.

Face à une restriction alimentaire, l'augmentation de l'utilisation des lipides se caractérise par une oxydation différentielle du type d'acides gras (saturé *vs.* insaturé), chez les microcèbes sous phénotype hivernal, contrairement aux animaux en été. En particulier, les animaux acclimatés à l'hiver oxydent uniquement le palmitate (C16:0), un acide gras saturé (AGS), épargnant le linoléate (C18:2  $\omega$ 6), un acide gras poly-insaturé (AGPI), lorsqu'ils sont soumis à une restriction alimentaire modérée. Au cours de la période d'inactivité et de jeûne caractérisant l'hibernation, une oxydation différentielle des lipides a également lieu, comme démontrée chez la marmotte. Ainsi, durant la saison d'hibernation (d'octobre à avril), le pourcentage des AGS diminue, alors que celui des AGPI, en particulier le linoléate, augmente (60). De plus, l'analyse de la composition des acides gras plasmatiques suggère que ces rongeurs tendent à métaboliser principalement les AGS, comme le palmitate, à partir des réserves adipeuses, au cours de l'hibernation, et au profit de l'épargne corporelle des AGPI.
Un mécanisme possible, expliquant cette rétention tissulaire des AGPI, comme le linoléate et le linolénate (C18:2  $\omega$ 6 et C18:3  $\omega$ 3, respectivement), réside dans l'affinité plus élevée de la monoacylglycérol acyltransférase (MGAT), une enzyme impliquée dans la biosynthèse lipidique, pour l'acylation des monoacylglycérol contenant les AGPI que pour celle des monoacylglycérols contenant les AGS (259). Ainsi, cette acylation différentielle des monoacylglycérols par la MGAT constituerait un mécanisme d'épargne des AGPI au sein de tissus spécifiques.

# 3. <u>Mécanismes saisonniers d'équilibre de la balance énergétique et leurs limites</u> <u>physiologiques</u>

En association à cette oxydation différentielle des lipides, reflétant un accroissement du degré d'insaturation de l'organisme, les microcèbes acclimatés à l'hiver, augmentent par 7 fois la fréquence de leurs épisodes de torpeur, au cours de la restriction alimentaire et ce, quelle que soit l'intensité du régime (modérée ou sévère). Il a été récemment démontré que des souris sylvestres (Peromyscus maniculatus), exposées à une photopériode courte (hiver), augmentent la fréquence et la durée de leurs épisodes de torpeur, de manière concomitante à des changements de la composition lipidique de leur tissu musculaire (79). Ainsi, l'accroissement de l'expression des torpeurs chez les microcèbes sous phénotype hivernal résulterait en une modification de la composition membranaire et tissulaire de leur organisme. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence les effets bénéfiques d'une augmentation de la proportion en AGPI au sein d'un régime alimentaire ou du tissu adipeux blanc, sur l'expression de la torpeur et, au moins dans plusieurs études, sur la durée et la profondeur de ces épisodes et sur l'épargne énergétique qui y est associée (59, 61, 76, 242). Ces effets des AGPI sur l'expression de la torpeur seraient liés à leurs points de fusion relativement bas (entre -1 et -15°C), comparés à celui des AGS (environ +70°C), permettant de maintenir la fluidité des membranes et tissus de l'organisme à basses températures et, par conséquent, leurs fonctions physiologiques au cours des phases de températures corporelles réduites.

Néanmoins, cette augmentation de l'expression des phases de torpeur est associée à un niveau de stress oxydatif (précoce et tardif) accru chez les animaux de phénotype hivernal soumis à une réduction sévère de 80% des apports caloriques, et ce, contrairement aux animaux en hiver exposés à une restriction alimentaire modérée. En effet, en contrepartie de leurs bénéfices vis-à-vis du maintien de la fluidité membranaire et tissulaire, les AGPI présentent un degré d'auto-oxydation beaucoup plus élevé que les AGS. Ainsi, en augmentant

l'insaturation au sein de leur organisme, les microcèbes, acclimatés à l'hiver, s'exposent à un risque accru de peroxydation lipidique et, par conséquent, à une éventuelle augmentation du stress oxydatif, plaçant l'animal au cœur d'une situation de compromis. En effet, un régime très riche en AGPI réduit l'expression de la torpeur, comme démontrée par de nombreuses études (65, 157) et récemment chez l'écureuil terrestre arctique (Spermophilus paryii) (64). Les auteurs de cette étude ont mis en évidence dans quelle mesure la nature du régime alimentaire au cours de l'automne 1) varie en termes de proportion en AGPI et 2) influence l'expression de la torpeur chez des animaux sauvages. Les résultats révèlent que les écureuils terrestres arctiques ayant consommé un régime très riche en AGPI durant l'automne présentent des épisodes de torpeur moins longs, plus de réveils périodiques, de plus longues périodes de réchauffement et une probabilité plus faible de survie que les animaux ayant consommés un régime à teneur modérée en AGPI. Par conséquent, l'ensemble de ces résultats indique l'existence, chez l'hétérotherme, d'un niveau optimal d'insaturation de l'organisme permettant de maximiser la capacité d'expression de la torpeur, tout en minimisant le niveau du stress oxydatif lié à la peroxydation, au cours de ces épisodes (63, 65). Ainsi, face à une restriction alimentaire modérée, les microcèbes acclimatés à l'hiver optimisent leur phase de torpeur, par la réalisation d'un tel compromis coût-bénéfice. De plus, il semblerait que les microcèbes sous phénotype hivernal ne parviennent pas à réaliser ce compromis puisque leur niveau de stress oxydatif (précoce et tardif) augmente largement au cours d'un régime alimentaire sévère. Puisque le stress oxydatif résulte d'une balance entre oxydants et antioxydants, l'augmentation du niveau de la peroxydation lipidique, liée à l'enrichissement en AGPI de l'organisme, est associée à un accroissement des défenses anti-radicalaires, au cours des torpeurs. De nombreuses études démontrent une élévation de l'activité des systèmes antioxydants, visant à limiter la génération du stress oxydatif, durant les périodes d'hibernation et de torpeur journalière, en particulier au cours des phases de retour à la normothermie (29, 33, 34, 44, 45, 164, 244). Au sein de notre étude, la dépense énergétique totale des animaux, ajustée à la masse maigre, qui représente le coût énergétique spécifique lié à la torpeur est inversement corrélée avec le niveau précoce du stress oxydatif. Ainsi, l'accroissement des épisodes de torpeur, constituant des périodes de hauts potentiels dans la génération du stress oxydant, représente un coût oxydatif élevé, notamment au cours des restrictions alimentaires sévères. Ainsi, ce compromis coût-bénéfice apparaît grandement déplacé en faveur d'un niveau élevé de stress oxydatif chez ces animaux, jusqu'à affecter l'intégrité de leur patrimoine génétique et donc leur valeur sélective, puisque la génération du marqueur tardif, reflétant les dommages du stress oxydatif sur l'ADN, augmente

considérablement au cours d'une restriction alimentaire sévère.

Comme pour les animaux en hiver face à une restriction alimentaire sévère, une génération accrue du stress oxydatif précoce est également observée chez les microcèbes de phénotype d'été soumis à une réduction modérée des ressources énergétiques. En revanche, aucune oxydation différentielle des acides gras (saturés vs. insaturés) n'est notée chez ces animaux, contrairement aux microcèbes acclimatés à l'hiver, et un accroissement des oxydations du palmitate et du linoléate est rapporté. De plus, il apparaît que le stress oxydatif précoce est fortement lié au taux d'oxydation du linoléate, comme suggéré par la corrélation positive entre ces deux éléments. Par conséquent, l'oxydation augmentée du linoléate résulterait en un niveau accru du stress oxydatif précoce, supplantant les mécanismes de défenses anti-oxydantes de l'organisme, chez les microcèbes de phénotype estival. En dépit de la réalisation d'un compromis coût-bénéfice, le niveau de génération du stress oxydatif chez ces microcèbes pourrait être lié à des différences saisonnières, des mécanismes, des systèmes de défense anti-radicalaires, comme reporté par de nombreuses études (28, 30, 256). Chez l'écureuil terrestre européen, l'activité maximale enzymatique des défenses antioxydantes (superoxyde dismutase et catalase), au niveau cérébral, coïncide avec l'arrivée du printemps et est grandement réduite durant l'été. En outre, les taux les plus élevés des molécules anti-oxydantes (acide ascorbique et glutathion) ont été mesurés chez les écureuils en hiver, en comparaison avec les animaux au cours de l'été et durant le printemps (28). Cependant, déterminer si l'incapacité à accroître l'expression des épisodes de torpeur est liée ou non à des capacités réduites des défenses anti-oxydantes chez les microcèbes acclimatés à l'été, ne peut être tranché dans cette étude. De plus, de nombreuses expérimentations reportent un niveau élevé des taux d'hormones impliquées dans la thermogenèse et la reproduction, au cours de la saison estivale et leurs effets inhibiteurs sur la thermorégulation et la torpeur (40, 160, 170). Ainsi, les hormones stéroïdiennes, en particulier la testostérone, inhibent les phases d'hibernation chez les rongeurs (87), et une augmentation du taux de testostérone, durant la période printanière de reproduction, résulterait en la terminaison de la saison hibernante (40).

Cependant, la faible utilisation de la torpeur, chez les microcèbes en été, est compensée par le déploiement d'une stratégie alternative de réduction des coûts énergétiques, tout en conservant un niveau d'activité compatible avec les impératifs de compétition caractérisant la saison de reproduction. En effet, les résultats de cette étude démontrent que les microcèbes, sous phénotype estival, faisant face à une restriction alimentaire modérée diminuent leurs dépenses énergétiques, principalement en réduisant leur masse métaboliquement active, dès les premiers jours de régime, pour se stabiliser à un niveau inférieur de demandes énergétiques. Une étude récente a démontré qu'un opossum chilien (Thylamus elegans) diminuait son coût de maintenance corporelle, notamment en réduisant la masse de ses organes internes, comme le tractus digestif et le foie (21). Ces organes sont probablement parmi les plus coûteux en énergie, en termes de métabolisme protéique (146, 254). Ainsi, les besoins énergétiques abaissés des microcèbes acclimatés à l'été, via une réduction de la masse maigre accompagnée d'une légère augmentation de l'expression de la torpeur, permettent à ces animaux de maintenir un niveau inchangé de leur métabolisme azoté, traduisant un réinvestissement de l'énergie épargnée dans un niveau d'activité comportemental élevé, voir même accru, durant une réduction modérée des ressources énergétiques. De plus, le Microcèbe a un régime principalement insectivore (plus que frugivore), comme il a été suggéré que les primates de petite taille incluent une forte proportion d'insecte dans leur alimentation (115), et cette particularité lui permet de satisfaire un niveau élevé de besoins énergétiques et protéiques, contribuant au maintien d'un métabolisme azoté élevé durant la saison humide. Cette stratégie adaptative permet ainsi au Microcèbe, durant la saison d'été, de maximiser sa valeur sélective individuelle et d'assurer un succès reproducteur optimal pour garantir une survie élevée et, par conséquent, la pérennisation de l'espèce.

En revanche, lorsque le Microcèbe fait face à une pénurie sévère au cours de l'été, il se retrouve dans l'incapacité d'équilibrer sa balance énergétique, malgré une réduction constante de sa masse corporelle (probablement de sa composante maigre) et un accroissement progressif de l'expression des épisodes de torpeur. Ce déficit énergétique sévère, associé à un maintien du niveau d'activité comportemental, engendre chez ces animaux l'atteinte d'un niveau pondéral critique, les conduisant à augmenter considérablement leur niveau d'activité locomotrice, dès le 15<sup>e</sup> jour de restriction calorique, et probablement en liaison avec une perte protéique excessive et sous un effet hormonal. En effet, parmi les éléments déclenchant une augmentation importante de l'activité locomotrice, il se pourrait que le taux plasmatique de leptine soit fortement impliqué. Il a été reporté, chez le rat, que l'injection de leptine réduisait l'hyperactivité induite par la réduction de moitié des apports caloriques (52). Ainsi, il a été suggéré que l'hypo-leptinémie provoquée par la restriction alimentaire constituerait le signal déclenchant l'augmentation de l'activité locomotrice chez des rats privés de nourriture (52). Ceci pourrait donc expliquer l'augmentation drastique (de presque 4 fois) de l'activité locomotrice des microcèbes acclimatés aux jours longs, durant une réduction sévère (80%) des apports caloriques.

D'autres hormones, comme celles qui sont sécrétées par le tractus gastro-intestinal pourraient jouer un rôle dans les réponses de thermorégulation et d'activité locomotrice chez ces microcèbes, au cours d'une restriction alimentaire sévère. En effet, en parallèle du niveau accru de l'activité locomotrice, ces animaux augmentent considérablement l'expression de leurs épisodes de torpeur (durée, profondeur et anticipation), de manière comparable à celle des microcèbes sous phénotype hivernal. De plus, une corrélation significative reliant la température minimale au cours de la torpeur et le taux de GLP-1 a été reportée chez les microcèbes acclimatés à l'été. Il a été démontré que le GLP-1, une hormone gastrointestinale, diminuait la température corporelle chez la caille japonaise (227)et réduisait la dépense énergétique chez l'homme (58). Ceci renforce donc le rôle potentiel du GLP-1 dans l'expression accrue des phases de torpeur chez le Microcèbe durant la période estivale, et notamment au cours d'une pénurie alimentaire sévère au long terme. Néanmoins, cet accroissement des épisodes de torpeur chez ces animaux n'en demeure pas moins la conséquence d'un état critique de masse corporelle, provoquant une situation d'urgence nonadaptative, dans le contexte d'une réduction drastique des ressources énergétiques. Cette réponse est exacerbée par les conditions expérimentales de l'étude, et notamment par le maintien des animaux en captivité, dans un espace clôt et limité, inhibant toutes possibilités de trouver de la nourriture, via un éventuel mécanisme de migration locale.

