



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

CNRS IPHC UMR 7178

THÈSE présentée par : Maïly KERVELLA

soutenue le : 19 décembre 2023

Pour obtenir le grade de : Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

## Same mitochondria, different longevities: what do ants tell us about metabolic ageing?

THÈSE dirigée par :

M. CRISCUOLO François

Directeur de Recherche CNRS, Université de Strasbourg

M. BOUILLAUD Frédéric

Directeur de Recherche Inserm, INSERM Paris

RAPPORTEURS :

M. DARROUZET Eric

Maître de Conférences (HDR), Université de Tours

M. TEULIER Loïc

Maître de Conférences (HDR), Université de Lyon 1

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme LEFRANCOIS Christel

Professeure, Université de la Rochelle

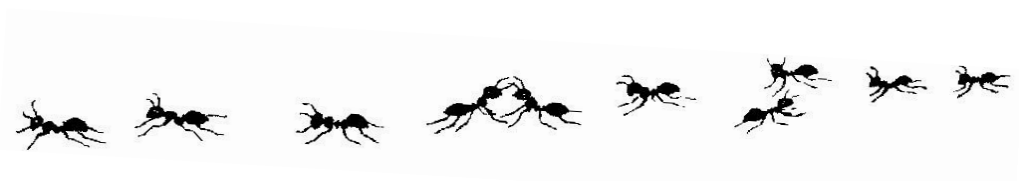
Mme BERGOUIGNAN Audrey

Directrice de Recherche CNRS, Université de Strasbourg

INVITÉS : M. LIBBRECHT Romain

Chargé de Recherche CNRS, Université de Tours







# Table des matières

Remerciements : .....	ii
Introduction générale .....	0
I. Energie et mitochondries.....	2
1. L'adénosine triphosphate, molécule de stockage clé de l'énergie.....	4
2. La mitochondrie : de l'endosymbiote à l'organite.....	5
A. Découverte d'un organite porteur d'information génétique.....	5
B. Mise en évidence de fonctions mitochondriales codées par le noyau .....	7
C. Les génomes sont en fait mobiles dans la cellule.....	9
D. Importance de la rétention du génome mitochondrial dans le cytosol.....	17
3. Mitochondries et médecine légale : résolution d'énigmes historiques .....	20
A. Enquête n°1 : Identification du cœur de Louis-Charles de France (Louis XVII).....	22
B. Enquête n°2 : Identification de la dépouille du Tsar Nicolas II.....	24
II. Vieillessement et mitochondries .....	25
1. Définition du vieillissement .....	26
2. Les causes ultimes (origine évolutives) et proximales (mécanismes) du vieillissement .....	29
A. Causes évolutives du vieillissement .....	30
B. Causes proximales : parmi d'autres, la théorie radicalaire .....	33
III. Quand la socialité influe sur la longévité .....	38
1. Qu'entend-on par (eu)socialité ?.....	39
A. Introduction .....	39
B. La complexification de l'organisation sociale provoque des disparités de longévités	40
2. Vieillessement et organisation sociale des fourmis.....	41
A. La division du travail .....	42
B. <i>Lasius niger</i> , modèle de laboratoire .....	44
C. Bases mécanistiques des différences de longévités des castes sociales.....	46
3. L'appareil respiratoire des insectes .....	48



A.	Présentation de l'appareil respiratoire .....	48
B.	Régulation de la ventilation chez l'insecte .....	50
IV.	Objectifs de la thèse.....	54
	Références de l'introduction .....	55
	Chapitre 1 : Validation des mesures de respirométrie avec une électrode de Clark .....	70
	References.....	91
	Chapitre 2 : Comparaison des capacités énergétiques des différentes castes de <i>Lasius niger</i> .....	96
	References.....	132
	Chapitre 3: Discussion générale.....	140
	La longévité des reines peut s'expliquer à différents niveaux : .....	143
1.	Un métabolisme plus bas.....	143
2.	Un meilleur équilibre entre les systèmes oxydants et antioxydants.....	143
A.	Les reines plus âgées ne montrent pas plus de signes de dommages .....	143
B.	La barrière antioxydante, indicateur très inégal de la longévité.....	144
C.	L'immunité comportementale chez les insectes sociaux .....	145
3.	Un âge biologique visiblement plus bas .....	145
A.	De premières observations microscopiques de marqueurs de sénescence .....	145
B.	Une dynamique mitochondriale et une régulation énergétique optimisées.....	146
	D'autres mécanismes méritent intérêt.....	147
1.	L'attrition des télomères et l'activité télomérase: .....	147
2.	La diapause.....	148
3.	Epigénétique, épissage alternatif et éléments transposables.....	150
4.	Un premier test de mesures de la ventilation chez deux espèces de fourmis.....	151
	Une comparaison interspécifique de fonctionnements mitochondriaux sur deux espèces de fourmis .....	157
5.	Mesures de respirométrie .....	157
6.	Isolation des mitochondries de deux espèces .....	159



Conclusion sur les mesures de bioénergétique .....	162
Le stress oxydant occupe-t-il réellement une place centrale ? .....	167
Références.....	167
Résumé de la revue.....	173
References.....	195
Communications orales: .....	206
A.    MT180.....	208
A.    CEPA MONTPELLIER 2021 (Poster) .....	211
B.    CEPA TOURS 2023 (Poster) .....	213
C.    SEB MONTPELLIER 2022 (présentation) .....	214
D.    CEPA TOURS 2023 (présentation).....	215
Résumé de these.....	216
Thesis abstract .....	217



## Remerciements :

Je souhaite en premier lieu remercier mes directeurs de thèse, les Dr François Criscuolo et Dr Frédéric Bouillaud. François, tout d'abord merci de m'avoir choisie et fait confiance pour ce projet, merci pour ton écoute, ta bienveillance en période(s) de doute, et ton aide précieuse malgré la distance des deux premières années. Et pour finir, merci pour ta contribution à ce manuscrit. Frédéric, je te remercie pour ton accueil sur Paris, ton expertise précieuse, notamment dans la relecture des manuscrits et l'interprétation des résultats.

Martin, Antman, je te suis également reconnaissante. Sans toi le projet n'aurait pas existé, et tu t'es toujours rendu disponible pour répondre à mes questions.

Je tiens à remercier l'équipe parisienne dans laquelle je suis restée pendant deux ans : Renaud, Clotilde, Carina et l'adorable Véronique. Je salue également ceux qui n'étaient que de passage, ou qui ont quitté l'institut, comme Céline et Noureddine. Big up aux anciennes stagiaires qui sont devenues de bonnes copines, Khawla et Sarah. Et bien sûr je ne t'oublie pas Angèle ! On aura partagé une table de bureau pendant deux années, on aura ri, pleuré (un peu quand même), testé des trucs (à la paillasse comme à la salle ^^). A défaut d'avoir trouvé un protocole valable d'isolation de mitochondries de fourmis sur Paris, j'ai trouvé une très bonne amie ☺. Bon courage pour tes derniers mois, mouvement du pied et « Attitude » !

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance aux plateformes de l'institut Cochin, et notamment Thomas qui m'a formée et assistée dans les tests de microscopie en temps de vol.

Le monde de la recherche implique de se faire des relations, et pas mal de collaborations. J'ai eu la chance de pouvoir profiter du réseau de Céline Cansell pour faire respirer mes fourmis, merci ! J'ai également profité de la gentillesse d'Hervé Colinet, et des doctorantes du laboratoire EcoBio, qui nous ont accueillies mes fourmis et moi pendant une semaine pour des mesures de respiration discontinue. Je remercie également Benoît Pinson pour ses mesures  $\dot{O}_2$  combien précieuses de l'AEC, et sa disponibilité. Et un petit coucou à Steffi, copine du M2 et doctorante au MnHn, contrebandière et guide à ses heures ;-)

Un peu plus à l'Est maintenant, ce sont les personnes du bâtiment 60 de l'IPHC que je souhaiterais remercier : en particulier Elisabeth, qui aura dû composer avec mon ordre de mission permanent bloquant mon compte étamine pendant deux ans (oups), et qui pour la science se sera mise au polonais le temps d'une commande de fourmis ; Sandrine qui veille dans les labos et qui est



toujours là en cas de besoin ; les animaliers Hélène, David, Aurélie et Nicolas, qui s'occupent des colonies de fourmis; Astolfo, pour sa gentillesse ; JP, pour sa bonne humeur et sa playlist de fin de semaine. Un grand merci aux collègues doctorants, et une pensée pour mes colocataires de bureau Maëlle, Camille et Lilia, que je quitte bientôt et qui vont beaucoup me manquer. Maëlle, Cyrielle, mille mercis pour votre écoute et vos encouragements !

Je salue le travail de mon stagiaire, Valentin (et par la même occasion Julien Pétilion), pour son beau travail et son implication dans les mesures de respiration de mitochondries d'araignées.

Je profite des lignes restantes pour remercier Fabrice, du département de Chimie Analytique, pour l'organisation des mesures, et ses nombreux retours sur le projet et les drafts. Je n'oublie pas Valériane, qui a récupéré mes isolations de mitochondries et les a préparées pour la protéomique, après avoir dû créer une nouvelle base de données !

Enfin, parce qu'une thèse est également une affaire de famille, j'exprime toute ma gratitude envers mes parents qui me soutiennent depuis toujours, c'est-à-dire longtemps. Merci Mamounette pour tes corrections de mails, et tes encouragements énergiques répétés (c'est un euphémisme), merci Papa d'être toujours là. Je remercie ma « chère sœur » Pauline (à lire à haute voix avec l'intonation de Mme Bennet), mon petit frère Quillian alias Quiqui la Quiche ou Tête de Baleine (si on veut l'énerver, mais à éviter maintenant qu'il frôle le 1m90), ainsi que tous les amis à quatre pattes de la maison, qui sont le meilleur remède contre le spleen (Maïka Macha Machkaïa, Dame Hiris, Maximilien Maximus Magnus I<sup>er</sup> de la Barbotine et Niambé).

J'ai une pensée toute particulière pour mes grands-parents, ma tendre Mamie Gloue et mon Popen, les deux personnes au monde que je souhaitais le plus rendre fières, et qui m'ont toujours aimée, accompagnée et soutenue de toutes les manières possibles dans les étapes clés de la vie. Je regrette seulement qu'ils ne puissent pas voir l'aboutissement de ces trois ans de thèse.

At last but not least, je tiens à remercier mon neveu Kymani, avec qui je n'ai pas besoin de me tenir, et faire semblant d'être adulte. Minou, mon copain de foot, le Neymar de Bretagne, le dormeur du Louvre, et moteur de mes premières recherches sur les mitochondries, ce manuscrit est pour toi.

Merci au jury d'avoir accepté de me relire







# Introduction générale



CleopANTra (Kymani Kervella)



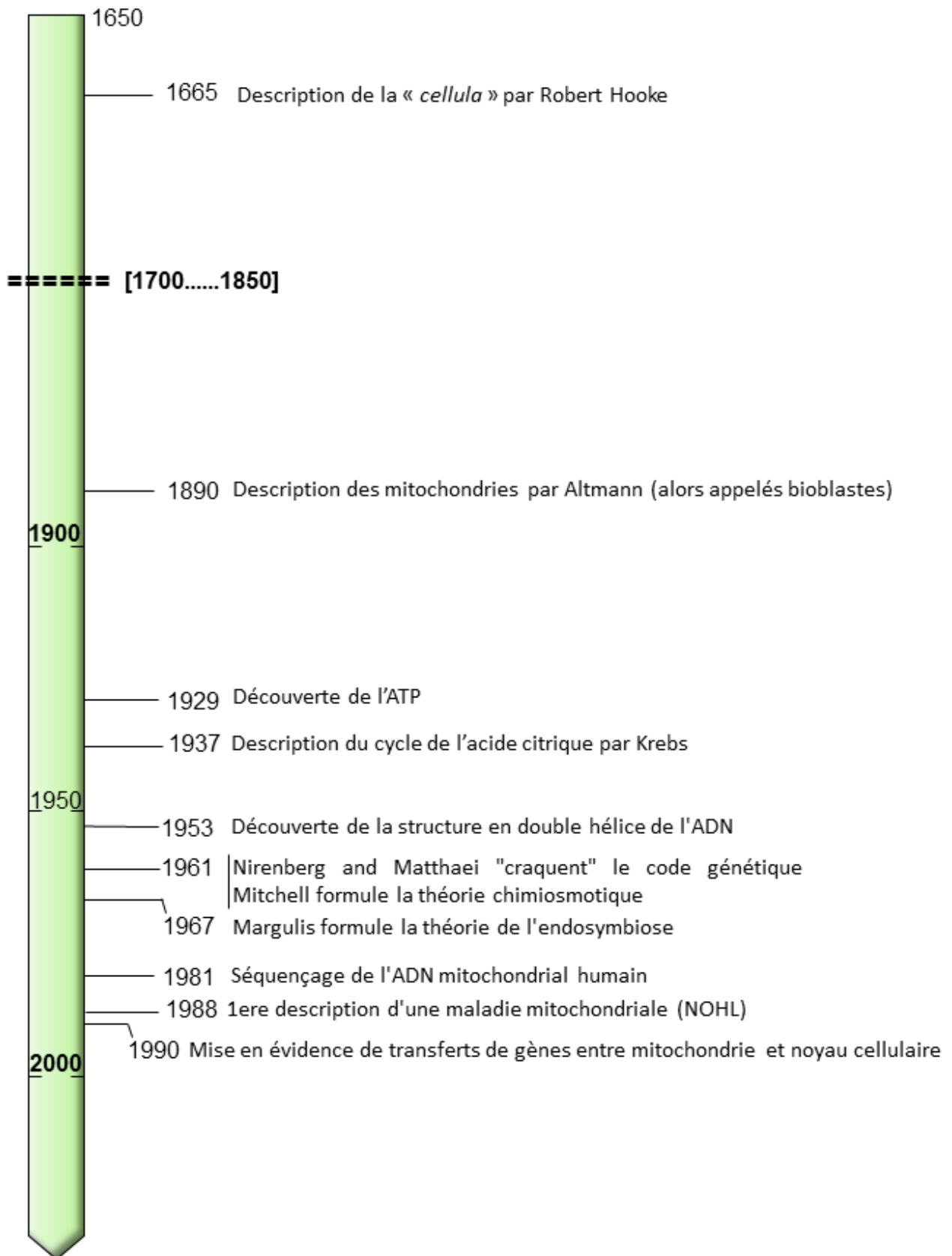


Figure 1 : Découvertes majeures en cytologie et biologie moléculaire. Frise chronologique construite sur <http://frisechronos.fr> NOHL : neuropathie optique héréditaire de Leber