#### 4. Torpeur journalière à composante saisonnière et relation avec les habitats naturels

À la lumière des résultats de cette étude, l'utilisation de la torpeur apparaît, chez le Microcèbe, comme un mécanisme d'économie d'énergie, dont l'expression journalière revêt un caractère saisonnier. En effet, les études antérieures menées sur ce petit primate malgache révèlent une capacité accrue des animaux de phénotype hivernal à augmenter la durée, la profondeur et l'anticipation de leurs épisodes de torpeur par rapport aux animaux acclimatés à l'été, en réponses à des basses températures ambiantes et/ou à de courtes périodes de restriction alimentaire (83, 224). Ainsi, les données obtenues au cours de ce travail de recherche s'accordent avec les précédents résultats, notamment concernant les réponses du Microcèbe face à une restriction énergétique à court terme. Contrairement aux animaux acclimatés à l'été, l'augmentation immédiate et de grande amplitude de la durée, de la profondeur et de l'anticipation des épisodes de torpeur chez les microcèbes de phénotype hivernal, soumis à une restriction alimentaire chronique, dénote bien le caractère saisonnier de ce mécanisme journalier de la torpeur, chez ce primate malgache. Une telle capacité de

thermorégulation saisonnière constitue donc, chez le Microcèbe, un mécanisme adaptatif d'épargne énergétique, par un simple accroissement de la réduction des coûts métaboliques, à travers l'utilisation de la torpeur, pour faire face aux périodes prévisibles de pénurie alimentaire, au sein son habitat naturel.

Dans son environnement naturel, le Microcèbe présente des variations saisonnières de masse corporelle et d'expression des torpeurs, qui différent en fonction de la large variabilité des biotopes colonisés par ce petit primate malgache. En effet, Lahann et al. (127) ont déterminé l'impact des variations éco-géographiques sur les contraintes de thermorégulation, chez le Microcèbe (Microcebus murinus), en utilisant trois populations distinctes d'animaux, reparties du nord au sud de Madagascar (Ampijoroa, Kirindy, Mandena). Les résultats révèlent que la masse corporelle des microcèbes diminue au fur et à mesure que les températures ambiantes augmentent, du sud au nord (Mandena > Kirindy > Ampijoroa). Ainsi, les contraintes de thermorégulation résultent d'un gradient latitudinal de la masse corporelle des individus. De même, les microcèbes présentent des masses corporelles supérieures dans les forêts primaires, comme celles qui sont trouvées à Mandena et dans lesquelles ces animaux sont le plus souvent rencontrés, que dans les forêts secondaires, caractérisant les habitats secs de forêts parsemées de Kirindy et d'Amipjoroa (70). De plus, les variations dans l'abondance de M. murinus au sein des différents habitats sont liées aux capacités d'entrer en torpeur pour économiser de l'énergie, durant la saison sèche. En milieu naturel, le Microcèbe est capable de maintenir des phases de torpeur journalière, aussi longtemps que sa température corporelle demeure en dessous de 28°C. Ainsi, les températures ambiantes plus faibles rencontrées au sein des forêts primaires permettent aux microcèbes d'entrer en torpeur plus fréquemment et plus longtemps que celles, plus élevées, relevées dans les forêts secondaires (70).

Peu d'études ont étudié les variations en ressources trophiques à travers les différents types de régions et d'habitats colonisés par les microcèbes, et les effets de telles fluctuations sur la masse corporelle et l'utilisation de la torpeur chez ce primate. Néanmoins, la disponibilité alimentaire locale semble être directement reliée au niveau des précipitations de la région, ainsi considérées comme un élément de proximité dans l'estimation de l'abondance ou des faibles proportions en ressources trophiques d'un territoire donné (127). La côte ouest de Madagascar présente un gradient décroissant de précipitations, du nord au sud, avec les niveaux les plus élevés dans les régions du nord-ouest (Ampijaroa) et les plus faibles dans la partie sud de l'île (à l'ouest de Mandena). La réduction de la productivité des ressources trophiques, liée à la saisonnalité (été/hiver), provoque un effet délétère sur le succès

reproducteur du Microcèbe qui constitue un compromis avec la longévité de l'individu (127), et donc indirectement avec sa valeur sélective. En outre, l'utilisation de la torpeur chez le Microcèbe constitue un mécanisme adaptatif important dans la réduction des coûts énergétiques et, par conséquent, dans le maintien de la valeur sélective de l'individu (215). Ainsi, il apparaît évident que le recourt aux épisodes de torpeur, maximisant la valeur sélective et les chances de survie des animaux, soit accru dans les situations de réduction des ressources énergétiques. De plus, il a été suggéré que l'utilisation d'un tel mécanisme corresponde à une réponse adaptative reflétant un impact sur les besoins hydriques et sur les demandes énergétiques, bien que la réduction des flux métaboliques profite davantage à un abaissement des besoins hydriques plutôt qu'énergétiques de l'individu (223). Ainsi, l'association des gradients nord-sud des niveaux de précipitations et de ressources énergétiques concorde avec cette observation concernant les impacts de l'utilisation de la torpeur chez le Microcèbe, au sein de son milieu naturel.

En plus de leurs impacts sur la quantité des ressources énergétiques disponibles, les variations saisonnières impliquent des modulations de la qualité (composition) des ressources. Les premières études (142, 143) et les travaux plus récents (37, 199, 221) menées sur l'écologie alimentaire du Microcèbe révèlent et confirment que ces animaux se nourrissent préférentiellement de sécrétions d'insectes et de gommes d'arbres, mais aussi de feuilles, de fruits, de nectar et parfois de petits insectes (de type anthropode). Les variations saisonnières climatiques sont suivies de très près par les fluctuations des ressources énergétiques (103), et notamment par la disponibilité des feuilles des arbres constituant une source importante d'apports lipidiques, en particulier en acides gras insaturés (AGI), dont le rôle apparaît crucial, selon cette étude, durant les phases précédant et au cours de la saison sèche d'optimisation du mécanisme de torpeur. Là encore, très peu de données concernant la composition du régime annuel du Microcèbe sont disponibles, et aucune étude ne fournit la qualité précise des aliments consommés par ces animaux, au sein de leur environnement naturel sur la côte ouest de Madagascar. Une revue regroupant les connaissances sur la phénologie des ressources alimentaires, au cours de l'année, des forêts humides situées à l'Est de Madagascar, indique une saisonnalité marquée de la disponibilité des fruits, feuilles et fleurs au sein de ces forêts (257). Les feuilles des arbres sont abondantes au cours de la saison humide (novembre à mars) alors que leur présence est quasiment nulle durant les périodes saisonnières de sécheresse, dans les forêts humides de l'Est de l'île. Du fait des conditions climatiques plus sévères caractérisant les forêts parsemées et épineuses de l'Ouest et du Sud de Madagascar, il est fortement probable que la rareté des feuilles soit accrue au sein des

habitats colonisés par les microcèbes. Toutefois, la large distribution de ce primate et sa longévité suggèrent fortement que les microcèbes optimisent l'expression de leurs épisodes de torpeur en consommant des aliments de teneur élevée en AGI, favorisant la réalisation d'un compromis coût-bénéfice entre l'économie énergétique et les conséquences délétères liées à l'accroissement de ses phases de torpeur.

À Madagascar, associée à la saisonnalité marquée provoquant des variations importantes des ressources alimentaires, en termes de quantité et de qualité, une forte variabilité dans l'abondance et la pénurie alimentaires existe entre les saisons sèches, d'une année sur l'autre. Ainsi, ces fluctuations climatiques provoquent des productions arboricoles (feuilles, fleurs, fruits) irrégulières, asynchrones et alternées selon les cycles annuels. Cette large variabilité interannuelle apparaît fortement liée à l'occurrence, récurrente mais non-périodique, de phénomènes climatiques (cyclones et tempêtes tropicales), du type El Nino (110), provoquant une variabilité climatique tant au cours de la saison humide que de la saison sèche, avec une prépondérance au cours de l'été (264). L'oscillation australe d'El Niño (ENSO) survient environ deux fois tous les dix ans et coïncide avec les périodes de sécheresse et donc de pénurie alimentaire. De plus, le Sud de Madagascar est plus souvent affecté que le reste de l'île par le phénomène climatique El Niño. Ceci résulte en une imprévisibilité accrue dans ces régions aux habitats de forêts épineuses.

#### 5. Impact sur la survie du Microcèbe

Durant la saison d'été, l'impact majeur affectant la survie du Microcèbe surviendrait lors d'occurrence d'épisodes sévères de pénurie alimentaire. En effet, les modifications de températures corporelles et les réponses d'activité locomotrice démontrent clairement que les microcèbes, sous phénotype estival, subissent une très forte pression de l'homéostasie énergétique. En particulier, la forte augmentation de l'activité locomotrice dénote un comportement exacerbé de recherche alimentaire et suggère un processus de migration des microcèbes au sein de leurs habitats naturels. En effet, les microcèbes peuplent des parcelles disséminées de végétation, caractéristique des forêts épineuses et parsemées, et peuvent ainsi se déplacer aisément sur des moyennes distances, comme celles qui séparent deux parcelles. De plus, lors de l'occurrence d'un phénomène climatique anormal, il est toujours possible de trouver quelques ressources alimentaires ponctuelles, au cours de la pénurie alimentaire drastique qui y est associée. Par conséquent, en migrant localement, les microcèbes augmentent leurs chances de trouver des ressources, pour subvenir en partie à leurs besoins

énergétiques. Néanmoins, dans la situation d'une pénurie alimentaire drastique, comparable à une restriction calorique expérimentale de 80%, et malgré la stratégie migratoire déployée, il sera fortement probable que la survie des microcèbes soit affectée. Durant la saison de reproduction, les animaux évoluent de manière solitaire et ne recourent sans doute pas fréquemment à l'économie énergétique procurée par la thermorégulation sociale. Une étude menée dans le Nord-ouest de Madagascar durant la saison humide révèle que les microcèbes mâles dorment seuls (198), alors qu'une seconde étude reporte les mâles M. murinus dormant seuls à 71%, contrairement aux femelles qui dorment en groupe (125). Au contraire, les microcèbes mâles soutiennent un niveau élevé d'activité locomotrice pour rechercher les femelles réceptives durant la courte période de l'accouplement. Ainsi, en accord avec l'hypothèse d'une activité comportementale risquée du Microcèbe ('risky male behavior'), le faible taux de survie des mâles est restreint à la courte période d'accouplement (123). En outre, en migrant intensivement, comme il serait le cas lors de pénurie alimentaire sévère, les microcèbes s'exposeraient à une pression de prédation accrue. L'une des premières causes de mortalité du Microcèbe réside dans la prédation par les serpents ou les oiseaux nocturnes, comme les chouettes ou les hiboux (89). Par exemple, à Beza Mahafaly, Microcebus murinus vit en sympatrie avec M. griseorufus et, d'après des calculs, environ 500 microcèbes sont consommés par an (88). Ainsi, lors d'une pénurie alimentaire sévère, au long terme, l'impact d'une stratégie d'augmentation de l'activité locomotrice, et par conséquent de migration, sur la survie du Microcèbe, durant la saison estivale, serait tout d'abord lié à une pression de prédation plus importante, avant même que les animaux ne périssent de sous-nutrition.

Au cours de cette étude, les microcèbes sont nés et maintenus en captivité, sous des conditions constantes de températures ambiantes et d'hygrométrie. Les microcèbes captifs présentent des niveaux pondéraux supérieurs à ceux des animaux en milieu naturel (80 *vs.* 50 g en été, 120 *vs.* 90 g en hiver) et sont préservés de tout stress liés à un habitat naturel, comme les variations de températures ambiantes et la pression de prédation. Par conséquent, face à une pénurie alimentaire sévère et de longue durée, les limites physiologiques des microcèbes sauvages seraient atteintes beaucoup plus rapidement que celles des microcèbes captifs, testés au sein de cette étude.