## I. Energie et mitochondries

Rendues possibles par une révolution technologique concomitante, le XXe siècle a été le théâtre d'une multitude de découvertes scientifiques majeures (Figure 1). Il faut néanmoins remonter un peu plus loin pour véritablement comprendre tout le chemin parcouru, et notamment poser l'origine du concept de cellule. Ainsi, dès l'Antiquité, Aristote pensait que les animaux et les plantes, si complexes soient-ils, étaient formés de peu d'éléments qui se répètent. Évidemment, sans outil approprié, impossible de confirmer ces hypothèses par l'observation directe. Il faudra attendre 1665 pour que Robert Hooke, à l'aide d'un microscope composé de deux systèmes de lentilles, et de la lumière d'une lampe à huile réfléchi sur un miroir puis condensée par un globe de verre rempli d'eau, réalise la première observation détaillée de cellules végétales (du liège)<sup>i</sup>. Le terme de cellule a d'ailleurs été proposé par Hooke, du latin *cellula* pour "petite chambre". Il faut noter que Hooke n'avait pas réellement observé les cellules elles-mêmes, mais seulement leurs parois pecto-cellulosiques, car les cellules de liège sont mortes et vides de leur contenu. Ses observations ont été rassemblées dans son ouvrage *les Micrographia* (1667). Plus de 200 ans plus tard, en 1890, les mitochondries seront décrites en microscopie par Richard Altmann.

L'adénosine triphosphate (ATP) a été découverte par Lohmann en 1929, et Engelhardt a montré que la molécule était nécessaire à la contraction musculaire un an plus tard. Il a rapidement proposé que la génération d'ATP était la fonction centrale de la respiration oxygénique, et l'ATP fut reconnue comme la monnaie énergétique universelle de la vie. De plus, Krebs et Johnson ont élucidé le fonctionnement cyclique de l'acide citrique (Krebs et al. 1938), ce qui leur a valu le prix Nobel en 1953. En 1946, Claude a mis au point les premières procédures fiables de fractionnement cellulaire utilisant la centrifugation différentielle, permettant ainsi l'isolement des éléments structuraux de la cellule, et donc le premier isolement de mitochondries intactes. Grâce à ce procédé, Claude et ses collègues ont démontré que la cytochrome oxydase était localisée exclusivement dans la mitochondrie (Claude 1946), et cette dernière est devenue un élément clé du métabolisme aérobie pour les programmes de recherche qui ont suivi.

---

<sup>i</sup> NB : L'invention du microscope est également attribuée à plusieurs autres individus, notamment Galilée en 1609, ou encore Antonie Van Leeuwenhoek, qui, en améliorant l'outil, observera des spermatozoïdes et alimentera la théorie de la préformation.



**Tableau 1 :** Exemples de variations d'énergie libre standard lors de l'hydrolyse de composés phosphorylés. L'énergie de Gibbs, notée  $\Delta G$ , est une fonction thermodynamique qui mesure la disponibilité de l'énergie libre dans un système chimique pour effectuer un travail à pression constante et à température constante. En d'autres termes, elle quantifie la capacité d'une réaction chimique à faire du travail utile. L'énergie de Gibbs est un indicateur essentiel en thermodynamique chimique : une valeur négative de  $\Delta G$  indique que la réaction est spontanée et libère de l'énergie, tandis qu'une valeur positive de  $\Delta G$  signifie que la réaction est non spontanée et nécessite de l'énergie pour se produire. Lorsque  $\Delta G$  est égal à zéro, la réaction est à l'équilibre. En bleu, les réactions de faible énergie. Les autres réactions sont dites de haute voire très haute énergie. Connaissant le  $\Delta G^0$ , les concentrations initiales des réactifs et produits dans des conditions cellulaires données, on peut calculer  $\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln(\text{produit}/\text{substrat})$ . Dans ce cas l'ATP est bien plus abondante que son produit, la réaction d'hydrolyse de l'ATP est donc plus exergonique que dans les conditions standards. Pi : phosphate inorganique, Ppi : pyrophosphate

Réaction	Energie libre de Gibbs $\Delta G^0$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )
Phosphoenolpyruvate → pyruvate + Pi	-61,9
1,3-bis-Phosphoglycerate → 3-Phosphoglycérate + Pi	-52
Phosphocreatine → creatin + Pi	-43,1
ADP → AMP + Pi	-32,8
ATP → ADP + Pi	-30,5
ATP → AMP + Ppi	-45,6
Acetyl CoA (Thioester)	-32
Fructose-6-phosphate → fructose + phosphate	-13,8
Glycéraldéhyde 3-phosphate → glycéraldéhyde + phosphate	-17
Glucose-6-phosphate	-13,8



## 1. L'adénosine triphosphate, molécule de stockage clé de l'énergie

Les réactions biochimiques qui sous-tendent la vie sont basées sur une série de transferts d'énergie, tous conformes aux deux principes fondamentaux de la thermodynamique tels qu'ils ont été établis par Sadi Carnot, puis repris par Thomson et Clausius. Ces principes sont i) la conservation de l'énergie dans l'Univers et ii) la tendance générale vers un accroissement du désordre de la matière ou du hasard, également appelé **entropie** : une entropie élevée est associée à un grand désordre et à une faible énergie, tandis qu'une entropie faible est associée à un ordre plus élevé et à une énergie plus concentrée. La vie représente quant à elle une exception, car l'objectif de tout processus biosynthétique vivant est d'augmenter le degré d'ordre de la matière qui le caractérise, et donc de contourner le deuxième principe de la thermodynamique, que ce soit à l'échelon moléculaire, cellulaire ou d'organismes plus complexes (Leverve et al. 2007). Pour maintenir l'entropie à un faible niveau, la cellule a besoin d'une grande quantité d'énergie.

Dans la cellule vivante, pratiquement tous les processus bioénergétiques (anabolisme et catabolisme) sont couplés les uns aux autres par l'intermédiaire des nucléotides d'adénosine, qui sont consommés (**anabolisme**, pour le fonctionnement cellulaire et la biosynthèse de molécules) ou régénérés (**catabolisme**, via l'utilisation d'énergie issue de la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative) par différentes réactions enzymatiques. Les nucléotides d'adénosine comprennent l'adénosine triphosphate (ATP), l'adénosine diphosphate (ADP) et l'adénosine monophosphate (AMP). Parmi ces nucléotides, l'ATP est couramment décrite comme la "monnaie énergétique" universelle des cellules, car c'est cette dernière qui stocke l'énergie chimique nécessaire pour alimenter les processus biologiques. Elle est de ce fait une molécule fondamentale pour la survie et le bon fonctionnement de tous les organismes vivants.

L'ATP est obtenue dans la cellule par phosphorylation de l'ADP :  $ADP + P_i \rightarrow ATP + H_2O$ . Deux modes de phosphorylation sont utilisés pour produire l'ATP : i) des réactions de phosphorylation liées à l'hydrolyse de molécules riches en énergie (en aérobiose comme anaérobiose), qui représentent moins de 10% de l'ATP cellulaire, et ii) les oxydations phosphorylantes, qui ont lieu au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, et qui représentent 90% de la synthèse d'ATP dans la cellule eucaryote (Rolfe and Brand 1997). Il existe une grande différence d'énergie libre libérée par l'hydrolyse de l'ATP ou de ses produits d'hydrolyse, l'ADP et le phosphate inorganique ( $P_i$ ) (Tableau 1). Cela tient à l'instabilité de



l'ATP, qui est due à la répulsion électrostatique des charges négatives portées par les trois groupements phosphorylés. L'énergie libérée par l'hydrolyse du composé phosphorylé tient à la différence d'énergie libre ( $\Delta G^0$ ) entre l'ATP en tant que substrat, instable, et les produits finaux, beaucoup plus stables (Guérin 2004).

Classiquement, on admet qu'un sujet adulte (~70Kg) utilise et resynthétise quotidiennement sa propre masse en ATP (Leverve et al. 2007; Bennett and Onyango 2021). Les processus les plus énergivores dans les cellules de mammifères concernent le transporteur membranaire  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, responsable du maintien des gradients ioniques à travers la membrane plasmique, et la synthèse des protéines, en particulier dans les cellules en phase de prolifération (Bussolati et al. 1996). Pour illustrer ces propos en terme de pourcentages, il a été observé que dans les cellules (microbiennes cette fois-ci), dans des conditions de croissance, la synthèse des protéines utilise 75 % de l'énergie totale disponible, alors que le coût de la réplication de l'ADN n'en représente que 2 % (De la Fuente et al. 2014).

Bien que différents nucléosides puissent se lier à trois phosphates qui peuvent servir à stocker l'énergie biochimique, comme le GTP (guanosine triphosphate), utilisé dans certaines voies, il existe un consensus scientifique sur le fait que l'ATP est la principale molécule de stockage et de transfert d'énergie dans les cellules (De la Fuente et al. 2014; Plattner and Verkhatsky 2016; Xie 2021).

## 2. La mitochondrie : de l'endosymbiote à l'organite

### A. Découverte d'un organite porteur d'information génétique

A la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, les progrès techniques liés à la centrifugation ont permis de grandes avancées en cytologie, de par la séparation des différents éléments structuraux de la cellule. Ainsi, Richard Altmann (Figure 2), histologiste à Leipzig, décrit pour la première fois des granules correspondant aux mitochondries dans son ouvrage "Die elementarorganismen und ihre beziehungen zu den zellen" (croquis Figure 2), en français « les organismes élémentaires et leurs relations avec les cellules » (Altmann 1894). Altmann observa donc des granules qu'il associa dans un premier temps à la respiration cellulaire. Puis, après avoir noté des ressemblances morphologiques entre ces granules et les bactéries, et observé leur autoreproduction (seules structures concernées parmi celles décrites), il les associa à des organismes élémentaires qui avaient autrefois colonisé la cellule. Il leur attribua le terme de



bioblastes, soit « germes de vie »<sup>i</sup>. Néanmoins, son idée (visionnaire) selon laquelle les mitochondries ressemblaient à des bactéries et avaient des fonctions métaboliques et génétiques distinctes de celles de la cellule elle-même reçut de nombreuses critiques cinglantes de ses pairs, notamment de collègues (Cowdry 1953; Ghesquier 2002). Altmann se retrouva mis à l'écart et surnommé « der Geist », soit « le Fantôme » (O'Rourke 2010). Ses affirmations furent cependant défendues trois ans avant sa mort, en 1897, par l'histologiste Cari Benda (O'Rourke 2010). Cette dernière rebaptisa les bioblastes « mitochondries », d'après les formes différentes sous lesquelles ils pouvaient se trouver, les racines grecques étant *μίτος* (*mitos*) pour « fil », et *χόνδρος* (*chondros*) pour « grain ».

En 1949, Maurice Ephrussi, chercheur de Pasteur, émit l'hypothèse que les mitochondries ont leur propre matériel génétique indépendant du noyau cellulaire, un facteur extra chromosomique (Ephrussi and Hottinguer 1951; Ephrussi and Slonimski 1955; Sicard 2022). Les premiers mutants respiratoires (spontanés ou induits par les acridines) à hérédité cytoplasmique furent isolés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, pour des mutations appelées « petites », en raison de la petite taille des colonies obtenues sur milieu gélosé (la production d'ATP ne se faisant plus que par fermentation). Le caractère "petite" semblait être contrôlé par un élément cytoplasmique auto-reproductible, car les résultats ont révélé que la mutation se comportait comme un caractère non mendélien (héritabilité maternelle) dans les croisements génétiques. Étant donné que le changement génétique, irréversible, a entraîné un dysfonctionnement permanent de la fonction respiratoire mitochondriale, une hypothèse a été émise qu'il était dû à la perte d'un élément génétique cytoplasmique, probablement localisé à l'intérieur des mitochondries (les levures « petites », dépourvues de ce facteur, rho, étaient notées rho<sup>-</sup>).

En 1955, une méthode colorimétrique basée sur la réaction de l'ADN avec l'indole et la diphénylamine a été décrite par Ceriotti pour déterminer la quantité d'ADN (Ceriotti 1955). Fort de cette avancée méthodologique, au début des années 1960, les premières découvertes d'ADN mitochondrial furent réalisées chez *Saccharomyces cerevisiae* sur des isolations de mitochondries (Schatz et al. 1964; Harizanis et al. 1987).

---

<sup>i</sup> Notons par ailleurs qu'il s'agit du nom du software utilisé sur les respiromètres Oroboros





## B. Mise en évidence de fonctions mitochondriales codées par le noyau

Les mitochondries de levures cultivées en aérobiose, comme celles des organismes supérieurs, contiennent les enzymes du transport des électrons, de la phosphorylation oxydative, ainsi que du cycle de Krebs. Linnane a utilisé la propriété des levures (ici *Torulopsis utilis*) en tant qu'anaérobe facultatif pour générer des cellules avec des mitochondries primitives (sous-développées), après une croissance anaérobie. Il a montré qu'aucun des cytochromes de la chaîne respiratoire normalement associés à la matrice mitochondriale n'est synthétisé par *T. utilis* lorsqu'elle est cultivée dans des conditions strictement anaérobies, et que le rétablissement de l'oxygène a permis aux cellules de régénérer les mitochondries (ou du moins un système membranaire primitif) avec enzymes respiratoires. Ses recherches ont ainsi montré que les mitochondries provenaient de précurseurs non mitochondriaux. Cette découverte a contribué à notre compréhension de l'origine des mitochondries et de leur relation avec les cellules hôtes.



ca. 1890 Altmann

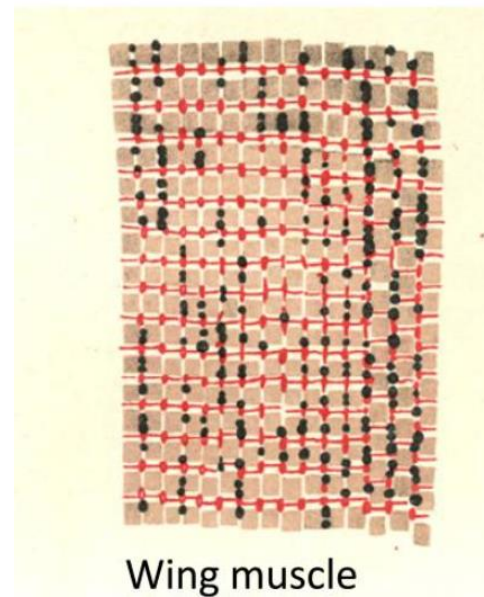
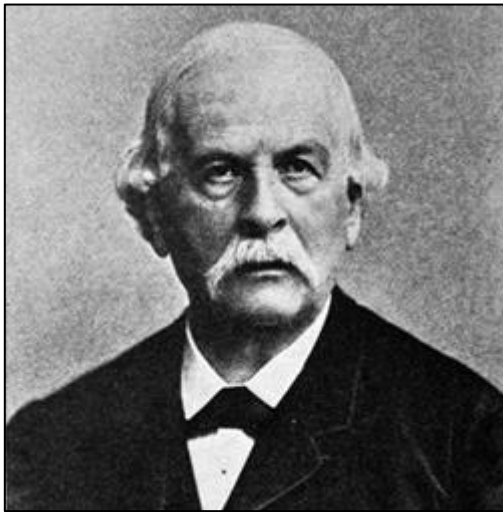


Figure 2 : Richard Altmann en haut à gauche, croquis de bioblastes (muscle de vol), réalisé et publié dans son livre à droite (Altmann 1894). En bas, photo de Lynn Margulis (prise sur MUBI)



### C. Les génomes sont en fait mobiles dans la cellule

L'idée d'Altmann selon laquelle les mitochondries ressemblaient à des bactéries et avaient des fonctions métaboliques et génétiques n'était, en fin de compte, pas loin de la vérité. Cette transmission héréditaire d'un symbiote physiologique sera confirmée par la théorie de l'endosymbiose, proposée par le zoologiste Umberto Pierantoni en 1919 puis Ivan Wallin, et enfin complétée et propagée par Lynn Margulis (Wallin 1927; Sagan 1967; Margulis 1970).

Si la vie sur Terre a débuté il y a 3,8 milliards d'années, les conditions environnementales n'étaient pas les mêmes qu'aujourd'hui. L'étude des couches sédimentaires nous montre que le monde du vivant a dû faire face à une oxygénation de l'atmosphère il y a 2,45 à 2,7 milliards d'années (de Duve 2007; Zhu et al. 2016), en raison du développement des cyanobactéries, et à des changements dans la composition des gaz relâchés par les volcans (Gaillard et al. 2011). Durant cet épisode qualifié de *Grande Oxygénation*, la concentration en oxygène de l'atmosphère a augmenté de milliers de fois (ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène qui lui sont associées), entraînant la première extinction de masse chez les organismes exposés à l'atmosphère terrestre (Mendez-Romero et al. 2022). Les survivants ont alors développé diverses stratégies pour faire face à la toxicité de l'oxygène.

Dans son article de 1967 sur la théorie de l'endosymbiose, Lynn Margulis (Sagan au moment de la publication de son article) a suggéré que l'intégration d'une  $\alpha$ -protéobactérie par un procaryote aérobic a permis de survivre à la toxicité de cette atmosphère nouvellement enrichie en oxygène ; il s'agirait d'ailleurs de l'évènement majeur à l'origine des eucaryotes (Sagan 1967).

Par la suite, le développement d'une relation obligatoire entre l'hôte et le symbiote a induit une réduction en gènes non indispensables à la survie de l'endobactérie (*e.g.* éléments de synthèse de la paroi, élimination de fonctions génétiques déjà codées par le noyau de l'hôte), ainsi qu'à la limitation de certains transferts de gènes (Bock 2017). On distingue les transferts qui se sont faits entre noyau et endobactérie dans un premier temps (Transferts de Gènes Horizontaux ou HGT), et entre les premiers organites formés et le noyau dans un second temps (Transferts de Gènes Endosymbiotiques ou EGT) (Timmis et al. 2004; Keeling and Palmer 2008). Ces transferts (EGT) sont nombreux, au point que la régulation de l'expression des gènes des organites se fait par des mécanismes post-transcriptionnels impliquant des protéines nucléaires (du noyau de la cellule). Tous les facteurs de transcription mitochondriaux identifiés chez la levure ou chez les mammifères sont, en outre, codés par le



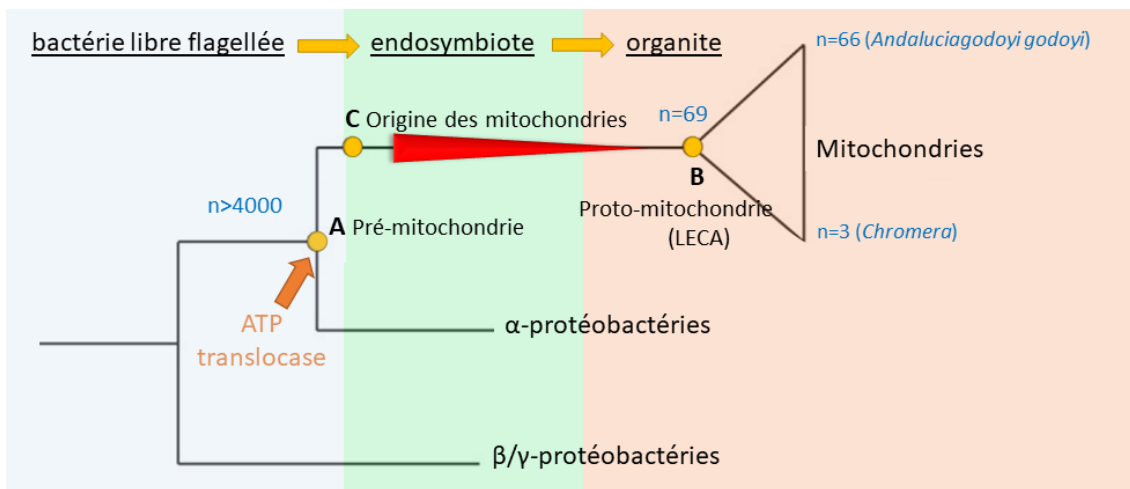
génomique nucléaire uniquement. C'est également le cas chez les plantes, à l'exception de l'ARN polymérase des plastes dont les séquences sont localisées dans le génome des chloroplastes.

Aussi, on estime que les protéines mitochondriales dont les gènes sont codés par le génome de l'organite représentent moins de 1% du protéome mitochondrial (Woodson and Chory 2008; Calvo and Mootha 2010; Hagström and Andersson 2018). Ces protéines, synthétisées dans le cytosol, nécessitent une importation dans les mitochondries via des pores membranaires par capture d'une séquence d'adressage vers la mitochondrie.

Par ailleurs, les séquences intégrées au noyau eucaryote n'incluent pas seulement des séquences codant la synthèse de protéines mitochondriales, mais également des séquences non codantes issues de fragments de séquences mitochondriales (Nuclear Mitochondrial Pseudogenes ou NUMTS) qui peuvent être à l'origine de pathologies génétiques lorsque ces fragments s'insèrent (et de manière préférentielle) dans des régions géniques codantes (Kleine et al. 2009; Hazkani-Covo et al. 2010). Même si elles résident dans le noyau, ces séquences intégrées, codantes ou non, sont proches de celles de gènes bactériens (Searcy 2003) et sont de ce fait plus facilement identifiables qu'un transfert entre génomes eucaryotes, en raison d'une plus forte distance phylogénétique entre eucaryotes et bactéries. Les recherches d'alignement (BLAST) sur gènes eucaryotes à partir de gènes bactériens permettent l'identification des gènes nucléaires dérivés de la mitochondrie, mais également de reconstruire le métabolisme de l'ancêtre mitochondrial. Wang et Wu ont profité, il y a quelques années, de l'enrichissement des bases de données en génomes bactériens (plus particulièrement ceux d' $\alpha$ -protéobactéries) pour rechercher ces gènes. 4 459 gènes de 394 familles ont été identifiés comme dérivés de mitochondries à partir de 30 génomes eucaryotes différents. Les familles de gènes devaient être présentes dans au moins deux lignées d' $\alpha$ -protéobactéries et eucaryotes, pour éviter de compter les transferts de gènes récents spécifiques à une lignée (Wang and Wu 2014). Les chercheurs ont également pu constater que la prémitochondrie possédait une translocase ATP/ADP de type plastide/parasite (et qui servait à importer l'ATP de l'hôte, voir Figure 3), ce qui fait de la prémitochondrie un parasite énergétique (et mobile, car de nombreux gènes flagellaires ont été retrouvés). Ces données contrastent directement avec le rôle actuel de l'organite en tant que principal producteur d'énergie de la cellule (Wang and Wu 2014).

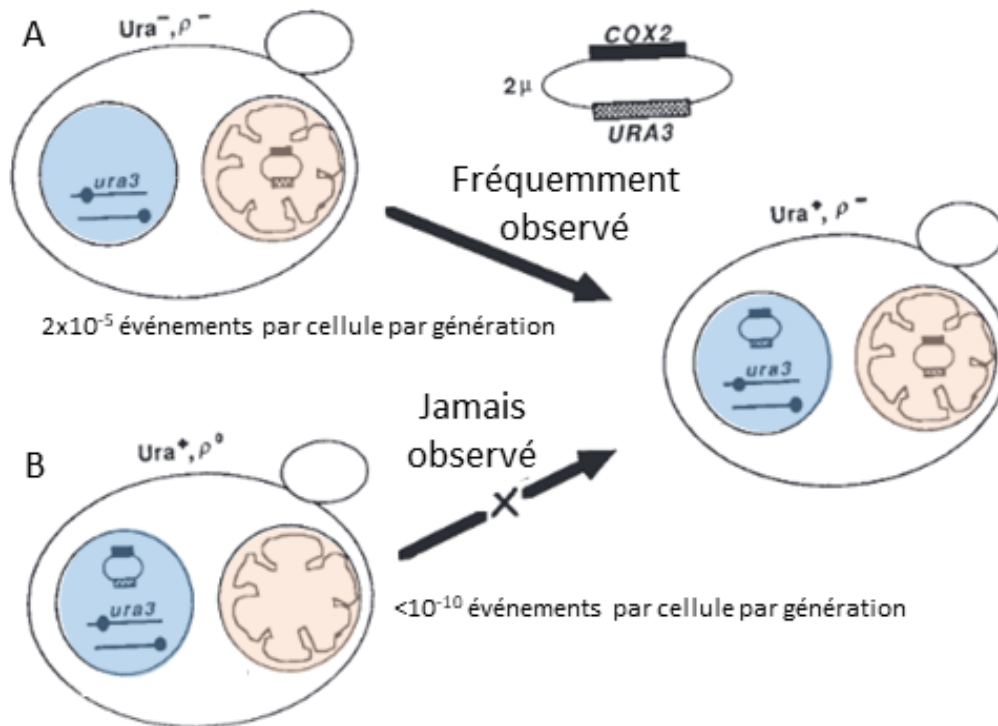


D'un point de vue empirique, Thorsness et Fox ont historiquement développé le premier test permettant la détection d'ADN transféré des mitochondries au noyau cellulaire, sur la levure de boulanger *S. cerevisiae* (Thorsness and Fox 1990). Par l'introduction dans les mitochondries d'un plasmide portant un gène marqueur, URA3, présenté Figure 4 dont l'expression ne peut avoir lieu que depuis le noyau, ils ont montré que de l'ADN mitochondrial (ADNmt) pouvait migrer vers le noyau à la fréquence de  $2 \cdot 10^{-5}$  par cellule et par génération (la sortie des mitochondries et la pénétration du noyau étant observées par l'expression du gène dans des cellules auxotrophes pour l'uracile (*Ura-*) et poussant en milieu sélectif).