Le plus souvent au cours de la saison d'hiver, les microcèbes se regroupent durant la phase diurne de repos journalier, principalement dans les creux d'arbres. Cette stratégie de regroupement engendre deux intérêts majeurs : 1) une économie énergétique liée à une thermorégulation sociale, en complément de la torpeur et 2) une réduction de la pression de prédation. Tout d'abord, en se regroupant, les microcèbes réduisent la surface d'échange

exposée à l'air ambiant et, en conséquence, diminuent leurs coûts énergétiques. Des études en captivité ont mesuré les bénéfices énergétiques liés à un tel comportement, chez des microcèbes acclimatés en jours courts et les résultats révèlent que le gain énergétique maximal est atteint lorsque deux animaux se regroupent ensemble au sein d'un même nichoir, puisque leur taux métabolique de repos est déjà réduit au cours de la saison sèche (181). L'utilisation de trous d'arbres par le Microcèbe, durant la saison sèche, permet également, par un effet d'isolation thermique, de limiter les variations extrêmes de températures ambiantes à l'intérieur du nichoir, et ainsi de créer un microclimat dans ces sites de repos diurne permettant de prolonger les épisodes de torpeur. En effet, le recours à la torpeur permet aux microcèbes d'épargner environ 40% de l'énergie journalière comparé à l'état de normothermie, et ne peut-être maintenue par le Microcèbe qu'en dessous d'une température de 28°C. Ainsi, en utilisant des creux d'arbres isolés thermiquement, les microcèbes peuvent rester en torpeur plus longtemps et augmenter leur économie énergétique journalière de 5% supplémentaires (219). De plus, les résultats de l'étude de Séguy et Perret (224), conduite sur des animaux captifs, concordent avec les données de Schmid (219). En effet, Séguy et Perret (224) ont montré qu'en association de la restriction calorique et d'une exposition au froid, le regroupement permettait aux animaux sous phénotype d'hiver, de rester plus longtemps en torpeur, sans en accroître sa profondeur. À l'inverse, au cours de la saison humide, même si le Microcèbe mâle ne semble pas recourir à la thermorégulation sociale lorsque la disponibilité alimentaire est importante, il pourrait très probablement y avoir recourt au cours de pénuries énergétiques durant l'été. L'étude de Perret (181) démontre que des microcèbes acclimatés en jours longs (été) réduisent de 20% leur dépense énergétique lorsqu'ils sont groupés en paires, atteignant un bénéfice énergétique maximal de 40% lorsque trois animaux sont regroupés ensemble. Ainsi, le recours à la thermorégulation sociale pourrait constituer un moyen efficace pour le Microcèbe de réduire ses coûts énergétiques en réponse à une pénurie alimentaire chronique, durant la période estivale de haut niveau métabolique lié à l'activité de reproduction. Néanmoins, il reste à déterminer dans quelles mesures ces gains d'énergie liés à la thermorégulation sociale permettraient aux microcèbes, en hiver comme en été (si une telle stratégie est déployée au cours de la saison de reproduction), d'équilibrer leur balance énergétique, ou du moins de limiter les impacts d'une réduction sévère des ressources trophiques sur la survie.

L'hiver austral à Madagascar est caractérisé par une période de sécheresse bien marquée provoquant des pénuries alimentaires sévères, auxquelles doivent se confronter les microcèbes durant la saison sèche. Ces périodes drastiques de réduction des ressources trophiques peuvent également avoir lieu durant la saison de reproduction en été, lors de la survenue de tempêtes ou de cyclones tropicaux. Des données récentes (264), analysant l'évolution de l'oscillation australe d'El Niño (ENSO), démontrent que l'impact des cycles de ENSO, causé par des changements régionaux de la balance d'hydrologie, dans le sud-ouest de l'Océan Indien, a été modifié depuis les années 1970, en relation avec le réchauffement de la surface des eaux de cet océan. En outre, ENSO est fortement corrélé avec un index de végétation à Madagascar (107), indiquant un impact important du phénomène El Niño sur l'abondance de la flore locale et, par conséquent, de la disponibilité des ressources trophiques. Dans le contexte de changements globaux, de nombreux modèles prévoient une augmentation de la fréquence et/ou de l'intensité des phénomènes climatiques anormaux, en dehors des normes saisonnières, notamment ceux qui sont associés à ENSO, en particulier dans la région de l'Océan Indien (108, 243). Lorsque qu'un modèle climatique extrapole le scénario d'un accroissement des concentrations des gaz à effet de serre, les conditions relatives à El Niño deviennent plus fréquentes et des évènements de courant froid plus intenses surviennent dans la zone de l'Océan Pacifique tropical (243). Ainsi, des périodes de sécheresse exceptionnelles sont particulièrement attendues dans les écosystèmes secs, incluant les forêts décidues du sud et de l'ouest de l'île (107), et ce tout au long de l'année. Bien que la modélisation des changements climatiques ne produise que des prévisions incertaines, des pénuries énergétiques, plus sévères qu'actuellement, pourraient survenir plus fréquemment au sein des habitats des microcèbes.

#### 6. Comparaison avec d'autres primates Cheirogalidés et d'autres espèces tropicales

Au sein d'un environnement aux conditions fluctuantes, d'autres espèces tropicales, incluant certains primates de la famille des Cheirogalidés, ont également développé, à l'instar du Microcèbe murin, des mécanismes saisonniers d'épargne énergétique, à travers l'utilisation de phases d'hypométabolisme (torpeur ou hibernation).

Le *Cheirogaleus medius*, un primate nocturne d'environ 150 g et colonisant, en sympatrie avec *M. murinus* (125), l'Ouest de Madagascar, présente des cycles saisonniers très marqués de masse corporelle (191, 258) et hiberne durant plusieurs mois pendant la saison sèche, lorsque la disponibilité en eau et en aliments est limitée. En effet, ce primate présente des fluctuations de sa température corporelle (entre 15 et 33°C) durant ses périodes d'hibernation pouvant durer jusqu'à 6 jours (41, 42), au sein de creux d'arbres ou enterré à même le sol. Cette capacité extraordinaire d'hétérothermie, avec des phases de torpeur

prolongée, figure parmi les plus exceptionnelles au sein des primates malgaches, et permet au *Cheirogaleus medius* de survivre durant les périodes froides et pauvres en énergie, à l'Ouest de Madagascar.

D'autres espèces de Microcèbe, vivant en sympatrie avec *Microcebus murinus*, utilisent le mécanisme de la torpeur, comme *M. myoxinus*, *M. berthae* ou *M. griseorufus*, pour faire face aux fluctuations saisonnières locales. Ainsi, bien que différant sur certains aspects, le microcèbe pygmé (*M. myoxinus*) présente une organisation sociale et une régulation de son métabolisme énergétique très similaire au Microcèbe murin. Les microcèbes pygmés, colonisant les forêts parsemées, de façon localisée à l'Ouest de Madagascar, présentent des épisodes de torpeur journalière, pouvant durer entre 4,6 et 9,2 heures et atteindre des températures minimales de 6,8°C (température ambiante de 6,3°C), au cours de la saison froide et sèche (216, 222). Également en sympatrie avec le Microcèbe murin, *Microcebus griseorufus* colonise les forêts épineuses du Sud de Madagascar, présente un engraissement saisonnier et recourt à la torpeur, durant les périodes de sécheresse imprévisibles, caractérisant ces régions (81).

Un autre Microcèbe, *M. rufus*, ne colonisant pas le même habitat que *Microcebus murinus*, utilise également les phases de torpeur, au cours de la saison sèche, en association avec une saisonnalité marquée de masse corporelle, au sein de son habitat naturel dans les forêts humides de l'Est de l'île (10). Une étude comparant les changements différentiels de masse corporelle et d'activité locomotrice chez *M. rufus* et *M. ravelobensis*, colonisant respectivement l'Est et le Nord-ouest de Madagascar, révèle qu'une partie de la population de *M. rufus*, contrairement à *M. ravelobensis*, présente des épisodes de torpeur saisonnière, en relation avec le niveau de masse corporelle, durant la période de courte photopériode et de basses températures (202). Ainsi, cette différence dans l'utilisation de la torpeur et de saisonnalité dans la masse corporelle pourrait être liée à des conditions différentes de températures ambiantes et de disponibilité alimentaire, entre les forêts humides de l'Est et les forêts parsemées du Nord-ouest de Madagascar.

D'autres lémuriens et espèces tropicales présentent également des périodes d'hypométabolisme pour survivre au sein de leur milieu fluctuant. Par exemple, Perreira *et al.* (177) ont montré que les concentrations d'Insulin Growth Factor 1 (IGF-1) et de thyroxine (T4), deux hormones régulant le métabolisme chez l'homme et d'autres mammifères (161), variaient saisonnièrement, chez le *Lemur catta* et l'*Eulemur fulvus*. Les taux circulant d'IGF-1 et de T4 diminuaient en prévision de la saison sèche et étaient maintenus à des niveaux relativement bas durant toute la période hivernale, avant de retourner à des concentrations

plus élevées au cours de la saison humide. Ainsi, ces résultats démontrent que des primates tropicaux non-hétérothermes sont aussi capables de réduire certains aspects de leur métabolisme. Des études menées sur les variations de températures corporelles et de métabolisme de repos, chez les Tenrecs, sont parvenu à des conclusions similaires, et ont suggéré que les caractéristiques phylogénétiques, climatiques et écologiques, soient associées à la large différentiation du métabolisme énergétique parmi les Terencidae (196, 235). En effet, plusieurs espèces de Tenrecs sont hétérothermes et présentent des épisodes de torpeur journalière à caractère saisonnier (*Geogale aurita, Echinops telfairi*) (235). Également, ces deux espèces de Tenrec ont des métabolismes de repos inférieurs aux autres Tenrecs, en comparaison de leur masse corporelle (196).

L'ensemble de ces réponses métaboliques face à des fluctuations de l'environnement (saisonnières ou non), communes aux espèces tropicales, suggère que le mécanisme de la torpeur journalière a évolué sous la pression de facteurs récurrents mais non-périodiques, comme le phénomène El Niño. En effet, de tels facteurs, souvent référés aux éléments imprévisibles, tendent à sélectionner les mécanismes adaptatifs réactifs et opportunistes, comme la torpeur journalière ou une faible saisonnalité de la reproduction (133, 135). Ainsi, malgré une saisonnalité marquée, l'extrême imprévisibilité caractérisant également le climat de Madagascar serait responsable de la particularité de la faune malgache. Dans le contexte de changements globaux toujours croissants, l'occurrence de tels phénomènes, récurrents à caractère non-périodique, est amenée à croître dans les prochaines décennies, et seules les espèces vivantes, capables de s'adapter à ces changements drastiques et brutaux, pourront survivre, les autres étant condamnées à disparaître.

#### 7. Perspectives

Un taux métabolique élevé et des températures de normothermie confèrent aux animaux des avantages non négligeables, comme la locomotion, la reproduction ou le fourragement. Ainsi, lorsque la disponibilité alimentaire est suffisante, l'animal opte pour le maintien de hauts niveaux de taux métaboliques (233). À l'inverse, l'utilisation de la torpeur engendre, outre une épargne énergétique, un état inactif pouvant être préjudiciable pour l'animal, et de nombreux coûts liés aux bas niveaux métaboliques associés à ce mécanisme. La plupart des hibernants émergent périodiquement de leurs épisodes de torpeur prolongée, et il a été spéculé que la fonction de tels retours à la normothermie permettraient la restauration des coûts physiologiques, accumulés durant la dépression métabolique (106). Par conséquent, ces évidences impliquent une utilisation facultative de la torpeur tant que les coûts énergétiques liés à un niveau métabolique élevé sont compensés par une disponibilité alimentaire suffisante. Par exemple, lorsque les réserves des écureuils (*Tamias striatus*) sont supplémentées en aliments avant la période d'hibernation, ces animaux présentent au moins deux fois plus de phases euthermiques que les écureuils dont les réserves alimentaires ne sont pas supplémentées (105). Ainsi, l'expression de la torpeur chez les hibernants résulterait d'une absence de nécessité énergétique plutôt que d'une incapacité physiologique, et l'endotherme pourrait bénéficier du maintien de températures corporelles élevées, autant que possible. Des expérimentations supplémentaires déterminant la relation entre disponibilité alimentaire et expression de la torpeur chez d'autres espèces hétérothermes sont néanmoins nécessaires pour généraliser ce point de vue de « torpeur facultative » chez les endothermes. Par conséquent, déterminer si les variations de l'expression de la torpeur, chez les mammifères hibernants, résultent des différences de contraintes physiologiques ou bien sont liées aux différences des besoins énergétiques, reste crucial pour comprendre les implications physiologiques et écologiques de la suppression métabolique chez les endothermes.

En tant qu'état hypométabolique, la torpeur présente des avantages énergétiques non négligeables et l'hibernant choisit d'entrer dans cet état de vie ralentie, en fonction des conditions défavorables de son environnement. Une des conséquences du ralentissement des taux métaboliques résiderait dans un accroissement de la longévité. Ainsi, la torpeur est considérée comme un mécanisme améliorant la valeur sélective de l'individu, et donc allongeant sa survie, si l'accumulation de dommages somatiques est réduite (140). Un argument similaire a été évoqué pour expliquer la raison pour laquelle les endothermes euthermiques maintiennent habituellement des niveaux métaboliques bien inférieurs aux limites physiologiques de l'organisme (233). En accord avec cette hypothèse, le paradigme de la restriction calorique est bien connu pour augmenter la longévité dans une large diversité taxonomique (225, 233). Ceci suggère donc que la restriction calorique affecte des mécanismes centraux impliqués dans le processus du vieillissement, qui néanmoins restent encore indéterminés à ce jour. Chez les mammifères, les réponses physiologiques à la restriction énergétique présentent des caractéristiques communes avec les mécanismes de réduction métabolique survenant au cours de l'hibernation (250). Ainsi, davantage qu'un simple artéfact de laboratoire, les mécanismes sous-tendant les effets de la restriction calorique semblent être inclus dans un large spectre des réponses adaptatives des animaux face au déficit énergétique. Shanley et Kirkwood (225) ont récemment suggéré que l'augmentation de la longévité correspondrait, plutôt qu'à une réduction du métabolisme per

*se*, à une réponse adaptative à la pénurie alimentaire impliquant une partition des allocations énergétiques en faveur de la maintenance somatique, et au détriment de la croissance et la reproduction. Ainsi, il apparaît intéressant de déterminer les stratégies adaptatives des animaux au sein de leur environnement naturel, qui résultent en un accroissement de la valeur sélective de l'individu et de ses chances de survie. Ainsi, la compréhension des effets d'une restriction alimentaire modérée chez les hétérothermes fournira très probablement des éléments nouveaux sur les mécanismes par lesquels la restriction calorique augmente la longévité. Une telle étude comparative est en cours, dans notre laboratoire, sur la colonie de microcèbes (*Microcebus murinus*) de Brunoy, soumise à une restriction énergétique modérée depuis l'âge adulte jusqu'à la mort naturelle des individus. Il est grandement espéré que cette étude longitudinale, chez un primate hétérotherme, ouvrira de nouvelles pistes de recherche dans le domaine de la biologie du vieillissement.