**Figure 3 :** Reconstruction phylogénétique de l'évolution ayant mené des pro et pré mitochondries à l'endosymbiote mitochondrial actuel. Ces dernières années, l'enrichissement des banques génomiques a permis de reconstruire l'ancêtre commun de toutes les mitochondries contemporaines (la proto-mitochondrie), présent chez le dernier ancêtre eucaryote commun (LECA pour Last Eukaryotic Common Ancestor), mais pas sur la pré-mitochondrie, plus informative, qui est le dernier ancêtre commun des mitochondries et du clade sœur, les  $\alpha$ -protéobactéries. Dans l'histoire évolutive du symbiote à l'organite, les chercheurs distinguent deux phases : 1) une première période de réduction massive du génome du symbiote (en rouge) précédant LECA où tous les mitogénomes possèdent 69 gènes codant des protéines ancestrales (protéines, n'inclut pas ici les gènes codant ARN ribosomiaux et ARN de transfert) ; 2) Une seconde phase de réduction du génome, plus hétérogène. On retrouve notamment 66 des 69 protéines ancestrales chez *Andaluçia godoyi*, une espèce eucaryote unicellulaire appartenant au règne biologique des excavés (contre 13 protéines chez la plupart des métazoaires), contre seulement 3 chez *Chromera* (famille Alveolata comprenant *Plasmodium*, plus petit génome mitochondrial). Figure adaptée de Wang et Wu 2014.





**Figure 4** reprenant le schéma expérimental de (Thorsness and Fox 1990) : Un plasmide contenant le gène URA3, l'origine de répllication  $2\mu$  (spécifique des levures), ainsi que le gène mitochondrial COX2 peut être maintenu dans le noyau de la cellule (en bleu), dans la mitochondrie (en orange), ou dans les deux compartiments. (A) Une cellule de levure contenant le plasmide dans ses mitochondries donne fréquemment des cellules filles contenant le plasmide dans les deux compartiments cellulaires. (B) En revanche, aucun transfert de plasmide du noyau à la mitochondrie n'est observé.



Les différents stades intermédiaires de transfert de matériel génétique des mitochondries au noyau ont été très largement décrits chez les plantes. Par exemple, l'expression du gène mitochondrial *coxII* a été étudiée chez les légumineuses : certaines espèces possèdent des copies nucléaires et mitochondriales intactes du gène, d'autres présentent une perte de l'intégrité du gène mitochondrial au profit d'une expression nucléaire, après activation du gène et sélection (Adams et al. 1999). D'autre part, un transfert de gènes d'une protéobactérie à l'ancêtre commun des rhodoplastes (organelles des algues rouges) a également été mis en évidence par des analyses phylogénétiques chez les algues (Delwiche and Palmer 1996; Rice and Palmer 2006). Enfin, certains cas de transferts d'un gène codant une protéine fonctionnelle du noyau aux mitochondries ont également été décrits, notamment chez *Arabidopsis thaliana* (gène orf164, (Qiu et al. 2014), ce qui montre que, contrairement à ce que proposaient Thorsness and Fox, la dynamique des génomes n'est pas complètement unilatérale (Sloan et al. 2018) .

Le transfert de matériel entre les génomes ayant été montré, une double interrogation s'est alors posée : comment ? Et pourquoi y-a-t-il eu une évolution asymétrique en faveur d'une réduction des génomes cytoplasmiques (mitochondries comme chloroplastes d'ailleurs) ? Dans une revue parue en 2018, Sloan et ses collaborateurs proposaient 3 mécanismes expliquant la **réduction de génomes mitochondriaux** :

1) une perte de gènes due à la **baisse de pression de sélection** ou redondance de gènes vis-à-vis de gènes nucléaires : la perte de certains gènes mitochondriaux au sein d'un hôte s'explique ainsi par un relâchement de la pression de sélection sur les gènes non essentiels, qui vont accumuler des mutations et finir par disparaître. Ainsi, dans des milieux pauvres en oxygène par exemple, une transition des mitochondries vers la perte des gènes codant la chaîne respiratoire a pu être observée chez certains protistes (Hagström and Andersson 2018). Cependant, les mitochondries et plus largement les génomes de symbiotes doivent continuer à coder des gènes essentiels à la survie de l'hôte pour rester fixés (Allen 2015; Allen and Martin 2016).

2) des **transferts de gènes** du symbiote au noyau (**EGT**) : Katrin Henze et William Martin ont publié une revue d'opinion en 2021, dans laquelle ils discutent des processus d'intégration du génome mitochondrial au noyau cellulaire. Ils présentent les preuves soutenant une intégration au noyau après transcription inverse d'ARNm modifié et épissé, après passage par



de l'ADN complémentaire (Henze and Martin 2001). Ils discutent également de transferts directs de parties importantes d'ADN mitochondrial vers le noyau que l'on peut retrouver chez certains modèles, notamment un tronçon de 620 kb présent dans le génome de l'espèce végétale *Arabidopsis thaliana* (le génome mitochondrial humain, à titre de comparaison, fait 16,569 kb).

3) Le **recrutement de gènes nucléaires** pour le fonctionnement de l'endosymbiote puis organite.

L'intégration du génome mitochondrial dans le noyau de la cellule eucaryote doit répondre à un problème majeur : les systèmes de lecture doivent être comparables. L'origine du code génétique représente l'un des problèmes les plus complexes de l'évolution moléculaire (Gonzalez et al. 2012). Il est une caractéristique universelle importante des organismes existants, et indique une origine commune des différentes formes de vie. Il existe cependant des variants connus de lecture de ce code, principalement divisés en classes mitochondriales et nucléaires (Gonzalez et al. 2012). Des exemples sont présentés Tableau 2.

Les mitochondries sont également caractérisées par diverses tailles de génomes (voir Tableau 3), le plus petit étant celui de *Plasmodium falciparum* (car ce dernier dépend des apports énergétiques de son hôte). Des tailles plus importantes sont retrouvées chez les plantes, entre 20 et 250 kpb (Morley and Nielsen 2017). L'augmentation de la taille est due en grande partie ici à des séquences répétées, à des régions non codantes riches en AT, à de grands introns (exemple d'*A. thaliana* plus haut) et à des séquences non codantes. Les génomes mitochondriaux des plantes contiennent également des quantités assez importantes de séquences génomiques nucléaires et chloroplastiques relativement courtes qui semblent avoir été intégrées à un moment donné de l'évolution, et qui soulignent la relation étroite entre les génomes.

Classiquement, chez les métazoaires, les mitochondries codent 37 gènes : **13 sous-unités de protéines** de la chaîne respiratoire (ou ETC pour *Electron Transport Chain*, 7CI, 1CIII, 3CIV et 2CV), ce qui veut dire qu'une soixantaine de gènes codant les sous-unités des complexes ETC se trouvent donc dans le génome nucléaire, et que ces mêmes protéines sont des assemblages chimériques (Sloan et al. 2018) ; **22 ARN de transfert** (ARNt) ; et **2 ARN**





**ribosomaux** (ARNr). Notons que les gènes mitochondrio-nucléaires (situés dans le noyau) muteraient 5 à 50 fois plus que les autres gènes nucléaires (Meyer 2008).<sup>i</sup>

**Tableau 2:** exemples de divergences du code génétique des mitochondries de vertébrés, invertébrés et levure *en comparaison au code génétique nucléaire de vertébrés*, pour un même triplet de codons. Les acides aminés basiques sont en mauve, les acides aminés apolaires en jaune, et les polaires en vert. Plus d'une vingtaine de codes génétiques ont été décrits, et compilés sur NCBI à l'adresse suivante :

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi>.

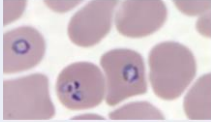



*On peut noter le caractère dégénéré/redondant du code génétique, un même triplet de codons peut coder un même acide aminé.*

Codon	Code génétique			
	standard (nucléaire)	mitochondries vertébrés	mitochondries invertébrés	mitochondries levures
AGA	Arginine	STOP	Serine	Arginine
AGG	Arginine	STOP	Serine	Arginine
CUA	Leucine	Leucine	Leucine	Threonine
CUC	Leucine	Leucine	Leucine	Threonine
CUG	Leucine	Leucine	Leucine	Threonine
CUU	Leucine	Leucine	Leucine	Threonine
UAA	STOP	STOP	STOP	STOP
UAG	STOP	STOP	STOP	STOP
UGA	STOP	Tryptophane	Tryptophane	Tryptophane

<sup>i</sup> NB: Il existe des peptides dérivés des mitochondries (des gènes dans les gènes), qui joueraient sur le métabolisme (Wang and Wu 2014).



**Tableau 3:** Taille du génome mitochondrial chez différentes espèces

Espèce	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Isarachnanthus Nocturnus</i>	Plants
Taille du génome mitochondrial	5967 bp	16569 bp	80923 bp	200 à 2500 kbp (366 924 bp chez <i>Arabidopsis thaliana</i> )
Nom commun	Plasmodium 	Homme 	Cérianthe rayé (anémone) 	Arabette des dames 



#### D. Importance de la rétention du génome mitochondrial dans le cytosol

Les cellules eucaryotes se distinguent des cellules procaryotes par leur taille, plus importante (même si variable), leur organisation structurée (noyau, réticulum endoplasmique), ainsi que par la taille de leur génome et de la richesse de leur protéome. A cela s'ajoutent des coûts énergétiques d'expression et de réplication géniques plus importants (Lane and Martin 2010). Cette complexité nécessite le soutien de structures productrices d'énergie. Ainsi, les mitochondries apportent de l'énergie aux cellules sous forme d'ATP, via la phosphorylation oxydative. Ce processus fait intervenir les complexes de la chaîne respiratoire de la membrane interne mitochondriale, ainsi que l'ATP synthase, enzyme qui phosphoryle l'ADP en ATP.

Les fonctions mitochondriales sont très conservées (Burger et al. 2003), et la compartimentation du métabolisme permet de palier les besoins importants des cellules eucaryotes en améliorant l'efficacité dudit métabolisme. Elle permet en effet de plus grandes concentrations d'enzymes au niveau mitochondrial, ce qui induit de ce fait une production plus rapide d'énergie (McInerney et al. 2015). A cela s'ajoute, en lien avec ce rôle clé, une protection de l'intégrité du génome nucléaire. En effet, beaucoup de dommages à l'ADN sont causés par des espèces réactives à l'oxygène (ERO, ROS<sup>i</sup> pour reactive oxygen species en anglais), dont la principale source provient de la réduction de l'oxygène au niveau de la chaîne respiratoire des mitochondries. On estime ainsi que 4% de l'oxygène consommé est relâché sous la forme d'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , qui peut être à l'origine de la production de ROS comme le radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$ , ou encore le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Searcy 2003). Le chiffre varie en fait de 0.2 à 5% selon les tissus et les sources bibliographiques (Li et al. 2013; Nakai and Tsuruta 2021). Néanmoins, si la compartimentation protège le génome nucléaire, l'ADNmt reste très exposé à ces éléments mutagènes qui se concentrent principalement dans l'organite : l'ADNmt mute dix à vingt fois plus que l'ADN nucléaire (ADNn) (Haag-Liautard et al. 2008). On estime ainsi que chez un homme de 65 ans, la moitié des mitochondries sont altérées (Searcy 2003). Ces mutations entraînent des dysfonctions des protéines de la chaîne respiratoire et une accumulation de radicaux libres, et donc des dommages croissants de

---

<sup>i</sup> Considérant l'omniprésence du sigle ROS, à l'oral comme à l'écrit, il sera préféré dans ce manuscrit à son homologue français.

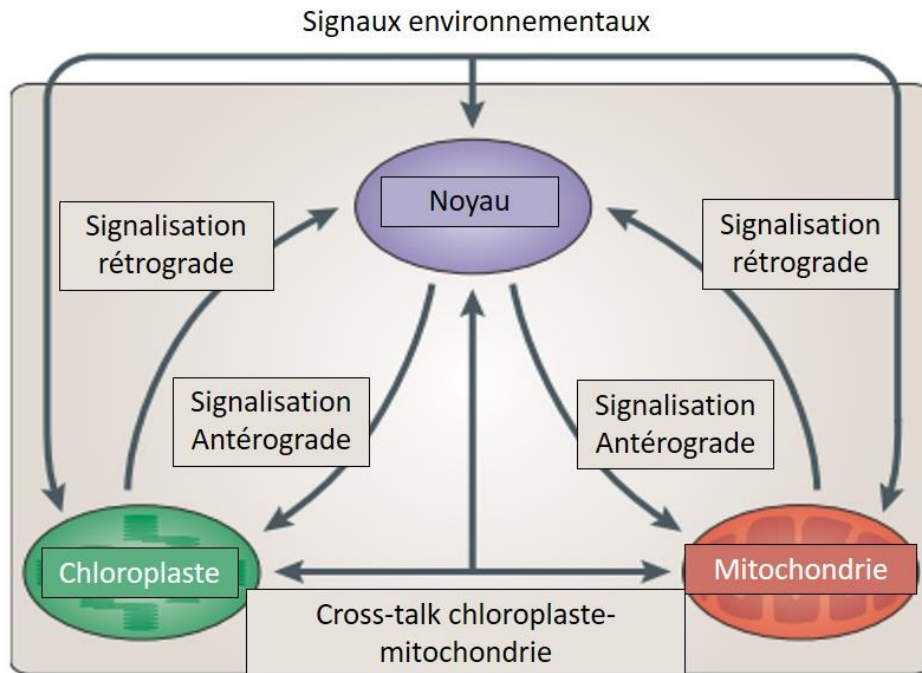


l'ADNmt, ce qui participe *in fine* aux dégénérescences liées au vieillissement (Pollack and Leeuwenburgh 2001).

Les gènes qui ont été retenus au sein de la mitochondrie au cours de son histoire évolutive codent les protéines impliquées dans la chaîne de transport des électrons, dans la transduction énergétique, dans le maintien de la balance redox mitochondriale, ainsi que les protéines impliquées dans le contrôle de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) (Ricchetti et al. 2004).

Le maintien des organelles au cours des divisions cellulaires ainsi que la synthèse de protéines mitochondriales à partir de deux génomes séparés et compartimentés impliquent une coordination fine de l'expression des gènes des différents génomes présents au sein de la cellule. Ce dialogue est nécessaire à la production de concentrations adéquates de protéines pour maintenir le fonctionnement de la mitochondrie (Woodson and Chory 2008; Hagström and Andersson 2018). Les protéines à fonction mitochondriale synthétisées dans le cytosol doivent acquérir des signaux pour la reconnaissance et le transport vers la mitochondrie. Elles sont en grande majorité synthétisées avec une pré-séquence peptidique de ciblage mitochondrial (MTP pour Mitochondrial Targeting Peptide) en N-terminal. Cette importation est réalisée via deux complexes : le TOM (Translocase Outer Membrane) dans la membrane externe, et le TIM23 (Translocase Inner Membrane), situé dans la membrane interne. Une fois entrées à l'intérieur de la mitochondrie, les pré-séquences sont clivées par des peptidases et autres protéases, ce qui génère la forme mature de la protéine (Dudek et al. 2013).





**Figure 5** (d'après Woodson et Chory) : Signalisations antérograde et rétrograde intervenant dans la coordination des génomes au sein de la cellule (ici une cellule végétale, contenant un troisième génome chloroplastique).

Certains signaux environnementaux tels que le stress, la disponibilité en dioxygène ( $O_2$ ) ou en nutriments, les signaux de développement ou encore les hormones affectent l'expression des gènes nucléaires qui codent les fonctions mitochondriales par des mécanismes antérogrades (Figure 5). Inversement, les mitochondries peuvent détecter certains stimuli environnementaux qui peuvent affecter leur activité fonctionnelle. Par l'émission de signaux rétrogrades, elles rebasculent ces stimuli reçus et leur état fonctionnel au noyau, ce qui conduit à la régulation des gènes nucléaires codant pour des fonctions mitochondriales. Il apparaît important de s'assurer que le noyau est capable de réguler suffisamment l'ADNmt, ce qui nécessite un niveau de compatibilité entre les deux génomes qui dépend de la distance évolutive qui les sépare (Bowles et al. 2007). Une incompatibilité potentielle n'est pas sans importance évolutive, puisqu'elle contribue à l'existence d'une barrière reproductive inter-espèces (Holmbeck et al. 2015). Le dialogue entre noyau et mitochondrie, essentiel, est plus ou moins maintenu entre les générations par des mécanismes tels que la transmission uniparentale et maternelle chez la majorité des métazoaires, ainsi que la réduction du nombre de mitochondries lors de l'ovogenèse, qui favorise l'homoplasmie, c'est-à-dire l'absence de polymorphisme mitochondrial (Ballard and



Whitlock 2004). Et comme il existe toujours des exceptions pour confirmer la règle, un héritage doublement uniparental (ou plutôt une hérédité biparentale) a été spécifiquement décrit dans le clade de bivalves comprenant notamment la cyprine, ou praire d'Islande *Arctica islandica* (Breton et al. 2007; Breton and Beaupré 2007). Les femelles sont homoplasmiques et ne possèdent que l'ADNmt maternel. En revanche, les mâles sont hétéroplasmiques et porteurs d'un mélange d'ADNmt maternel et d'ADNmt paternel. Un facteur génétique d'origine nucléaire, présent dans l'œuf, jouerait un rôle essentiel dans le maintien des mitochondries paternelles chez les futurs mâles en interférant avec le système d'ubiquitination, qui normalement les élimine. Les mitochondries issues du sperme sont préférentiellement dirigées vers les cellules primordiales qui formeront les organes reproducteurs, favorisant ainsi la prédominance de l'ADNmt paternel dans la lignée germinale masculine.

### 3. Mitochondries et médecine légale : résolution d'énigmes historiques

L'Histoire et la médecine légale sont deux domaines que j'affectionne particulièrement. Pour conclure la section consacrée à la présentation de la structure de la mitochondrie, je trouvais donc intéressant de présenter trois enquêtes ayant été « résolues » grâce à leur concours.

En règle générale, l'identification humaine à des fins médico-légales est définie par un ensemble de marqueurs génétiques nucléaires/chromosomiques (autosomes et chromosome Y), sous la forme de courtes répétitions en tandem de 2 à 7 pb (i.e. pair de bases) que l'on appelle STRs pour Short tandem repeats, ou encore microsatellites. Ces STRs constituent une combinaison pratiquement unique à chaque individu. Le nombre de répétitions définit le type allélique, et l'on parle alors de génotypage STR (Doutremepuich 2012).

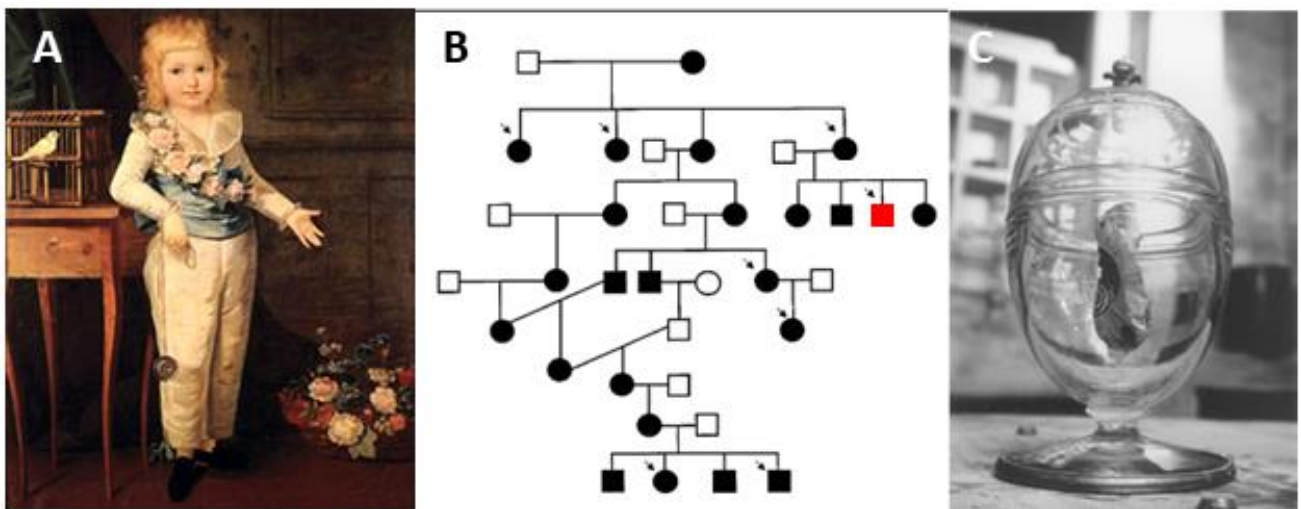
La séquence d'ADNmt, en revanche, ne se réfère pas à un individu, mais à un groupe d'individus d'une même lignée maternelle, transmise de la mère à l'enfant (Figures 6B et 7C). Cet ADN ne possède pas d'unités répétitives. Aussi étudie-t-on les deux régions hypervariables nommées HV1 et HV2 par séquençage (qui composent la région contrôle de l'ADNmt, non codante, dont les variations définissent les haplogroupes/lignées<sup>i</sup>), et les résultats sont

---

<sup>i</sup> Je conseille le livre de vulgarisation de Bryan Sykes, « The Seven Daughters of Eve »



obtenus par comparaison avec une séquence de référence (Syndercombe Court 2021). Le matériel mitochondrial constitue un bon complément des analyses microsatellites dans les affaires criminelles pour plusieurs raisons : **i)** Il n'est pas toujours possible d'obtenir un profil d'ADN nucléaire, comme dans le cas d'ADN fortement dégradé, d'ossements et d'échantillons de cheveux sans bulbes pileux. L'ADN mitochondrial « résiste » mieux aux conditions environnementales et présente un plus grand nombre de copies que l'ADN nucléaire (Latham and Miller 2018), rendant l'obtention d'ADNmt analysable plus probable. Il y a, rappelons-le, plusieurs copies de génomes mitochondriaux par mitochondrie, et plusieurs mitochondries par cellule. **ii)** Les organites sont transmis verticalement par la lignée maternelle et sont présents à l'identique chez les enfants, ce qui permet d'établir des liens familiaux sur plusieurs générations, par exemple dans les cas de personnes disparues où il n'existe pas de référence familiale directe (comme dans le cas de victimes de catastrophes, avec un exemple du HMS Titanic dans la revue de Syndercombe Court, ou encore de corps retrouvés dans des charniers (Zupanič Pajnič et al. 2010)).



**Figure 6** : Enquête sur le dauphin Louis Charles de France. Portrait par Elisabeth-Louise Vigée-Lebrun (A). Arbre généalogique, avec lignée maternelle en noir (B). Les échantillons de l'analyse Naundorff/cœur sont indiqués par une flèche noire (par convention, les femmes sont représentées par des ronds, les hommes par des carrés). Le dauphin est indiqué en rouge. Urne en cristal contenant possiblement le cœur de Louis XVII (C), conservée à la Basilique Saint-Denis (Seine-Saint-Denis). B et C sont issus de l'article de Jehaes et al., 2001.



## A. Enquête n°1 : Identification du cœur de Louis-Charles de France (Louis XVII)

Le 8 juin 1795, ou 20 prairial de l'an III de la République, l'enfant détenu dans la tour du Temple, à Paris, est exécuté peu avant trois heures de l'après-midi (Delorme 2021). Louis Charles de France, héritier du trône (Figure 6A), est mort (son frère aîné, de santé fragile, étant décédé pendant les Etats généraux, en 1789). Cependant, la rumeur court selon laquelle le véritable Louis XVII se serait échappé. Ainsi, au XIXe siècle, plus d'une centaine d'imposteurs vont prétendre être le Dauphin, évadé du Temple. L'un de ces Louis présumés, Carl Wilhelm Naundorff, décédé en 1845 à Delft (Pays-Bas), a fait l'objet d'une enquête approfondie commandée par les Bourbons, les héritiers de Naundorff continuant de se réclamer de la famille royale (Jehaes et al. 1998). Afin de confirmer l'imposture de Naundorff, des séquences HV1 et HV2 mitochondriales ont été extraites de ses ossements, et comparées i) aux séquences obtenues à partir des cheveux de deux sœurs de Marie-Antoinette, et de Marie-Antoinette elle-même, ii) aux séquences obtenues à partir d'échantillons d'ADN de deux parents vivants de la lignée maternelle (Habsbourg), Anne de Roumanie et son frère André de Bourbon-Parme. Les liens de parenté sont résumés Figure 6B. La séquence d'ADNmt a montré deux différences de nucléotides par rapport aux séquences des trois sœurs et quatre différences par rapport aux séquences des héritiers de la lignée maternelle des Habsbourg. Sur la base de ces éléments, l'imposture a été confirmée (Jehaes et al. 1998).