La capacité d'entrer saisonnièrement en torpeur/hibernation est, la plupart du temps, liée à un cycle saisonnier bien marqué de masse corporelle. Les hétérothermes présentent donc un cycle annuel de prise alimentaire excessive (boulimie), résultant en un gain pondéral principalement sous forme de masse grasse, associée à une phase subséquente d'anorexie, utilisant majoritairement les réserves corporelles emmagasinées durant l'engraissement (148, 153). Un tel cycle implique donc la régulation de la masse corporelle autour d'un « point de consigne », réglé à un niveau différentiel selon la saison (234). Les mécanismes, encore mal connus, impliqués dans la régulation de la masse corporelle concernent de nombreux systèmes physiologiques de l'organisme. Ainsi, l'hypothalamus joue un rôle important dans l'intégration des signaux et, en particulier, le noyau arqué intervient comme centre intégrateur dans les voies orexigène et anorexigène régulées par de nombreuses hormones de l'organisme. Par exemple, la leptine, hormone anorexigène et thermogène sécrétée par le tissu adipeux blanc, a pour cibles certains neurones du noyau arqué et est fortement impliquée dans la régulation de la masse corporelle. En particulier, chez les espèces saisonnières, un processus de résistance à la leptine survient durant l'automne, résultant en une accumulation de la masse grasse. Cette résistance concerne notamment un récepteur à la leptine situé dans l'hypothalamus, et serait associée au phénotype obèse chez l'homme (109, 152). Ainsi, la capacité des espèces saisonnières à modifier leur balance énergétique en fonction des variations de la photopériode, offre de larges opportunités pour identifier certains aspects fondamentaux des mécanismes de contrôle impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique et de la masse corporelle. Cela laisse entrevoir des perspectives intéressantes dans le domaine de recherche sur les mécanismes de la genèse de l'obésité chez l'homme.

Chapitre 6

# *Références bibliographiques*



1. Adams SH, Lei C, Jodka CM, Nikoulina SE, Hoyt JA, Gedulin B, Mack CM, and Kendall ES. PYY[3-36] administration decreases the respiratory quotient and reduces adiposity in diet-induced obese mice. *J Nutr* 136: 195-201, 2006.

2. Agid R, and Sicart R. Role of the thyroid in blood sugar regulation by the golden hamster. *In: Comptes-rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences* 269: 1551-1553, 1969.

3. **Ambid L, and Agid R**. Lipolytic activity of isolated cells of the white adipose tissue of the dormouse during hibernation: hormonal influences. *In: Comptes-rendus des séances de la Sociète de biologie et de ses filiales* 168: 610-614, 1974.

4. Ancel A, Visser H, Handrich Y, Masman D, and Le Maho Y. Energy saving in huddling penguins. *Nature* 385: 304-305, 1997.

5. Andrews MT, Squire TL, Bowen CM, and Rollins MB. Low-temperature carbon utilization is regulated by novel gene activity in the heart of a hibernating mammal. *Proc Natl Acad Sci US A* 95: 8392-8397, 1998.

6. Andrews RV, and Belknap RW. Bioenergetic benefits of huddling by deer mice (*Peromyscus maniculatus*). Comp Biochem Physiol A 85: 775-778, 1986.

7. Andrews RV, Phillips D, and Makihara D. Metabolic and thermoregulatory consequences of social behaviors between *Microtus townsendii*. *Comp Biochem Physiol A* 87: 345-348, 1987.

8. Arlettaz R, Ruchet RC, Aeschimann J, Brun E, Genoud M, and Vogel P. Physiological traits affecting the distribution and wintering strategy of the bat *Tadarida teniotis*. *Ecology* 81: 1004–1014, 2000.

9. Arnold W. Social thermoregulation during hibernation in alpine marmots (*Marmota marmota*). J Comp Physiol B 158: 151-156, 1988.

10. **Atsalis S**. Seasonal fluctuations in body fat and activity levels in a rain-forest species of mouse lemurs, *Microcebus rufus*. *Int J Primatol* 20: 883-910, 1999.

11. Aujard F, Perret M, and Vannier G. Thermoregulatory responses to variations of photoperiod and ambient temperature in the male lesser mouse lemur: a primitive or an advanced adaptive character? *J Comp Physiol B* 168: 540-548, 1998.

12. **Austad SN, and Fischer KE**. Primate longevity: Its place in the mammalian scheme. *Am J Primatol* 28: 251-261, 2005.

13. **Barboza PS, Farley SD, and Robbins CT**. Whole-body urea cycling and protein turnover during hyperphagia and dormancy in growing bears (*Ursus americanus* and *U. arctos*). *Can J Zool* 75: 2129-2136, 1997.

14. **Barre V, Lebec A, Petter JJ, and Albignac R**. Etude du Microcèbe par radiotracking dans la forêt de l'Ankarafantsika. *In: Actes Sémin Sci Int "L'Equilibre des écosystèmes forestiers à Madagascar"* 61-71, 1988.

15. **Bauer VW, Squire TL, Lowe ME, and Andrews MT**. Expression of a chimeric retroviral-lipase mRNA confers enhanced lipolysis in a hibernating mammal. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1186-R1192, 2001.

16. **Baumber J, and Denyes A**. Acetate- $1-C^{14}$  Utilization by Brown Fat from Hamsters in Cold Exposure and Hibernation. *Can J Bioch Physiol* 42: 1397-1401, 1964.

17. **Behrisch HW**. Temperature and the regulation of enzyme activity in the hibernator. Isoenzymes of liver pyruvate kinase from the hibernating and non-hibernating Arctic ground squirrel. *Can J Biochem* 52: 894-902, 1974.

18. Berriel Diaz M, Lange M, Heldmaier G, and Klingenspor M. Depression of transcription and translation during daily torpor in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). J Comp Physiol B 174: 495-502, 2004.

19. **Borgmann U, Laidler KJ, and Moon TW**. Four-and five-step kinetic models of lactate dehydrogenase. *Can J Biochem* 54: 915-918, 1976.

20. **Bourliere F, and Petter-Rousseaux A**. Probable existence of a seasonal metabolic rhythm in *Cheirogaleinae (Lemuroidea)*. *Int J Primatol* 4: 249-256, 1966.

21. Bozinovic F, Munoz JL, Naya DE, and Cruz-Neto AP. Adjusting energy expenditures to energy supply: food availability regulates torpor use and organ size in the Chilean mouse-opossum *Thylamys elegans*. J Comp Physiol B 177: 393-400, 2007.

22. **Bozinovic F, Ruiz G, and Rosenmann M**. Energetics and torpor of a South American "living fossil", the *microbiotheriid Dromiciops* gliroides. *J Comp Physiol B* 174: 293-297, 2004.

23. **Brooks SP, and Storey KB**. Mechanisms of glycolytic control during hibernation in the ground squirrel *Spermophilus lateralis*. *J Comp Physiol B* 162: 23-28, 1992.

24. **Buck MJ, Squire TL, and Andrews MT**. Coordinate expression of the PDK4 gene: a means of regulating fuel selection in a hibernating mammal. *Physiol Genomics* 8: 5-13, 2002.

25. **Buesching CD, Heistermann M, Hodges JK, and Zimmermann E**. Multimodal oestrus advertisement in a small nocturnal prosimian, *Microcebus murinus*. *Int J Primatol* 69: 295-308, 1998.

26. Burlington RF, Bowers WD, Jr., Daum RC, and Ashbaugh P. Ultrastructural changes in heart tissue during hibernation. *Cryobiology* 9: 224-228, 1972.

27. **Burlington RF, and Klain GJ**. Gluconeogenesis during hibernation and arousal from hibernation. *Comp Biochem Physiol* 22: 701-708, 1967.

28. **Buzadzic B, Blagojevic D, Korac B, Saicic ZS, Spasic MB, and Petrovic VM**. Seasonal variation in the antioxidant defense system of the brain of the ground squirrel (*Citellus citellus*) and response to low temperature compared with rat. *Comp Biochem Physiol* C 117: 141-149, 1997.

29. **Buzadzic B, Spasic M, Saicic ZS, Radojicic R, Petrovic VM, and Halliwell B**. Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 2. The effect of hibernation. *Free Radic Biol Med* 9: 407-413, 1990.

30. **Buzadzic B, Spasic MB, Saicic ZS, Radojicic R, and Petrovic VM**. Seasonal dependence of the activity of antioxidant defence enzymes in the ground squirrel (*Citellus citellus*): the effect of cold. *Comp Biochem Physiol B* 101: 547-551, 1992.

31. **Calow P, and Townsend CR**. Resource utilization in growth. *In: Physiological ecology: an evolutionary approach to resource use Sinauer Associates*. Edited by Sunderland Townsend CR, Calow P 220–244, 1981.

32. **Carey HV, Andrews MT, and Martin SL**. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiological reviews* 83: 1153-1181, 2003.

33. Carey HV, Frank CL, and Seifert JP. Hibernation induces oxidative stress and activation of NK-kappaB in ground squirrel intestine. *J Comp Physiol B* 170: 551-559, 2000.

34. Carey HV, Rhoads CA, and Aw TY. Hibernation induces glutathione redox imbalance in ground squirrel intestine. *J Comp Physiol B* 173: 269-276, 2003.

35. Chauhan VP, Tsiouris JA, Chauhan A, Sheikh AM, Brown WT, and Vaughan M. Increased oxidative stress and decreased activities of Ca(2+)/Mg(2+)-ATPase and Na(+)/K(+)-ATPase in the red blood cells of the hibernating black bear. *Life Sci* 71: 153-161, 2002.

36. Cochet N, Meister R, Florant GL, and Barre H. Regional variation of white adipocyte lipolysis during the annual cycle of the alpine marmot. *Comp Biochem Physiol C* 123: 225-232, 1999.

37. **Corbin GD, and Schmid J**. Insect secretions determine habitat use patterns by a female lesser mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Am J Primatol* 37: 317-324, 1995.

38. **Csada RD, and Brigham RM**. Reproduction contrains the use of daily torpor by freeranding common poorwills (*Phalaenoptilus nuttallii*). *J Zool* 234: 209-216, 1994. 39. **Dark J**. Annual lipid cycles in hibernators: Integration of physiology and behavior. *Annu Rev Nutr* 25: 20.21-20.29, 2005.

40. **Darrow JM, Duncan MJ, Bartke A, Bona-Gallo A, and Goldman BD**. Influence of photoperiod and gonadal steroids on hibernation in the European hamster. *J Comp Physiol* 163: 339-348, 1988.

41. **Dausmann KH, Glos J, Ganzhorn JU, and Heldmaier G**. Hibernation in the tropics: lessons from a primate. *J Comp Physiol B* 175: 147-155, 2005.

42. **Dausmann KH, Glos J, Ganzhorn JU, and Heldmaier G**. Physiology: hibernation in a tropical primate. *Nature* 429: 825-826, 2004.

43. **Drew KL, Buck CL, Barnes BM, Christian SL, Rasley BT, and Harris MB**. Central nervous system regulation of mammalian hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. *J Neurochem* 102: 1713-1726, 2007.

44. **Drew KL, Osborne PG, Frerichs KU, Hu Y, Koren RE, Hallenbeck JM, and Rice ME**. Ascorbate and glutathione regulation in hibernating ground squirrels. *Brain Res* 851: 1-8, 1999.

45. **Drew KL, Toien O, Rivera PM, Smith MA, Perry G, and Rice ME**. Role of the antioxidant ascorbate in hibernation and warming from hibernation. *Comp Biochem Physiol C* 133: 483-492, 2002.

46. **Dulloo AG, Jacquet J, and Montani JP**. Pathways from weight fluctuations to metabolic diseases: focus on maladaptive thermogenesis during catch-up fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 Suppl 2: S46-57, 2002.

47. **Dutrillaux B, and Rumpler Y**. Phylogenetic relations among prosimii with special reference to lemuriformes and Malagasy nocturals. *Creatures of the Dark: the Noctural Prosimians*. Edited by L. Alterman et al., Plenum Press, New York: 141-150, 1995.

48. **Eberle M, and P.M. K**. Selected polyandry: female choice and inter-sexual conflict in a small nocturnal solitary primate (*Microcebus murinus*). *Behav Ecol Sociobiol* 57: 91-100, 2004.

49. Ehrhardt N, Heldmaier G, and Exner C. Adaptive mechanisms during food restriction in *Acomys russatus*: the use of torpor for desert survival. *J Comp Physiol B* 175: 193-200, 2005.

50. **El Hachimi Z, Tijane M, Boissonnet G, Benjouad A, Desmadril M, and Yon JM**. Regulation of the skeletal muscle metabolism during hibernation of *Jaculus orientalis*. *Comp Biochem Physiol B* 96: 457-459, 1990.

51. Entenman C, Ackerman PD, Walsh J, and Musacchia XJ. Effect of incubation temperature on hepatic palmitate metabolism in rats, hamsters and ground squirrels. *Comp Biochem Physiol B* 50: 51-54, 1975.