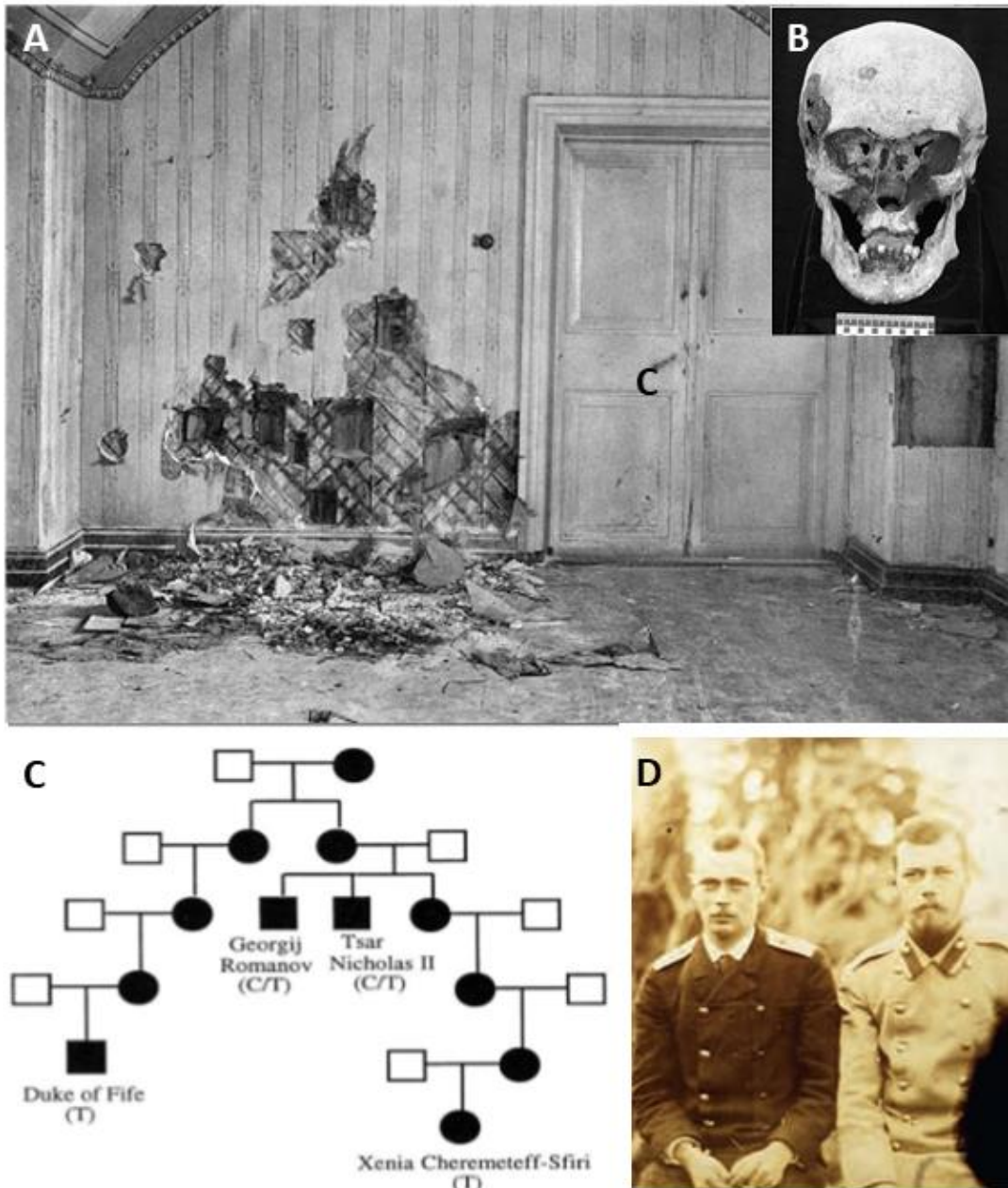
Dans une seconde étude, l'analyse de l'ADNmt a été effectuée sur le cœur du jeune garçon décédé à la prison de Paris en 1795, et conservé dans la nécropole royale de la basilique Saint-Denis (Figure 6C). NB : Le cœur supposé du dauphin a énormément voyagé, et n'a finalement trouvé sa place dans la nécropole royale qu'en 1895 ! Afin d'obtenir les preuves les plus robustes possibles, deux laboratoires ont analysé en parallèle les échantillons du cœur. Les résultats ont montré que la séquence consensuelle d'ADNmt du cœur était identique à celle des parents maternels de Louis XVII (Jehaes et al. 2001), ce qui permet d'étayer la thèse selon laquelle le cœur est bien celui du dauphin, et confirmer qu'il s'agit au moins de celui d'un Habsbourg (une confirmation de l'identité du dauphin nécessiterait quant à elle un génotypage STR). Les auteurs ajoutent, pour appuyer leurs résultats, que les séquences extraites de la famille Habsbourg sont très singulières, et n'ont pas été observées dans une collection de plus de 1700 séquences d'ADNmt européen.<sup>i</sup>

---

<sup>i</sup> Des analyses complémentaires ont été effectuées sur les restes de Naundorff par Gérard Lucotte qui contredisent la supercherie, mais les résultats, comme le chercheur, sont très controversés.







**Figure 7 :** Sous-sol de la maison Ipatiev, où les exécutions ont eu lieu (A). Crâne du Tsar présentant des traces causées par des coups de crosses de fusil (B). Ces deux photos viennent de l'article de Byard. Lignée mitochondriale du tsar, avec, entre parenthèse, la nature du nucléotide en position 16169 (C), arbre issu de l'article d'Ivanov. Photo du tsar (à droite) et son frère George Aleksandrovitch Romanov (D).



## B. Enquête n°2 : Identification de la dépouille du Tsar Nicolas II.

Nicolas II, tsar de toutes les Russies, abdique quelques jours après la première phase de la révolution russe, en février 1917. En octobre de la même année, les bolcheviques s'emparent du pouvoir, et la famille impériale, sous surveillance, est transférée quelques mois plus tard à Ekaterinbourg, dans la maison de l'ingénieur Ipatiev. Après quatre mois d'internement, en raison de la progression de l'armée blanche (armée contre-révolutionnaire fidèle au tsar), le général Berzine, à la tête de l'armée bolchevique dans la région, donne l'ordre d'exécuter toute la famille et de faire disparaître les corps. Dans la nuit du 16 au 17 juillet 1918, au sous-sol de la maison Ipatiev, le tsar Nicolas II, sa femme et ses cinq enfants, ainsi que le médecin du tsarévitch et trois domestiques sont fusillés. Les corps sont mutilés, et ensevelis dans une fosse commune au fond de la forêt de Koptiaki (Byard 2020). Il faudra attendre 1991 et la fin de l'union soviétique pour que les corps, retrouvés quelques années plus tôt, soient exhumés (voir Figure 7A et B). En 1994, une étude est effectuée au Royaume-Uni à partir d'ADN nucléaire et mitochondrial extraits des restes humains de cinq sujets correspondant potentiellement aux Romanov. Les comparaisons se font avec plusieurs apparentés vivants, du lignage de la tsarine d'une part, et de celui du tsar d'autre part (Gill et al. 1994). Les résultats ont montré qu'il s'agissait bien de la tsarine et de 3 de ses filles (car séquences mitochondriales identiques). L'identification du tsar Nicolas II s'est quant à elle révélée plus ardue, son ADN mitochondrial n'étant pas tout à fait identique à celui de ses apparentés. En effet, une hétéroplasmie C/T a été identifiée chez le tsar, sur le nucléotide en position 16 169. Cette absence de concordance parfaite s'explique par le fait qu'une très faible proportion du pool d'ADNmt de la mère est dans ce cas transmise à la descendance. Ce goulot d'étranglement au moment de la reproduction expliquerait la rareté avec laquelle l'hétéroplasmie est observée, malgré un taux de mutation élevé de l'ADN mitochondrial. L'identité du tsar n'a été officiellement confirmée qu'après l'ouverture du sarcophage de son frère cadet, le grand-duc George Aleksandrovitch Romanov (mort d'un accident de motocyclette en 1899). Les analyses complémentaires ont montré que le grand-duc présentait la même hétéroplasmie (Ivanov et al. 1996), présentée sur l'arbre Figure 7D, ce qui a permis de convaincre les autorités russes de l'authenticité de ses restes.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Il faudra attendre 2007 pour retrouver les restes du tsarévitch et de l'une de ses sœurs, vraisemblablement Maria, qui avaient été enterrés plus loin (Coble et al. 2009).



## II. Vieillesse et mitochondries

Le médecin Français Xavier Bichat (fin XVIII<sup>e</sup>) voyait dans le vieillissement un attribut essentiel de la substance vivante. Il disait ainsi « la vie est l'ensemble des fonctions qui résistent à la mort », et « qu'il est de la nature des propriétés vitales de s'épuiser ; le temps les use dans le même corps » (Klarsfeld 2007). Mais **pourquoi vieillissons-nous et mourons-nous ?**

La quête de la jeunesse éternelle, la perspective de frôler l'immortalité et d'atteindre un âge semblable aux personnages bibliques ont exercé une grande fascination sur les sociétés humaines, qu'il s'agisse des domaines scientifiques et philosophiques, de la religion, ou encore de l'art et des croyances populaires (Lucke and Hall 2005). Par exemple, le poète grec Hésiode (VIII<sup>e</sup>-VII<sup>e</sup> siècle avant J.C) décrit dans son poème « Les travaux et les jours » que l'Age d'Or correspondait à une période au cours de laquelle la première race d'hommes vivait en harmonie avec les dieux (Hésiode 1814). Les hommes restaient jeunes, et ne connaissaient ni la fatigue, ni le travail, ni la vieillesse. En outre, bien que mortels, ils « *mouraient comme enchaînés par un doux sommeil* ». Zeus, irrité après que Prométhée a trompé les dieux et dérobé le feu sacré, a envoyé aux hommes la première femme, Pandore, un « *funeste présent* », pour se venger. C'est cette dernière, qui, en ouvrant la boîte, a libéré tous les maux de l'humanité dont la **vieillesse**, l'inexorable descente vers la mort.

L'homme a depuis longtemps essayé d'expliquer scientifiquement le phénomène de vieillissement. Il est possible de trouver des théories sur le sujet dès l'Antiquité, avec une composition des humeurs se modifiant avec un âge grandissant. En effet, la vieillesse s'explique par un long processus de refroidissement et d'assèchement développé dans le *Corpus hippocratique* (V<sup>e</sup> siècle avant JC) complété par Aristote et repris plus tard par Galien. Cette dyscrasie conduit à une perte de vigueur, que remarque également Pline l'Ancien à propos de modèles végétaux: les variétés d'arbres qui croissent rapidement sont celles qui vieillissent plus précocement, car elles s'épuisent aussi plus vite (Courtil 2018). Cela se rapproche, en un sens, de la théorie du taux de vieillissement présentée plus loin.



## 1. Définition du vieillissement

Pour pouvoir expliquer le vieillissement, encore faut-il s'accorder sur sa définition. Et la chose n'est pas si simple ! Il n'existe pas de véritable consensus sur ce qu'est le vieillissement ou sur la manière de le définir (Medvedev 1990; Cohen et al. 2020), puisqu'il est multifactoriel, et inclut, dans le cas de l'homme, en plus des aspects biologiques et médicaux, des facteurs psychologiques, sociaux et culturels.

Si l'on se place dans le cadre strict du vieillissement animal, qui plus est sauvage, on a longtemps pensé que les causes de mortalité extrinsèques telles que la prédation, les maladies ou encore les variations environnementales étaient largement prépondérantes dans la nature, empêchant ainsi aux organismes de présenter les stigmates du vieillissement (Kirkwood and Austad 2000; Sozou and Seymour 2004). En fait, la mortalité extrinsèque est un acteur de l'évolution du vieillissement (Dańko et al. 2018). La mise en place de protocoles de suivi sur le long terme de populations animales sauvages (i.e., par le biais de captures et de prises de mesures de traits d'histoire de vie ou physiologiques répétées au cours de la vie d'individus, (Nussey et al. 2008)) a permis de mettre en évidence une dynamique négative de certains traits associés à la fitness (valeur sélective) individuelle, c'est-à-dire des traits déterminants pour le succès de propagation des gènes de l'individu dans la population, comme par exemple la fécondité ou la survie (Kirkwood 2005).

En ce sens, les biologistes de l'évolution s'accordent sur les éléments suivants : plutôt que **vieillissement**, ils utilisent le terme « sénescence » qui peut être définie comme le **déclin progressif** et inévitable des **performances individuelles** à partir d'un certain âge dû à la détérioration de l'organisme, caractérisée démographiquement par une **augmentation de la mortalité** (c'est-à-dire une diminution du taux de survie, sénescence actuariale) et un **déclin de la fécondité** avec l'âge (sénescence reproductive). Cette altération peut se faire à des âges (« onset of senescence ») et des vitesses (« rate of senescence ») variables. Ces altérations s'accompagnent de modifications (e.g. ADN méthylation (Horvath 2013)) et de pertes de fonctions cellulaires et physiologiques (e.g. apoptose (Campisi 2003)), conduisant *in fine* à la mort (Williams 1957; Kirkwood 1977; Monaghan et al. 2008; Flatt 2012; Moorad et al. 2019). A titre d'exemple, la probabilité de décès augmente de manière exponentielle avec l'âge, et chez les êtres humains adultes, cette probabilité double tous les 5-7 ans (Ebeling et al. 2021). Une dernière remarque d'intérêt pour aider à la distinction entre sénescence et longévité est qu'il n'a été établi qu'une corrélation partielle entre sénescence et longévité chez les



organismes étudiés jusqu'à présent (mammifères, oiseaux ou amphibiens, (Péron et al. 2019; Cayuela et al. 2022b)). Ceci est attribué au fait que (i) la mortalité en début de vie affecte de manière plus prégnante la longévité moyenne ou maximale que la sénescence actuariale (Péron et al. 2019), et (ii) les espèces à durée de vie courte (« fast pace of life », voir plus loin) présentent une stratégie de reproduction itéropare très précoce et délayent ainsi dans le temps (relativement à des espèces à vie longue qui deviennent matures sexuellement plus tard dans la vie) l'impact négatif de l'investissement reproducteur sur leur sénescence : ils présentent ainsi des âges d'entrée en sénescence relativement plus vieux que les espèces longévives (Gavrilov and Gavrilova 2001), mais des taux de sénescence plus rapides (Gaillard et al. 2017). Les différents indicateurs du vieillissement et leur bonne utilisation pour les études phylogénétiques ont été décrits par Ronget et Gaillard (Ronget and Gaillard 2020).

Je ne m'étendrai pas ici en détail sur les différences interspécifiques de sénescence qui sont l'objet d'études très complètes et dont l'intérêt aussi bien fondamental qu'appliqué est illustré par de nombreuses publications (e.g., (Cayuela et al. 2020)). Cependant, il faut remarquer que les manifestations de la sénescence énoncées ci-dessus ne sont pas les mêmes selon où l'on se situe sur l'arbre du vivant. Ainsi, de nombreux organismes marins, tels l'hydre, ou encore la méduse et les anémones, ne présentent aucun signe apparent de vieillissement (Petralia et al. 2014). Le métabolisme des micro-organismes dans les sédiments des profondeurs marines est extrêmement lent. Il faudrait des centaines, voire des milliers d'années à chacune des cellules de Morono pour produire suffisamment d'énergie pour donner naissance à des cellules filles. Cela signifie donc que certaines cellules pourraient avoir des milliers d'années, et un suivi des performances de ces cellules paraît donc impossible à une échelle humaine (Røy et al. 2012). Pour illustrer une autre exception à l'échelle cellulaire, on peut également citer le cas particulier des cultures de cellules cancéreuses en laboratoire, des lignées immortalisées exploitant leur potentiel mitotique en principe infini (Kirkwood 2005). Parmi les vertébrés, les études menées sur les mammifères (e.g. (Gaillard et al. 2017)) et les oiseaux d'un côté (e.g. (Moller 2007)), et les ectothermes de l'autre (squamates) soulignent que la sénescence est une caractéristique commune des endothermes, mais bien plus variable chez les ectothermes (Ricklefs 2010). En effet, les ectothermes sont des sujets d'étude emblématiques pour l'étude de la sénescence puisque plusieurs espèces s'illustrent par leur absence d'altération du phénotype ou des performances avec l'âge (Cayuela et al.



2020), voire par une sénescence négative (i.e., une augmentation des chances de survie avec l'âge, (Vaupel et al. 2004)). Ce phénomène est potentiellement lié à l'évolution chez ces espèces d'une croissance continue à l'âge adulte, étant donné que la fitness dépend prioritairement de la taille corporelle (Arendt 2011). Des effets physiologiques sous-jacents liés à la voie de l'insuline semblent par exemple être impliqués dans ce lien croissance – sénescence positive (Barbieri et al. 2003; Austad and Hoffman 2018).

En dehors du contexte interspécifique, l'aspect primordial à retenir ici est que la prise en compte des trajectoires individuelles permet de distinguer la sénescence démographique (étudiée à partir des données populationnelles translationnelles) de la sénescence phénotypique individuelle (étudiée à partir des suivis longitudinaux) (Monaghan et al. 2008). Cette distinction a une importance primordiale puisque c'est elle qui a ouvert la voie à l'étude des différences individuelles de l'âge d'entrée en sénescence et de vitesse de ces modifications (taux de sénescence), et à l'étude explicative et expérimentale de cette variation. Dans notre contexte mécanistique du vieillissement de la présente thèse, cela s'avère d'une importance primordiale pour mettre à jour les caractéristiques structurelles ou physiologiques qui sont particulièrement impliquées (ici la mitochondrie) et des facteurs intrinsèques (par exemple le genre ou l'immunité (Galipaud and Kokko 2020; Metcalf et al. 2020) ou environnementaux (par exemple, la température, la restriction calorique ou la socialité, (Møller 2006; Lucas and Keller 2020; Cayuela et al. 2022a) responsables de sa modulation.

Le numéro spécial et séminal publié dans *Functional Ecology* sur le sujet en 2008 (Monaghan et al. 2008) puis complétés 12 ans plus tard, (Gaillard and Lemaître 2020) soulignait, parmi les points clefs à développer pour une meilleure compréhension de la sénescence, (i) la nécessité d'aller au-delà des mesures actuariales et reproductives individuelles et populationnelles en faisant le lien avec des données de santé, étendant ainsi le champ d'investigation à la durée de vie en bonne santé (Monaghan et al. 2008) , et (ii) de préciser les effets de facteurs environnementaux sur le vieillissement, notamment ceux induits par la socialité (Münch et al. 2008).





**Figure 8** : Les marqueurs clés du vieillissement (les premiers cités), figure adaptée de (López-Otín et al. 2013). S'ajoutent à ces premiers marqueurs une autophagie compromise, une perturbation du microbiome, une perte des propriétés mécaniques tissulaires, une dérégulation de l'épissage, et une inflammation chronique (Schmauck-Medina et al. 2022)

## 2. Les causes ultimes (origine évolutives) et proximales (mécanismes) du vieillissement

Presque tous les aspects du phénotype d'un organisme subissent des modifications avec l'âge, et le nombre de théories proposées pour expliquer cette complexité a foisonné, jusqu'à atteindre un nombre impressionnant : le gérontologue russe Zhores Medvedev dénombrait dans un article de 1990 plus de 300 théories pouvant en expliquer les mécanismes (Medvedev 1990). Jaeger et Cherin ajoutent que si elles sont légions, un grand nombre d'entre elles ne s'intéressent pas réellement aux causes, mais plutôt à l'aspect mécanistique de différents aspects de la sénescence, et qu'en ce sens, elles ne sont pas nécessairement contradictoires, mais plutôt complémentaires (de Jaeger and Cherin 2011). Aussi, de nombreux articles insistent sur la nature multifactorielle du vieillissement, ce qui a conduit à la proposition de hallmarks (marqueurs) du vieillissement (López-Otín et al. 2013, 2023; Schmauck-Medina et al. 2022) présentés Figure 8. Mais l'implication actuelle de ces mécanismes est le fruit d'une



histoire évolutive, de co-sélection et de co-variation de ces mécanismes avec les traits d'histoire de vie des organismes (i.e., de leur rythme de vie lent ou rapide).

### A. Causes évolutives du vieillissement

Le vieillissement est un phénomène complexe, et ne peut être sans doute pleinement expliqué par une seule théorie totalement intégrative (Kirkwood and Cremer 1982; Kirkwood and Kowald 2019). La première théorie évolutionniste de la sénescence a été proposée par Weismann à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle (Klarsfeld 2007), pour qui le vieillissement existe car il accélère le renouvellement des générations et permet de favoriser les individus les plus jeunes dans des conditions où les ressources et l'espace sont limités (cité dans (Flatt and Partridge 2018)). Cependant, cette explication reste basée sur l'idée selon laquelle la sélection naturelle agit à l'échelle de groupe d'individus, qui plus est caractérisée par l'âge, idée largement controversée à l'heure actuelle (Leigh 2010). Surtout, cette proposition ne répond pas à une question primordiale, qui est que la sénescence (pour rappel, l'augmentation de la mortalité avec l'âge), n'est pas contre-sélectionnée par la sélection naturelle au cours des générations, alors que c'est un phénomène qui limite la fitness individuelle.

Basés sur une approche génétique, les travaux de Medawar (et Haldane), étendus par Williams, font suite à la découverte de la structure en double hélice de l'ADN par Franklin, Watson, and Crick (en 1953). Les premiers ont proposé l'existence de la sélection d'un allèle ayant un effet négatif sur les performances seulement en fin de vie, dans la mesure où l'effet sur la reproduction est neutre en début de vie (on peut citer la chorée de Huntington, maladie autosomique dominante sur laquelle travaillait Haldane, et qui s'exprime à un âge de 40-50 ans). En ce sens la pression évolutive est moins forte pour maintenir la santé à un âge avancé (J.b.s Haldane 1941; Peter Medawar 1951). Pour Williams, l'effet peut être positif sur la reproduction en début de vie, et l'allèle sélectionné a donc des effets antagonistes suivant l'âge. Williams explique qu'il y a une préférence pour l'allocation des ressources vers la reproduction plutôt que vers la maintenance de l'individu âgé (Williams 1957). En conséquence, les mutations génétiques qui provoquent des effets délétères après la période de reproduction échappent à la sélection naturelle, ce qui conduit non seulement au vieillissement de l'individu, mais aussi à sa transmission aux générations suivantes (i.e., les allèles responsables ne sont pas contre-sélectionnés avant la reproduction). C'est l'existence de cette ombre sélective dans la vie d'un individu qui permet la transmission des mécanismes,





génétiques ou non-génétiques, à la génération suivante, et la persistance du vieillissement, et *in fine* à l'évolution des espèces.

Une théorie plus directement liée au compromis entre différents traits d'histoire de vie a été proposée par Kirkwood en 1977. Celui-ci a placé au cœur de la théorie du « **soma jetable** » le compromis énergétique entre la croissance, la reproduction et la maintenance de l'organisme (longévité) comme base universelle de la sénescence, en se basant sur le fait que les organismes disposent de ressources énergétiques limitées dans leur environnement. En d'autres termes, l'investissement dans la reproduction dans la première partie de la vie aura des répercussions sur la longévité à travers les effets délétères de l'impossibilité de disposer d'assez de ressources énergétiques pour assurer la maintenance des cellules somatiques (Kirkwood 1977; Kirkwood and Holliday 1979; Kirkwood and Austad 2000). Cette prédiction a trouvé de nombreuses validations empiriques (Crisuolo et al. 2008; Bouwhuis et al. 2010; Reichert et al. 2014), et s'applique à tout détournement de ressources de la maintenance de l'organisme qui peut être induit par l'interaction d'autres traits physiologiques (i.e., immunité (Sheldon and Verhulst 1996; Kirkwood 2005)).

L'ensemble de ces explications théoriques de l'évolution et de l'existence des variations de sénescence observables dans la nature s'intègre dans la théorie des traits d'histoire de vie, et est particulièrement en lien avec l'idée de compromis énergétiques entre fonctions physiologiques en lien avec les chances de survie des organismes. Ainsi, les taux de sénescence devraient être corrélés avec les taux de mortalité extrinsèque (Ricklefs 1998) : lorsque la mortalité extrinsèque est faible, les individus vivent généralement plus longtemps, ce qui permet (i) à la sélection naturelle d'agir sur une période plus longue et (ii) d'étaler des investissements reproductifs limités (e.g. nombre de jeunes produits annuellement) sur un nombre plus grand de saisons de reproduction, limitant ainsi les dommages induits (voir plus bas). Cela devrait entraîner un vieillissement plus lent et une durée de vie plus longue, car la sélection favorisera les mécanismes anti-vieillessement tout en ayant un effet inverse sur les mutations et les gènes aux effets pro-vieillessement, et/ou antagonistes pléiotropes. À l'inverse, si une espèce présente une mortalité extrinsèque élevée, peu d'individus vivront suffisamment longtemps pour que des systèmes anti-vieillessement soient sélectionnés ou pour que les mutations et les gènes ayant des effets antagonistes pléiotropes soient contre-sélectionnés. Cette espèce favorisera alors une reproduction précoce et un investissement



unitaire important pour maximiser le nombre de jeunes produits par événement de reproduction. L'ensemble de ces phénomènes conduit ainsi à un vieillissement plus rapide<sup>i</sup> et à une durée de vie plus courte.