52. Exner C, Hebebrand J, Remschmidt H, Wewetzer C, Ziegler A, Herpertz S, Schweiger U, Blum WF, Preibisch G, Heldmaier G, and Klingenspor M. Leptin suppresses semi-starvation induced hyperactivity in rats: implications for anorexia nervosa. *Mol Psych* 5: 476-481, 2000.

53. Fietz J. Body mass in wild *M. murinus* over the dry season. *Int J Primatol* 69: 183-190, 1998.

54. Fietz J. Mating system of *Microcebus murinus*. *Am J Primatol* 48: 127-133, 1999.

55. Fietz J, Dausmann KH, and Tataruch F. Fat accumulation and composition in a tropical hibernator *Cheirogaleus medius*. *Int J Primatol* 72: 153-194, 2001.

56. **Fietz J, and Ganzhorn JU**. Feeding ecology of the hibernating primate *Cheirogaleus medius*: How does it get so fat? *Oecologia* 121: 157-164, 1999.

57. Fietz J, Tataruch F, Dausmann KH, and Ganzhorn JU. White adipose tissue composition in the free-ranging fat-tailed dwarf lemur (*Cheirogaleus medius*; Primates), a tropical hibernator. *J Comp Physiol B* 173: 1-10, 2003.

58. Flint A, Raben A, Rehfeld JF, Holst JJ, and Astrup A. The effect of glucagon-like peptide-1 on energy expenditure and substrate metabolism in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 288-298, 2000.

59. Florant GL, Hester L, Ameenuddin S, and Rintoul DA. The effect of a low essential fatty acid diet on hibernation in marmots. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 264: R747-R753, 1993.

60. Florant GL, Nuttle LC, Mullinex DE, and Rintoul DA. Plasma and white adipose tissue lipid composition in marmots. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 258: R1123-R1131, 1990.

61. **Frank CL**. The influence of dietary fatty acids on hibernation by Golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Physiol Zool* 65: 906-920, 1992.

62. Frank CL, Brooks SP, Harlow HJ, and Storey KB. The influence of hibernation patterns on the critical enzymes of lipogenesis and lipolysis in prairie dogs. *Exp Biol Online* 3: 9, 1998.

63. Frank CL, Dierenfeld ES, and Storey KB. The relationship between lipid peroxidation, hibernation, and food selection in mammals. *Amer Zool* 38: 341-349, 1998.

64. Frank CL, Karpovich S, and Barnes BM. Dietary fatty acid composition and the hibernation patterns in free-ranging arctic ground squirrels. *Physiol Biochem Zool* 81: 486-495, 2008.

65. Frank CL, and Storey KB. The optimal depot fat composition for hibernation by golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *J Comp Physiol B* 164: 536-542, 1995.

66. Freeman DA, Lewis DA, Kauffman AS, Blum RM, and Dark J. Reduced leptin concentrations are permissive for display of torpor in Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R97-R103, 2004.

67. Frerichs KU, Smith CB, Brenner M, DeGracia DJ, Krause GS, Marrone L, Dever TE, and Hallenbeck JM. Suppression of protein synthesis in brain during hibernation involves inhibition of protein initiation and elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14511-14516, 1998.

68. **Galster W, and Morrison PR**. Gluconeogenesis in arctic ground squirrels between periods of hibernation. *Am J Physiol* 228: R325-R330, 1975.

69. **Galster WA, and Morrison P**. Cyclic changes in carbohydrate concentrations during hibernation in the arctic ground squirrel. *Am J Physiol* 218: R1228-R1232, 1970.

70. **Ganzhorn JU, and Schmid J**. Different population dynamics of *Microcebus murinus* in primary and secondary deciduous dry forest of Madagascar. *Int J Primatol* 19: 785-796, 1998.

71. Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Mason MM, Castle AL, Refetoff S, Vinson C, and Reitman ML. Torpor in mice is induced by both leptin-dependent and - independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14623-14628, 1999.

72. **Geiser F**. Evolution of daily torpor and hibernation in birds and mammals: importance of body size. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25: 736-739, 1998.

73. **Geiser F**. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol* 66: 239-274, 2004.

74. **Geiser F**. Reduction of metabolism during hibernation and daily torpor in mammals and birds: temperature effect or physiological inhibition? *J Comp Physiol B* 158: 25-37, 1988.

75. Geiser F, and Kenagy GJ. Dietary fats and torpor patterns in hibernating ground squirrels. *Can J Zool* 71: 1182-1186, 1993.

76. **Geiser F, and Kenagy GJ**. Polyunsaturated lipid diet lengthens torpor and reduces body temperature in a hibernator. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 252: R897-R901, 1987.

77. **Geiser F, and Kenagy GJ**. Torpor duration in relation to temperature and metabolism in hibernating ground squirrels. *Physiol Zool* 61: 422-449, 1988.

78. Geiser F, Kortner G, and Schmidt I. Leptin increases energy expenditure of a marsupial by inhibition of daily torpor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 275: R1627-R1632, 1998.

79. Geiser F, McAllan BM, Kenagy GJ, and Hiebert SM. Photoperiod affects daily torpor and tissue fatty acid composition in deer mice. *Die Naturwissenschaften* 94: 319-325, 2007.

80. Geiser F, and Ruf T. Hibernation versus daily torpor in mammals and birds: physiological variables and classification of torpor patterns. *Physiol Zool* 68: 935-966, 1995.

81. **Genin F**. Life in unpredictable environments: first investigation of the natural history of *Microcebus griseorufus*. *Int J Primatol* 29: 303-321, 2008.

82. Genin F, Nibbelink M, Galand M, Perret M, and Ambid L. Brown fat and nonshivering thermogenesis in the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R811-R818, 2003.

83. Genin F, and Perret M. Daily hypothermia in captive grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*): effects of photoperiod and food restriction. *Comp Biochem Physiol B* 136: 71-81, 2003.

84. **Genin F, and Perret M**. Photoperiod-induced changes in energy balance in gray mouse lemurs. *Physiol Behav* 71: 315-321, 2000.

85. Genin F, Schilling A, and Claustrat B. Melatonin and methimazole mimic shortday-induced fattening in gray mouse lemurs. *Physiol Behav* 79: 553-559, 2003.

86. **Gluck EF, Stephens N, and Swoap SJ**. Peripheral ghrelin deepens torpor bouts in mice through the arcuate nucleus neuropeptide Y signaling pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1303-R1309, 2006.

87. Goldman BD, Darrow JM, Duncan MJ, and Yogev L. Photoperiod, reproductive hormones, and winter torpor in three hamster species. *In Living in the Cold: Physiological and Biochemical Adaptations*. Edited by CH Heller, XJ Musacchia and LCH Wang, New York, Elsevier 341-350, 1986.

88. **Goodman SM**. A review of predation on lemurs: implication for the evolution of social behavior in small, nocturnal primates. *In: Lemur social systems and their ecological basis*. Edited by PM Kappeler, JU Ganzhorn, New York, Plenum Press 51-66, 1993.

89. **Goodman SM**. Predation on lemurs. *In: The Natural History of Madagascar*. Edited by SM Goodman & JP Benstead 1221-1228, 2003.

90. **Gordon CJ, Becker P, and Ali JS**. Behavioral thermoregulatory responses of singleand group-housed mice. *Physiol Behav* 65: 255-262, 1998.

91. Green CJ, Brosnan JT, Fuller BJ, Lowry M, Stubbs M, and Ross BD. Effect of hibernation on liver and kidney metabolism in 13-lined ground squirrels. *Comp Biochem Physiol B* 79: 167-171, 1984.

92. Gutman R, Choshniak I, and Kronfeld-Schor N. Defending body mass during food restriction in *Acomys russatus*: a desert rodent that does not store food. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R881-R891, 2006.

93. **Haim A, McDevitt RM, and J.R. S**. Thermoregulatory responses to manipulations of photoperiod in wood mice *Apodemus sylvaticus* from high latitudes (57°N). *J Therm Biol* 20: 437-443, 1995.

94. **Hannon JP, Vaughan DA, and Hock RJ**. The endogenous tissue respiration of the Arctic ground squirrel as affected by hibernation and season. *J Cell Comp Physiol* 57: 5-10, 1961.

95. Harlow HJ, and Frank CL. The role of dietary fatty acids in the evolution of spontaneous and facultative hibernation patterns in prairie dogs. *J Comp Physiol B* 171: 77-

84, 2001.

96. Harlow HJ, Lohuis T, Beck TD, and Iaizzo PA. Muscle strength in overwintering bears. *Nature* 409: 997, 2001.

97. Harris MB, and Milsom WK. Parasympathetic influence on heart rate in euthermic and hibernating ground squirrels. *J Exp Biol* 198: 931-937, 1995.

98. Heldmaier G, Klingenspor M, Werneyer M, Lampi BJ, Brooks SP, and Storey KB. Metabolic adjustments during daily torpor in the Djungarian hamster. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276: E896-E906, 1999.

99. Heldmaier G, and Steinlechner S. Seasonal control of energy requirements for thermoregulation in the djungarian hamster (*Phodopus sungorus*), living in natural photoperiod. *J Comp Physiol B* 142: 429-437, 1981.

100. Heller HC, Colliver GW, and Bread J. Thermoregulation during entrance into hibernation. *Pflugers Arch* 369: 55-59, 1977.

101. Hershey JD, Robbins CT, Nelson OL, and Lin DC. Minimal seasonal alterations in the skeletal muscle of captive brown bears. *Physiol Biochem Zool* 81: 138-147, 2008.

102. **Hladik CM**. The dry forest of West coast of Madagascar: climate, phenology and food available for prosimians. *In: Nocturnal Malagasy Primates: Ecology, Physiology and Behaviour*. Edited by P Charles-Dominique, HM Cooper, G Pariente, CM Hladik, A Petter-Rousseaux, JJ Petter, Academic Press, New York 1-40, 1980.

103. Hladik CM, Charles-Dominique P, and Petter JJ. Feeding strategies of five noturnal prosimians in the dry forest of the West coast of Madagascar. *In: Nocturnal Malagasy Primates: Ecology, Physiology and Behaviour.* Edited by P Charles-Dominique, HM Cooper, G Pariente, CM Hladik, A Petter-Rousseaux, JJ Petter, Academic Press, New York 41-73, 1980.

104. Hori T, Yamasaki M, Asami T, Koga H, and Kiyohara T. Responses of anterior hypothalamic-preoptic thermosensitive neurons to thyrotropin releasing hormone and cyclo(His-Pro). *Neuropharm* 27: 895-901, 1988.

105. **Humphries MM, Kramer DL, and Thomas DW**. The role of energy availability in Mammalian hibernation: an experimental test in free-ranging eastern chipmunks. *Physiol Biochem Zool* 76: 180-186, 2003.

106. **Humphries MM, Thomas DW, and Kramer DL**. The role of energy availability in Mammalian hibernation: a cost-benefit approach. *Physiol Biochem Zool* 76: 165-179, 2003.

107. **Ingram JC, and Dawson TP**. Climate change impacts and vegetation response on the island of Madagascar. *Philo Trans* 363: 55-59, 2005.

108. **IPCC**. Climate Change 2007: Fourth Assessment Report. Intergovernmental Panel on Climate Change, Geneva, Switzerland. 2007.

109. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, and O'Rahilly S. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohomone convertase 1 gene. *Nature Genetics* 16: 303–306, 1997.

110. Jury MR, and Patack B. A study of climate and weather variability over the tropical southwest Indian Ocean. *Meteor Atm Phys* 47: 37-48, 2005.

111. Kalderon B, Mayorek N, Berry E, Zevit N, and Bar-Tana J. Fatty acid cycling in the fasting rat. *Am J Physiol Endocrinol Metabo* 279: E221-E227, 2000.

112. Kappeler PM. Ecologie des microcèbes. Primatologie 3: 145-171, 2000.

113. **Kappeler PM**. Nests, tree holes, and the evolution of primate life histories. *Am J Primatol* 46: 7-33, 1998.

114. Karmann H, Mrosovsky N, Heitz A, and Le Maho Y. Protein sparing on very low calorie diets: ground squirrels succeed where obese people fail. *Int J Obes Relat Metab Disord* 18: 351-353, 1994.

115. **Kay RF**. On the use of anatomical features to infer foraging behavior in extinct primates. *In: Adaptations for foraging in non-human primates, contribution to an organismal biology of prosimians, monkeys and apes.* Edited by PS Rodman and JGH Cant, Colombia University Press, New York 21-53, 1984.

116. **Kilduff TS, Krilowicz B, Milsom WK, Trachsel L, and Wang LC**. Sleep and mammalian hibernation: homologous adaptations and homologous processes? *Sleep* 16: 372-386, 1993.

117. **Kilduff TS, Radeke CM, Randall TL, Sharp FR, and Heller HC**. Suprachiasmatic nucleus: phase-dependent activation during the hibernation cycle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 257: R605-R612, 1989.

118. Kirsch R, Ouarour A, and Pevet P. Daily torpor in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*): photoperiodic regulation, characteristics and circadian organization. *J Comp Physiol A* 168: 121-128, 1991.

119. Klain GJ, and Whitten BK. Carbon dioxide fixation during hibernation and arousal from hibernation. *Comp Biochem Physiol* 25: 363-366, 1968.

120. Klingenspor M, Niggemann H, and Heldmaier G. Modulation of leptin sensitivity by short photoperiod acclimation in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *J Comp Physiol B* 170: 37-43, 2000.

121. Körtner G, and Heldmaier G. Body weight cycles and energy balance in the alpine marmot (*Marmota marmota*). *Physio Zool* 68: 149-163, 1995.

122. Kortner G, Song X, and Geiser F. Rhythmicity of torpor in a marsupial hibernator, the mountain pygmy-possum (*Burramys parvus*), under natural and laboratory conditions. *J Comp Physiol B* 168: 631-638, 1998.

123. Kraus C, Eberle M, and Kappeler PM. The costs of risky male behaviour: sex differences in seasonal survival in a small sexually monomorphic primate. *Proceedings* 275: 1635-1644, 2008.

124. **Krilowicz BL**. Ketone body metabolism in a ground squirrel during hibernation and fasting. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 249: R462-R470, 1985.

125. Lahann P. Habitat utilization of three sympatric Cheirogaleid lemur species in a littoral rain forest of Southeastern Madagascar. *Int J Primatol* 29: 117-134, 2008.

126. Lahann P. Life history variation of *Microcebus murinus* in different regions of Madagascar. *Rostock*, 2003.

127. Lahann P, Schmid J, and Ganzhorn JU. Geographic variation in populations of *Microcebus murinus* in Madagascar: ressource seasonality or Bergmann's rule? *Int J Primatol* 27: 983-999, 2006.

128. Li XS, and Wang DH. Regulation of body weight and thermogenesis in seasonally acclimatized Brandt's voles (*Microtus brandti*). *Hormones and behavior* 48: 321-328, 2005.

129. Lohuis TD, Beck TDI, and Harlow HJ. Hibernating black bears have blood chemistry and plasma amino acid profiles that are indicative of long-term adaptative fasting. *Can J Zool* 83: 1257-1263, 2005.

130. Lohuis TD, Harlow HJ, and Beck TD. Hibernating black bears (*Ursus americanus*) experience skeletal muscle protein balance during winter anorexia. *Comp Biochem Physiol B* 147: 20-28, 2007.

131. Lohuis TD, Harlow HJ, Beck TD, and Iaizzo PA. Hibernating bears conserve muscle strength and maintain fatigue resistance. *Physiol Biochem Zool* 80: 257-269, 2007.

132. Louis EE, Coles MS, Andriantompohavana R, Sommer JA, Engberg SE, R. ZJ, Mayor MI, and Brenneman RA. Revision of the mouse lemurs (*Microcebus*) of Eastern Madagascar. *Int J Primatol* 27: 347-389, 2006.

133. **Lovegrove BG**. The influence of climate on the basal metabolic rate of small mammals: a slow-fast metabolic continuum. *J Comp Physiol B* 173: 87-112, 2003.

134. Lovegrove BG. The low basal metabolic rates of marsupials: the influence of torpor and zoogeography. *In: Adaptations to the cold: Tenth international Hibernation Symposium Armidale*. Edited by F Geiser, AJ Hulbert, SC Nicol SC, University of New England Press 141-151, 1996.

135. Lovegrove BG, and Raman J. Torpor patterns in the pouched mouse (*Saccostomus campestris*; *Rodentia*): a model animal for unpredictable environments. *J Comp Physiol B* 168: 303-312, 1998.

136. Lovegrove BG, Raman J, and Perrin MR. Daily torpor in elephant shrews (*Macroscelidea*: *Elephantulus spp.*) in response to food deprivation. J Comp Physiol B 171: 11-21, 2001.

137. Lundberg DA, Nelson RA, Wahner HW, and Jones JD. Protein metabolism in the black bear before and during hibernation. *Mayo Clinic proc* 51: 716-722, 1976.

138. Lyman CP. The hibernating state. *In: Recent theories on hibernation*, Academic Press, New York 12-53, 1982.

139. Lyman CP, and O'Brien RC. Autonomic Control of Circulation During the Hibernating Cycle in Ground Squirrels. *J Physiol* 168: 477-499, 1963.

140. Lyman CP, O'Brien RC, Greene GC, and Papafrangos ED. Hibernation and longevity in the Turkish hamster *Mesocricetus brandti*. *Science* 212: 668-670, 1981.

141. Lyman CP, Willis JS, Malan A, and Wang LCH. Hibernation and torpor in mammals and birds. New York, Academic Press. 1982.

142. **Martin RD**. A preliminary field-study of the lesser mouse lemur (*Microcebus murinus* J.F. Miller 1777). *Zeitschrift Für Tierpsychologie* Suppl. 9: 42-70, 1972.

143. **Martin RD**. A review of the behavior and ecology of the lesser mouse lemur (*Microcebus murinus*). *In: Comparative ecology and behavior of primates*. Edited by RP Michael, JH Crooks, Academic, London 1-68, 1973.

144. Martin RD. Origins, diversity and relationships of lemurs. Int J Primatol 21: 2000.

145. **Masoro EJ, and Austad SN**. The evolution of the antiaging action of dietary restriction: a hypothesis. *J Gerontol A* 51: 387-391, 1996.

146. **McBride BW, and Kelly JM**. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: a review. *J Anim Sci* 68: 2997-3010, 1990.

147. McKechnie AE, and Lovegrove BG. Thermoregulation and the energetic significance of clustering behavior in the white-backed mousebird (*Colius colius*). *Physiol Biochem Zool* 74: 238-249, 2001.

148. **Mercer JG**. Regulation of appetite and body weight in seasonal mammals. *Comp Biochem Physiol C* 119: 295-303, 1998.

149. **Miller LP, and Hsu C**. Therapeutic potential for adenosine receptor activation in ischemic brain injury. *J Neurotrauma* 9(2): S563-577, 1992.

150. Milsom WK, Zimmer MB, and Harris MB. Regulation of cardiac rhythm in hibernating mammals. *Comparative biochemistry and physiology* 124: 383-391, 1999.

151. Mittermeier RA, Konstant WR, Hawkins F, Louis EE, Legrand O, Ratsimbafatsy J, Rasoloarison RM, Ganzhorn JU, Rajaobelina S, Tattersall I, and Meyer DM. Lemurs of Madagascar. Conservation International Washington. 1994.

152. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, and O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe earlyonset obesity in humans. *Nature* 387: 903-908, 1997.

153. Morgan PJ, and Mercer JG. The regulation of body weight: lessons from the seasonal animal. *Proc Nutr Soc* 60: 127-134, 2001.

154. Mougin JL. Observations écologiques à la colonie de manchots empereurs de Pointe

Géologie (Terre Adélie) en 1964. L'oiseau et la RFO 36: 167-226, 1966.

155. **Mrosovsky N**. Circannual cycles in golden-mantled ground squirrels: experiments with food deprivation and effects of temperature on periodicity. *J Comp Physiol* 136: 355-360, 1980.

156. **Muller AE, and Thalmann U**. Origin and evolution of primate social organisation: a reconstruction. *Biol Rev Camb Philos Soc* 75: 405-435, 2000.

157. **Munro D, and Thomas DW**. The role of polyunsaturated fatty acids in the expression of torpor by mammals: a review. *Zoology* 107: 29-48, 2004.

158. **Murphy KG, and Bloom SR**. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 444: 854-859, 2006.

159. **Mzilikazi N, and Lovegrove BG**. Daily torpor in free-ranging rock elephant shrews, *Elephantulus myurus*: a year-long study. *Physiol Biochem Zool* 77: 285-296, 2004.

160. **Mzilikazi N, and Lovegrove BG**. Reproductive activity influences thermoregulation and torpor in pouched mice, *Saccostomus campestris*. *J Comp Physiol B* 172: 7-16, 2002.

161. Nagy TR, Gower BA, and Stetson MH. Photoperiod effects on body mass, body composition, growth hormone, and thyroid hormones in male collared lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*). *Can J Zool* 72: 1726-1734, 1995.

162. **Nelson RA**. Urea metabolism in the hibernating black bear. *Kidney international* 177-179, 1978.

163. Nelson RA, Wahner HW, Jones JD, Ellefson RD, and Zollman PE. Metabolism of bears before, during, and after winter sleep. *Am J Physiol* 224: R491-R496, 1973.

164. **Okamoto I, Kayano T, Hanaya T, Arai S, Ikeda M, and Kurimoto M**. Upregulation of an extracellular superoxide dismutase-like activity in hibernating hamsters subjected to oxidative stress in mid- to late arousal from torpor. *Comp Biochem Physiol C* 144: 47-56, 2006.

165. Olivieri G, Zimmermann E, Randrianambinina B, Rasoloharijaona S, Rakotondravony D, Guschanski K, and Radespiel U. The ever-increasing diversity in mouse lemurs: three new species in north and northwestern Madagascar. *Mol Phylogen Evol* 43: 309-327, 2007.

166. **Olsson SO**. Comparative studies on the temperature dependence of lactic and malic dehydrogenase from a homeotherm, guinea pig (*Cavia porcellus*); two hibernators, hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and bat (*Nyctalus noctula*); and two poikilotherms, frog (*Rana temporaria*) and cod (*Gadus callarias*). *Comp Biochem Physiol B* 51: 5-18, 1975.

167. Ortmann S, and Heldmaier G. Regulation of body temperature and energy requirements of hibernating alpine marmots (*Marmota marmota*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R698-R704, 2000.

168. Ortmann S, Heldmaier G, Schmid J, and Ganzhorn JU. Spontaneous daily torpor in Malagasy mouse lemurs. *Die Naturwissenschaften* 84: 28-32, 1997.

169. Ortmann S, Schmid J, Ganzhorn JU, and Heldmaier G. Body temperature and torpor in a Malagasy small primate, the mouse lemur. *In: Adaptation to the cold: Tenth Hibernation Symposium* 55-61, 1996.

170. **Ouarour A, Kirsch R, and Pevet P**. Effects of temperature, steroids and castration on daily torpor in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Comp Physiol* 168: 477-481, 1991.

171. **Overton JM, and Williams TD**. Behavioral and physiologic responses to caloric restriction in mice. *Physiol Behav* 81: 749-754, 2004.

172. **Pagès-Feuillade E**. Modalités de l'occupation de l'espace et relations interindividuelles chez un prosimien nocturne malgache (*Microcebus murinus*). *Int J Primatol* 50: 204-220, 1988.

173. Pariente GF. The role of vision in prosimian behavior. In: The study of prosimian

behaviour. Edited by G A Doyle and R D Martin, London, Academic Press 411-459, 1979.

174. **Pastukhov YF**. REM sleep as a criterion of temperature comfort and temperature homeostasis "well-being" in euthermic and hibernating mammals. *An New York Acad Sciences* 813: 71-72, 1997.

175. **Paul MJ, Freeman DA, Park JH, and Dark J**. Neuropeptide Y induces torpor-like hypothermia in Siberian hamsters. *Brain Res* 1055: 83-92, 2005.

176. **Paulsrud JR, and Dryer RL**. Circum-annual changes in triglyceride fatty acids of bat brown adipose tissue. *Lipids* 3: 340-345, 1968.

177. **Perreira ME, Strohecker RA, Cavigelli SA, Hughes CL, and Pearson DD**. Metabolic strategy and social behavior in *Lemuridae*. *In: New directions in lemur studies*. Edited by B Rakotosamimanana, H Rasaminanana, JU Ganzhorn, SM Goodman, New York, Kluwer Ademic, Plenum 93-118, 1999.

178. **Perret M**. Change in photoperiodic cycle affects life span in a prosimian primate (*Microcebus murinus*). *J Biol Rhythms* 12: 136-145, 1997.

179. **Perret M**. Chemocommunication in the reproductive behavior of mouse lemurs. *In: Creatures of the dark.* Edited by L Alterman, GA Doyle and MK Izard, Plenum Press 1995.

180. **Perret M**. Diurnal variations in plasma testosterone concentrations in the male lesser mouse lemur (*Microcebus murinus*). *J Repro Fert* 74: 205-213, 1985.

181. **Perret M**. Energetic advantage of nest-sharing in a solitary primate, the lesser mouse lemur (*Microcebus murinus*). *J Mammal* 79: 1095-1102, 1998.

182. **Perret M**. Environmental and social determinants of sexual function in the male lesser mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Int J Primatol* 59: 1-25, 1992.

183. **Perret M**. Influence du groupement social sur l'activité sexuelle saisonnière chez le mâle de *Microcebus murinus*. *Zeitschrift Für Tierpsychologie* 43: 159-179, 1977.

184. **Perret M**. Influence of social factors on sex ratio at birth, maternal investment and young survival in a prosimian primate. *Behav Ecol Sociobiol* 27: 447-454, 1990.

185. **Perret M, and Aujard F**. Daily hypothermia and torpor in a tropical primate: synchronization by 24-h light-dark cycle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1925-R1933, 2001.

186. **Perret M, Aujard F, and Vannier G**. Critical role of daylength in energy balance in a non human primate. *Biological clocks, mechanisms and applications* 415-418, 1998.

187. **Perret M, Aujard F, and Vannier G**. Influence of daylength on metabolic rate and daily water loss in the male prosimian primate *Microcebus murinus*. *Comp Biochem Physiol* 119: 981-989, 1998.

188. **Perret M, and Schilling A**. Intermale sexual effect elicited by volatile urinary ether extract in *M. murinus*. *J Chem Ecol* 13: 495-507, 1987.

189. **Perret M, and Schilling A**. Sexual responses to urinary chemosignals depend on photoperiod in a male primate. *Physiol Behav* 58: 633-639, 1995.

190. **Petrovic VM, and Rajcic O**. Effect of cold exposure and ACTH on RNA, DNA and protein content in adrenal and liver of rats and ground squirrels. *Fed Proceed* 28: 1247-1250, 1969.

191. **Petter JJ, Albignac R, and Rumpler Y**. Mammifères lémriens (Primates, prosimiens). *In: Faunes de Madagascar,* Paris, Orstom 44: 1977.

192. **Petter-Rousseaux A**. Annual variations in the plasma thyroxine level in *Microcebus murinus. Gen Comp Endocrinol* 55: 405-409, 1984.

193. **Petter-Rousseaux A**. Seasonal activity rhythms, reproduction, and body weight variations in five sympatric nocturnal prosimians in simulated climatic conditions. *In Nocturnal Malagasy Primates: Ecology, Physiology and Behaviour*. Edited by P Charles-Dominique, HM Cooper, A Hladik, E Pagès, GF Pariente, A Petter-Rousseaux, JJ Petter and

A Schilling, New York Academic, 1980.

194. **Prévost J.** Ecologie du manchot empereur. *In: Expéditions polaires françaises,* Hermann Press, Paris 1-204, 1961.

195. **Prévost J, and Sapin-Jaloustre J**. A propos des premières mesures de topographie thermique chez les Sphéniscidés de la Terre Adélie. *L'oiseau et la RFO* 34: 52-90, 1964.

196. **Racey PA, and Stephenson PJ**. Reproductive and energetic differentiation of the Tenrencidae of Madagascar. *In: Biogéographie de Madagascar*. Edited WR Lourenço, Paris, Orstom 307-319, 1996.

197. **Radespiel U.** Sociality in the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*) in northwestern Madagascar. *Am J Primatol* 51: 21-40, 2000.

198. Radespiel U, Cepok S, Zietemann V, and Zimmermann E. Sex-specific usage patterns of sleeping sites in grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*) in northwestern Madagascar. *Am J Primatol* 46: 77-84, 1998.

199. **Radespiel U, Reimann W, Rahelinirina M, and Zimmermann E**. Feeding ecology of sympatric mouse lemur species in northwestern Madagascar. *Int J Primatol* 27: 311-321, 2006.

200. Radespiel U, Sarikaya Z, and Zimmermann E. Sociogenetic structure in a freeliving noctunal primate population: sex-specific differences in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Behav Ecol Sociobiol* 50: 493-502, 2001.

201. **Radespiel U, and Zimmermann E**. Female dominance in captive gray mouse lemurs (*Microcebus murinus*). *Am J Primatol* 54: 181-192, 2001.

202. Randrianambinina B, Rakotondravony D, Radespiel U, and Zimmermann E. Seasonal changes in general activity, body mass and reproduction of two small nocturnal primates: a comparison of the golden brown mouse lemur (*Microcebus ravelobensis*) in Northwestern Madagascar and the brown mouse lemur (*Microcebus rufus*) in Eastern Madagascar. *Primates* 44: 321-331, 2003.

203. **Rasoazanabary E**. Male and female activity patterns in *Microcebus murinus* during the dry season at Kirindy forest, Western Madagascar. *Int J Primatol* 27: 437-464, 2006.

204. **Rasoloarison RM, Goodman SM, and U. GJ**. Taxonomic revison of mouse lemurs (*Microcebus*) in the western portions of Madagascar. *Int J Primatol* 21: 963-1019, 2000.

205. **Ruby NF, Dark J, Heller HC, and Zucker I**. Suprachiasmatic nucleus: role in circannual body mass and hibernation rhythms of ground squirrels. *Brain Res* 782: 63-72, 1998.

206. **Ruby NF, Nelson RJ, Licht P, and Zucker I**. Prolactin and testosterone inhibit torpor in Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 264: R123-R128, 1993.

207. **Ruby NF, and Zucker I**. Daily torpor in the absence of the suprachiasmatic nucleus in Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 263: R353-R362, 1992.

208. **Ruf T, Klingenspor M, Preis H, and Heldmaier G**. Daily torpor in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*): interactions with food intake, acivity, and social behaviour. *J Comp Physiol B* 160: 609-615, 1991.

209. **Ruf T, Stieglitz A, Steinlechner S, Blank JL, and Heldmaier G**. Cold exposure and food restriction facilitate physiological responses to short photoperiod in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J Exp Zool* 267: 104-112, 1993.

210. Saarela S, and Reiter RJ. Function of melatonin in thermoregulatory processes. *Life Sci* 54: 295-311, 1994.

211. Sarajas HS, and Oja SS. Effect of anesthesia and-or hypothermia on cerebral free amino acids in young rats. *Devel Psychobiol* 6: 385-392, 1973.

212. Schilling A. Organisation des sens et communication chez le Microcèbe. *Primatologie* 3: 85-143, 2000.

213. Schilling A, and Perret M. Chemical signals and reproductive capacity in a male

prosimian primate. Chem Senses 12: 143-158, 1987.

214. Schilling A, Perret M, and Predine J. Sexual inhibition in a prosimian primate: a pheromone-like effect. *J Endocrinol* 102: 143-151, 1984.

215. Schmid J. Daily torpor in the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*) in Madagascar: energetic consequences and biological significance. *Oecologica* 123: 175-183, 2000.

216. Schmid J. Oxygen consumption and torpor in mouse lemurs (*Microcebus murinus* and *M. myoxinus*): Preliminary results of a study in western Madagascar. In: Adaptations to the cold: Tenth international Hibernation Symposium, Armidale. Edited by F Geiser, AJ Hulbert, SC Nicol, University of New England Press 47-54, 1996.

217. Schmid J. Sex-specific differences in activity patterns and fattening in the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*) in Madagascar. *J Mammal* 80: 749-757, 1999.

218. Schmid J. Torpor in the tropics: the case of the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Bas Appl Ecol* 1: 133-139, 2000.

219. Schmid J. Tree holes used for resting by gray mouse lemurs (*Microcebus murinus*) in Madagascar: insulation capacities and energetic consequences. *Int J Primatol* 19: 797-809, 1998.

220. Schmid J, and Kappeler PM. Fluctuating sexual dimorphism and differential hibernation by sex in a primate, the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Behav Ecol Sociobiol* 43: 125-132, 1998.

221. Schmid J, and Kappeler PM. Sympatric mouse lemurs (*Microcebus spp.*) in western Madagascar. *Int J Primatol* 63: 162-170, 1994.

222. Schmid J, Ruf T, and Heldmaier G. Metabolism and temperature regulation during daily torpor in the smallest primate, the pygmy mouse lemur (*Microcebus myoxinus*) in Madagascar. *J Comp Physiol B* 170: 59-68, 2000.

223. Schmid J, and Speakman JR. Daily energy expenditure of the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*): a small primate that uses torpor. *J Comp Physiol B* 170: 633-641, 2000.

224. Seguy M, and Perret M. Factors affecting the daily rhythm of body temperature of captive mouse lemurs (*Microcebus murinus*). *J Comp Physiol B* 175: 107-115, 2005.

225. **Shanley DP, and Kirkwood TB**. Caloric restriction does not enhance longevity in all species and is unlikely to do so in humans. *Biogerontol* 2006.

226. Shiomi H, and Tamura Y. Pharmacological aspects of mammalian hibernation: central thermoregulation factors in hibernation cycle. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 116: 304-312, 2000.

227. Shousha S, Nakahara K, Nasu T, Sakamoto T, and Murakami N. Effect of glucagon-like peptide-1 and -2 on regulation of food intake, body temperature and locomotor activity in the Japanese quail. *Neurosci Letters* 415: 102-107, 2007.

228. **Song X, and Geiser F**. Daily torpor and energy expenditure in *Sminthopsis macroura*: interactions between food and water availability and temperature. *Physiol Zool* 70: 331-337, 1997.

229. Song X, Kortner G, and Geiser F. Temperature selection and use of torpor by the marsupial *Sminthopsis macroura*. *Physiol Behav* 64: 675-682, 1998.

230. Song X, Kortner G, and Geiser F. Thermal relations of metabolic rate reduction in a hibernating marsupial. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: R2097-R2104, 1997.

231. Soukri A, Hafid N, Valverde F, Elkebbaj MS, and Serrano A. Evidence for a posttranslational covalent modification of liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in hibernating jerboa (*Jaculus orientalis*). *Biochim Biophys Acta* 1292: 177-187, 1996.

232. Soukri A, Valverde F, Hafid N, Elkebbaj MS, and Serrano A. Occurrence of a differential expression of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in muscle and

liver from euthermic and induced hibernating jerboa (*Jaculus orientalis*). *Gene* 181: 139-145, 1996.

233. **Speakman JR**. The cost of living : field metabolic rates of small mammals. *Adv Ecol Res* 30: 177-297, 2000.

234. **Steinlechner S, Heldmaier G, and Becker H**. The seasonal cycle of body weight in the djungarian hamster: photoperiodic control and the influence of starvation and melatonin. *Oecologia* 60: 401-405, 1983.

235. Stephenson PJ, and Racey PA. Resting metabolic rate and reproduction in the Insectivora. *Comp Biochem Physiol* 112: 215-223, 1995.

236. Strijkstra AM, and Daan S. Sleep during arousal episodes as a function of prior torpor duration in hibernating European ground squirrels. *J Sleep Res* 6: 36-43, 1997.

237. **Tamura Y, Shintani M, Nakamura A, Monden M, and Shiomi H**. Phase-specific central regulatory systems of hibernation in Syrian hamsters. *Brain Res* 1045: 88-96, 2005.

238. **Tannenbaum MG, Reiter RJ, Vaughan MK, Troiani ME, and Gonzalez-Brito A**. Effects of short-term cold exposure on pineal biosynthetic function in rats. *Cryobiology* 25: 227-232, 1988.

239. Tashima LS, Adelstein SJ, and Lyman CP. Radioglucose utilization by active, hibernating, and arousing ground squirrels. *Am J Physiol* 218: R303-R309, 1970.

240. **Tattersall I**. Madagascar's lemurs: cryptic diversity or taxonomic inflation? *Evol Anthropol* 16: 12-23, 2007.

241. **Tattersall I**. The primates of Madagascar. New York: Columbia University Press, 1982.

242. **Thorp CR, Ram PK, and Florant GL**. Diet alters metabolic rate in the Yello-bellied marmot (*Marmota flaviventris*) during hibernation. *Physiol Zool* 67: 1213-1229, 1994.

243. **Timmermann A, Oberhuber J, Bacher A, Esch M, Latif M, and E. R**. Increased El Nino frequency in a climate model forced by future greenhouse warming. *Nature* 398: 694-697, 1999.

244. Toien O, Drew KL, Chao ML, and Rice ME. Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R572-R583, 2001.

245. **Tomlinson S, Withers PC, and Cooper C**. Hypothermia versus torpor in response to cold stress in the native Australian mouse *Pseudomys hermannsburgensis* and the introduced house mouse Mus musculus. *Comp Biochem Physiol* 148: 645-650, 2007.

246. **Twente JW, and Twente JA**. Autonomic regulation of hibernation by *Citellus* and *Eptesicus. Academic Press, New York* 327-373, 1978.

247. Van Breukelen F, and Martin SL. Invited review: Molecular adaptations in mammalian hibernators: unique adaptations of generalized responses? *J Appl Physiol* 92: 2640-2647, 2002.

248. Van Breukelen F, Sonenberg N, and Martin SL. Seasonal and state-dependent changes of eIF4E and 4E-BP1 during mammalian hibernation: implications for the control of translation during torpor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R349-R353, 2004.

249. Velickovska V, Lloyd BP, Qureshi S, and van Breukelen F. Proteolysis is depressed during torpor in hibernators at the level of the 20S core protease. *J Comp Physiol B* 175: 329-335, 2005.

250. Walford RL, and Spindler SR. The response to calorie restriction in mammals shows features also common to hibernation: a cross-adaptation hypothesis. *J Gerontol A* 52: 179-183, 1997.

251. Walker JM, Glotzbach SF, Berger RJ, and Heller HC. Sleep and hibernation in ground squirrels (*Citellus spp*): electrophysiological observations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 233: R213-R221, 1977.

252. **Wang LCH**. Time patterns and metabolic rates of natural torpor in the Richardson's ground squirrel. *Can J Zool* 57: 149-155, 1978.

253. Wang LCH, and Lee TF. Torpor and hibernation in mammals: metabolic, physiological, and biochemical adaptations. *Handbook of Physiology: Environmental Physiology* 507-531, 1996.

254. Wang Z, O'Connor TP, Heshka S, and Heymsfield SB. The reconstruction of Kleiber's law at the organ-tissue level. *J Nutr* 131: 2967-2970, 2001.

255. Whitten BK, and Klain GJ. Protein metabolism in hepatic tissue of hibernating and arousing ground squirrels. *Am J Physiol* 214: R1360-R1362, 1968.

256. Wilhelm Filho D, Tribess T, Gaspari C, Claudio FD, Torres AM, and Magalhaes ARM. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). Aquaculture 203: 149-158, 2001.

257. Wright PC. Lemur traits and Madagascar ecology: coping with an island environment. *Am J Phys Anthropol* Suppl 29: 31-72, 1999.

258. Wright PC, and Martin LB. Predation, pollination and torpor in two nocturnal prosimians: *Cheirogaleus major*, *Microcebus rufus* in the rain forest of Madagascar. *In: Creatures of the dark: the nocturnal prosimians*. Edited by L Alterman, GA Doyle, MK Izard NY, London: Plenum Press 45-60, 1995.

259. Xia T, Mostafa N, Bhat BG, Florant GL, and Coleman RA. Selective retention of essential fatty acids: the role of hepatic monoacylglycerol acyltransferase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 265: R414-R419, 1993.

260. Yoder AD, Burns MM, Zehr S, Delefosse T, Veron G, Goodman SM, and Flynn JJ. Single origin of Malagasy Carnivora from an African ancestor. *Nature* 421: 734-737, 2003.

261. **Zhao ZJ, and Wang DH**. Short photoperiod influences energy intake and serum leptin level in Brandt's voles (*Microtus brandtii*). *Horm Behav* 49: 463-469, 2006.

262. Zimmer MB, and Milsom WK. Effects of changing ambient temperature on metabolic, heart, and ventilation rates during steady state hibernation in golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Physiol Biochem Zool* 74: 714-723, 2001.

263. Zimmermann E, Cepok S, Rakotoarison N, Zietmann V, and Radespiel U. Sympatric mouse lemurs in North-West Madagascar: a new rufous mouse lemur species (*Microcebus ravelobensis*). Int J Primatol 69: 106-114, 1998.

264. Zinke J, Dullo WC, Heiss GA, and Eisenhauer A. ENSO and Indian Ocean subtropical dipole variability is recorded in a coral record off southwest Madagascar for the period 1659 to 1995. *Earth Planetary Sci Letters* 228: 177-194, 2004.

265. **Zosky GR**. The parasympathetic nervous system: its role during torpor in the fattailed dunnart (*Sminthopsis crassicaudata*). *J Comp Physiol B* 172: 677-684, 2002.

266. **Zosky GR, and Larcombe AN**. The parasympathetic nervous system and its influence on heart rate in torpid western pygmy possums, *Cercatetus concinnus (Marsupialia: Burramyidae)*. *Zool* 106: 143-150, 2003.

# Table des matières : Suivez le guide...

Préambule	13
Revue bibliographique	19
Introduction : Ecophysiologie de la torpeur	21
1. Définition de la torpeur	21
2. Caractéristiques de la torpeur	22
3. Facteurs environnementaux influençant l'expression de la torpeur	24
a. Photopériode	24
b. Température ambiante	25
c. Disponibilité alimentaire	27
d. Facteurs sociaux	27
4. Energétique de la torpeur	
a. Les lipides : principale source de carburant énergétique durant la torpeur	29
b. Inhibition de la voie glycolytique et néoglucogenése	
c. Epargne protéique au cours de la torpeur	
5. Facteurs intrinsèques régulant l'expression de la torpeur	
a. Systeme nerveux	
b. Hormones	
6. Conclusions	
The biology of the grey mouse lemur ( <i>Microcebus murinus</i> ): A unique model to stud	ly the
strategies of energy economy in contrasted climates	
1. Phylogeny and morphology	41
a. Phylogeny	
b. Morphology	
2. Distribution and habitat	
3. Feeding benavior	
4. Social structure and population dynamics	
a. Social structure and nome range	
D. Communication	
c. Longevity: file length and predation	
5. Reproduction	
a. Seasonality of reproduction	
b. Filotoperiodic control.	
6 Enorgy balance	
a Seasonal rhythm	
a. Seasonaí myunn b. Daily rhythm	
7 Conclusion	
Objectifs de l'étude	67
Résultats	07
Étude 1	73
Étude 2	
Étude 3	115
Étude 4	133
Conclusions et perspectives	161
1 Rannel des principaux résultats	163
<ul> <li>2 Réserves énergétiques durant les périodes de restriction alimentaire et de</li> </ul>	105
réalimentation subséquente	163

3.	Mécanismes saisonniers d'équilibre de la balance énergétique et leurs limites
phy	vsiologiques166
4.	Torpeur journalière à composante saisonnière et relation avec les habitats naturels
	170
5.	Impact sur la survie du Microcèbe
6.	Comparaison avec d'autres primates Cheirogalidés et d'autres espèces tropicales 176
7.	Perspectives
Référence	ces bibliographiques

### Abstract

Evolution has favored the strategies of energy saving to allow living species to survive in fluctuating environments. In the context of global changes, the survival of the species depends on the limits of the plasticity of theses strategies. Small species, which are energetically disadvantaged and live in contrasted environment, represent suitable models for the study of these adaptive limits. This study aimed to determine the nature and the limits of the physiological adaptive mechanisms used by the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*), which is a unique model among Primates due to its small size and due to its seasonal heterothermy, matching the Malagasy resource availability.

At first, during a graded (40 and 80%) food restriction, thermoregulatory and locomotor's responses, and their consequences on energy and water balances were characterized in male mouse lemurs acclimated to long-days (summer, LD40 and LD80, respectively) or to short-days (winter, SD40 and SD80, respectively). In a second time, part of the mechanisms underlying the strategies was assessed by studying the role of protein turnover in the energy requirements, by investigating the implications of gut-produced hormones in the regulations of torpor expression and body mass, by determining the cost of torpor in terms of oxidative stress and its potential relation with the storage of polyunsaturated fatty acids, which is known to maximize torpor phases, and finally by following the stress response.

In response to a moderate (40%) reduction of energy supply, mouse lemurs under winter phenotype equilibrate their energy balance by optimizing their episodes of daily torpor. This torpor increase is associated with a differential oxidation of palmitate (saturated fatty acid) and linoleate (polyunsaturated fatty acid), suggesting a whole-body sparing of polyunsaturated lipids, during the energy deficit in these mouse lemurs. These animals do not show any significant increase in oxidative stress levels, in association with augmented torpor episodes, indicating the set-up of a cost-benefit trade-off. In addition, SD40 mouse lemurs reduce their fat mass and conserve their protein mass along the five weeks of the hypo-caloric diet. This fat-free mass maintenance corresponds to an adaptive trait for the grey mouse lemur in winter since this mass 1) would have a thermogenic role during the daily arousal from torpor and 2) would allow the grey mouse lemur to be competitive during the reproductive period, following the dry season. In counterpart to the maintenance of a high level of active metabolic mass, mouse lemurs in winter reduce nitrogen flux, which contribute to a reduction of energy costs, during a chronic moderate food restriction. Faced to a moderate (40%) energy deprivation, mouse lemurs under summer phenotype equilibrate their energy balance by reducing mainly their active metabolic mass (fat-free mass). This leads to a lowering of energy demands and allows mouse lemurs to keep a sustained level of physical activity, in order to ensure a high reproductive success during the mating season. Moreover, LD40 animals slightly increase the depth of their torpor episodes. This weak utilization of torpor is associated with increases in oxidative stress and with a non-differential use of palmitate and linoleate. One of the hypotheses could reside in the fact that the grey mouse lemur in summer does not use torpor in order to avoid excessive production of oxidative stress, which can affect its fitness. Conversely, LD80 mouse lemurs fail to equilibrate their energy balance, despite of a late increase in torpor expression, which the depth is positively correlated with a gut-derived hormone, the glucagon-like peptide 1. Faced to a severe (80%) food restriction, mouse lemurs under winter phenotype fail to restore a stable energy balance. These animals augment their torpor expression in the same extent as do SD40 mouse lemurs, but this increase is associated with an augmented oxidative stress levels, without marked differential use of types of fatty acids. In addition, SD80 mouse lemurs reduce both their fat mass and fat-free mass, lowering their metabolic costs. This loss of protein mass is explained by a strong negative nitrogen balance, which results in a high level of stress, especially as these animals show strongly augmented levels of catecholamine.

Faced to a chronic moderate food shortage, the grey mouse lemur manages to restore a stable energy balance, whatever its seasonal status, by using strategies of protein or lipid sparing. The purpose is to maximize its fitness and its survival whatever the season. However, these strategies are inefficient faced to severe reduction of energy supply, but the use of complementary strategies of energy economy, such as social thermoregulation, remains to be considered. These results reveal that small seasonal species, energetically disadvantaged, rely to plastic strategies to face chronic shortage in resources. These strategies do not necessarily associate an optimization of the torpor phases, as it is largely accepted for a heterothermic species. Instead, it seems that the physiological cost associated with hypothermia is considered and can lead to an avoidance of the torpor episodes.

## Résumé

L'évolution a sélectionné des stratégies d'économie d'énergie afin de permettre aux espèces vivantes de survivre au sein des environnements fluctuants. Dans le contexte des changements globaux, la survie de nombreuses espèces dépendra des limites de plasticité de ces stratégies. Les petites espèces, énergétiquement défavorisées et vivant dans des zones aux environnements très contrastés, représentent de bons modèles pour étudier ces limites adaptatives. Dans ce travail, nous nous sommes attachés à déterminer la nature et les limites des mécanismes physiologiques adaptatifs utilisés par le Microcèbe (*Microcebus murinus*), espèce unique au sein des primates de part sa taille et son hétérothermie saisonnière qui calque la disponibilité des ressources malgaches.

Dans un premier temps, au cours d'une restriction calorique gradée (40 et 80%) chez des microcèbes mâles acclimatés en jours longs (été ; JL40 et JL80, respectivement) ou en jours courts (hiver ; JC40 et JC80, respectivement), nous avons caractérisé les réponses thermorégulatrices et locomotrices et leurs conséquences sur le bilan énergétique et hydrique. Dans un second temps, nous avons étudié une partie des mécanismes sous-tendant les stratégies observées en étudiant le rôle du turnover protéique dans l'évolution des besoins énergétiques, le rôle des hormones de la sphère gastro-intestinales dans la régulation de l'expression de la torpeur et de la prise de poids, le coût de la torpeur en terme de stress oxydatif et sa relation potentielle avec le stockages des acides poly-insaturés, sensé maximiser les phase de torpeur et enfin, la réponse au stress.

En réponse à une réduction modérée (40%) des besoins énergétiques, les microcèbes sous phénotype d'hiver équilibrent leur balance énergétique en optimisant leurs épisodes de torpeur journalière. Cet accroissement de la torpeur s'associe à une oxydation différentielle du palmitate (acide gras saturé) et du linoléate (acide gras poly-insaturé), suggérant une épargne des lipides poly-insaturés par l'organisme, au cours d'une pénurie énergétique chez ces microcèbes. Ces animaux ne présentent aucune augmentation de leurs niveaux de stress oxydatif, en association avec leurs épisodes de torpeur accrus, indiquant la réalisation d'un compromis coût-bénéfice. En outre, les microcèbes en JC40 réduisent leur masse grasse et épargnent leur masse protéique tout au long des 5 semaines de régime. Ce maintien de la masse maigre constitue un trait adaptatif chez le Microcèbe en hiver puisque cette masse 1) aurait un rôle thermogène lors de l'émergence journalière des phases de torpeur et 2) permettrait au Microcèbe d'être compétitif durant la période de reproduction, suivant la saison sèche. En contrepartie du maintien à un niveau élevé d'une masse métaboliquement active, les microcèbes en hiver réduisent leurs flux azotés, ce qui contribue à une réduction des coûts énergétiques, au cours d'une restriction calorique chronique modérée. Face à une restriction énergétique modérée (40%), les microcèbes sous phénotype d'été équilibrent leur balance énergétique en réduisant principalement leur masse métaboliquement active (masse maigre). Ceci permet au Microcèbe d'abaisser ses besoins énergétiques pour maintenir un niveau important d'activité physique, afin d'assurer un succès reproducteur élevé au cours de la saison de reproduction. De plus, les animaux en JL40 n'augmentent que légèrement la profondeur de leur épisode de torpeur. Cette faible utilisation de la torpeur est associée à des augmentations du stress oxydatif et de l'oxydation non différentielle du palmitate et du linoléate. Une hypothèse pourrait être que le Microcèbe en été ne recourt pas à la torpeur, afin d'éviter toute génération excessive de stress oxydatif pouvant affecter sa valeur sélective. À l'inverse, les microcèbes en JL80 ne parviennent pas à équilibrer leur balance énergétique, malgré l'augmentation tardive de leur phase de torpeur, dont la profondeur est positivement corrélée avec une hormone gastro-intestinale, le glucagon-like peptide 1. Face à une restriction calorique sévère de 80%, les microcèbes sous phénotype hivernal ne parviennent pas à restaurer une balance énergétique stable. L'augmentation de la torpeur chez ces animaux s'effectue dans les mêmes proportions que chez les microcèbes en JC40 mais est associée à une génération accrue des niveaux de stress oxydatif, sans utilisation différentielle marquée des acides gras. En outre, les microcèbes en JC80 réduisent à la fois leur masse grasse et leur masse maigre, réduisant ainsi leurs coûts métaboliques. Cette perte de masse protéique s'explique par la présence d'une balance azotée fortement négative, résultant en une situation de stress intense, d'autant plus que ces animaux présentent des taux de catécholamine fortement accrus.

Face à une pénurie alimentaire chronique modérée, le Microcèbe parvient à équilibrer sa balance énergétique et ce, quelle que soit la saison, en utilisant des stratégies d'épargnes protéiques ou lipidiques. L'objectif étant de préserver sa valeur sélective et sa survie quelle que soit la saison. En revanche, ces stratégies sont inefficaces face à une réduction sévère des apports énergétiques, mais le recours à des stratégies complémentaires d'économie d'énergie, comme la thermorégulation sociale restent à évaluer. Ces résultats montrent que de petites espèces saisonnières, énergétiquement défavorisées, disposent de stratégies plastiques pour faire face à des pénuries chroniques en ressources. Ces stratégies ne passent pas nécessairement, comme il est largement accepté pour une espèce hétérotherme par l'optimisation de ses phases de torpeur. Plutôt, il semble que le coût physiologique associé à l'hypothermie soit pris en compte et puisse conduire à un évitement des phases de torpeur.