Pour définitivement inscrire le compromis énergétique dans le contexte du vieillissement et des taux de vie, il faut comprendre comment l'ensemble de ces éléments peuvent être interconnectés. Basée sur une approche pleinement énergétique, Pearl proposa en 1928 la théorie du taux de vie de (rate of living), estimant que la longévité dépend de deux facteurs : i) la vitalité inhérente (quantité d'énergie à consommer dans sa vie, qui est stable entre tous les organismes) et ii) le taux de vie (vitesse à laquelle on va consommer ce potentiel). Ainsi, la vitesse à laquelle un individu vieillit est étroitement liée au taux de vie, qui se définit à travers le compromis d'investissement des ressources énergétiques disponibles (et limitées dans l'environnement) entre les traits d'histoire de vie comme la croissance, la reproduction d'un côté, et la maintenance somatique de l'autre. L'impact de ce compromis sera d'autant plus marqué que la disponibilité ou l'accessibilité aux ressources est contraignante (Boggs 2009). Le « taux de vie » est ainsi corrélé au taux métabolique spécifique basal (consommation d'oxygène basale corrigée par la masse) mais également au coût inhérent à chaque investissement (e.g. reproduction). Par exemple, il a été mis en évidence que le coût d'un événement de reproduction pour la survie était plus prononcé chez les espèces à courte durée de vie (tels que les rongeurs), tandis que le coût d'un événement de reproduction pour le succès reproducteur futur était plus marqué chez les espèces à longue durée de vie (Hamel et al. 2010). Il reste que cette dernière relation n'est pas étayée par des liens directs avec un coût en termes d'énergie divertie de la maintenance somatique (il s'agit ici de « fitness costs »). De même, certaines observations remettent en cause le lien négatif entre taux métabolique et longévité (Speakman et al. 2004), suggérant, sans entrer ici dans des détails qui sont développés ci-après et dans les articles de la thèse, des régulations fines à l'échelle de l'organisme entier ou de la cellule (Speakman et al. 2002; Speakman 2005).

En conclusion, les théories évolutives du vieillissement se basent au final sur une explication proximale qui repose sur les effets délétères d'un métabolisme élevé, notamment pendant la reproduction, sur le soma de l'organisme en accélérant sa détérioration progressive au cours

---

<sup>i</sup> Il faut cependant noter les effets distincts sur l'âge d'entrée et le taux de sénescence, voir plus haut.



du temps. Une des explications mécanistiques la plus généralement admise est que ces effets délétères sont induits par l'oxygène, indispensable à la production d'énergie cellulaire (ATP, **métabolisme**) et ces dérivés métaboliques toxiques (ROS, **vieillessement**) produits au sein de la **mitochondrie**.

## B. Causes proximales : parmi d'autres, la théorie radicalaire

La théorie des radicalaires du vieillissement est peut-être la théorie mécanistique du vieillissement la plus connue (Beckman and Ames 1998). Elle propose de relier le métabolisme et la longévité, suggérant que les dommages induits aux macromolécules par l'accumulation de radicaux libres dérivés de l'oxygène, et par conséquent du métabolisme mitochondrial, représentent une force motrice du vieillissement et un déterminant majeur de la durée de vie. Sur quelles caractéristiques précises de l'oxygène et de ces radicaux libres repose cette théorie ?

### *L'oxygène, un gaz toxique*

En 1774, en chauffant de l'oxyde de mercure, le chimiste anglais Joseph Priestley remarque un dégagement gazeux capable d'entretenir les combustions : l'oxygène (air déphlogistiqué, le terme d'oxygène sera proposé par Lavoisier). S'il s'agit d'un composé essentiel à la vie, le chercheur a lui-même été l'un des premiers à suggérer qu'il pourrait y avoir des effets indésirables du gaz. En 1775, il postule que bien que l'oxygène puisse être un médicament utile pour les malades, son utilisation régulière pourrait accélérer le métabolisme et épuiser prématurément les ressources du corps, à la manière d'une bougie qui se consume plus rapidement dans le gaz purifié que dans l'air que nous respirons (Zhu et al. 2016). Ce sont les travaux de Paul Bert en 1878 qui vont commencer à mettre en évidence la toxicité du gaz. Il a notamment montré que de fortes pressions partielles en oxygène provoquaient des effets toxiques, entraînant des crises de convulsions chez les scaphandriers (on parle d'ailleurs d'effet Paul Bert).

### *Théorie radicalaire du vieillissement (Harman, 1956)*

En 1956, Harman postule que l'utilisation d'oxygène provoque des lésions tissulaires dues à la production de radicaux libres. Le dioxygène  $O_2$  est essentiel pour le métabolisme aérobie en tant qu'accepteur final de la chaîne respiratoire, mais son métabolisme implique



la formation de molécules dérivées du dioxygène, les ROS, qui comprennent de nombreux radicaux libres. L'activité respiratoire produit ainsi du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , des anions superoxydes  $O_2^-$  et des radicaux hydroxyles  $OH\cdot$ . Nous avons vu un peu plus haut que la production de ces molécules extrêmement réactives n'est pas négligeable : par exemple, au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, environ 2% de l'oxygène est transformé en radicaux superoxydes ( $O_2^-$ ). Ces molécules induisent des réactions chimiques nocives qui sont susceptibles d'oxyder lipides, protéines, acides nucléiques cellulaires (ADN, ARN), induisant parfois des mutations et/ou des altérations irréversibles du fonctionnement cellulaire. Harman propose ensuite en 1972 que le fer et autres métaux physiologiques participent au métabolisme des ROS dans la cellule via la réaction d'Haber-Weiss. Les ROS seraient alors un sous-produit des réactions d'oxydoréduction qui endommageraient les molécules environnantes comme l'ADN mitochondrial (Harman, 1972).

### *Théorie des ROS mitochondriaux*

Les ROS proviennent principalement (90 %) de la réduction de l'oxygène dans la chaîne respiratoire des mitochondries. Ainsi, selon la théorie endosymbiotique, le vieillissement devrait avoir débuté il y a 1,6 milliard d'années avec la compartimentation des cellules et l'apparition des mitochondries. De plus, en raison de leur rôle dans la production de ROS, la théorie des radicaux libres du vieillissement a été étendue pour devenir la "théorie des radicaux libres mitochondriaux du vieillissement" (Beckman and Ames 1998). Je ne vais pas paraphraser ici les détails ou les références de la production de ROS par la mitochondrie, et son lien avec la consommation d'oxygène (niveau du métabolisme de l'organisme) qui sont exposés dans le chapitre III (revue). Il faut simplement retenir à ce stade que la production de ROS est inhérente au fonctionnement de la mitochondrie. Cette relation entre le fonctionnement de la chaîne respiratoire et la production d'espèces radicalaires est illustrée de manière simplifiée Figure 9. Les principes les plus communément admis stipulent :

**1.** Que la production des ROS mitochondriaux est positivement corrélée à la consommation d'oxygène, explicitant ainsi un mécanisme responsable de la longévité réduite des espèces à taux de vie rapide.

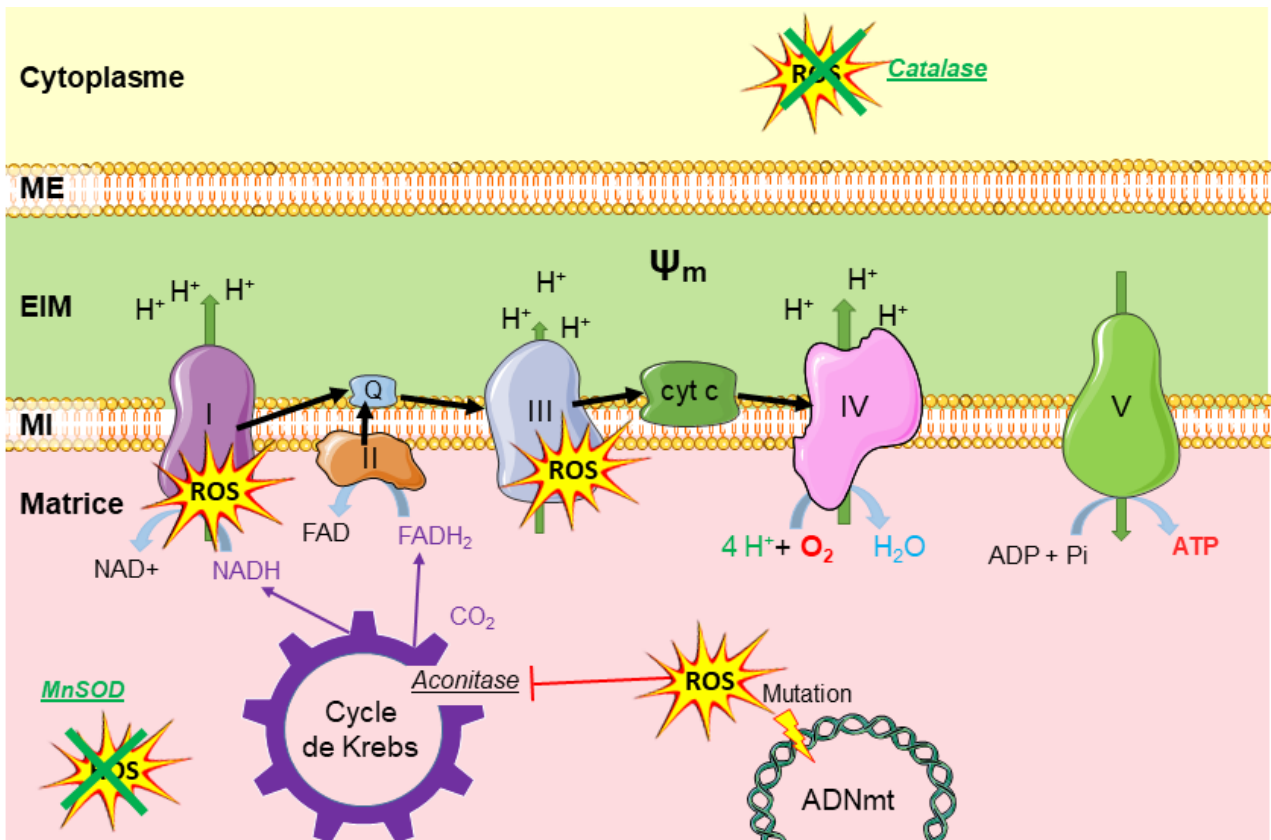


**2.** Que cette production est inévitable et doit être contrebalancée par des systèmes enzymatiques (e.g., catalase, superoxide dismutase) et non-enzymatiques (e.g., vitamines) spécifiques, appelés antioxydants. Le maintien de cet équilibre redox est illustré Figure 10. Les espèces longévives doivent donc avoir co-évolué plus de ces systèmes protecteurs que les espèces à taux de vie rapide.

**3.** Que la mitochondrie, en tant que centrale à la fois énergétique, productrice de ROS et effecteur cellulaire central dans le déclenchement de la sénescence et apoptose cellulaire (Moll and Zaika 2001; Estaquier et al. 2012), est une cible clef pour notre compréhension des mécanismes de vieillissement et de toute adaptation ayant conduit à l'émergence de longévités accrues (par exemple la maintenance mitochondriale à travers les phénomènes de fission/fusion ou de mitophagie (Schmauck-Medina et al. 2022)).

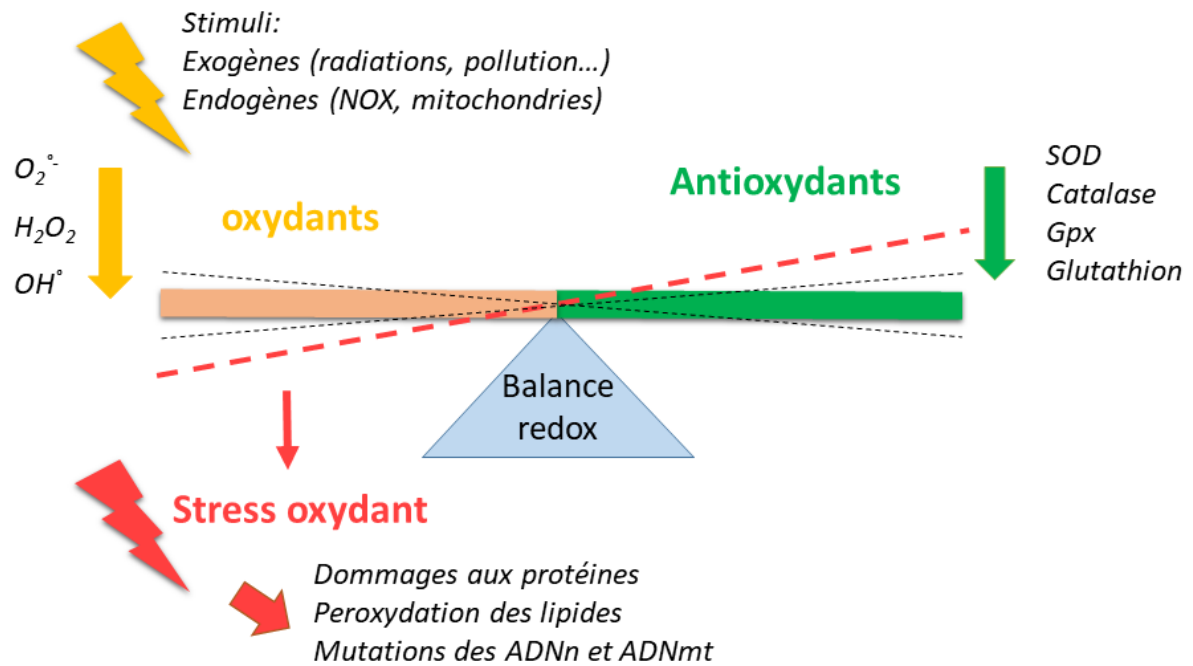
S'il est indéniable que notre état des connaissances actuelles confirme que la mitochondrie se tient au centre d'une multitude de processus associés au vieillissement y compris pathologiques associés à l'âge (e.g., dysfonctionnement mitochondrial (Lima et al. 2022), mutations de l'ADNmt (Chistiakov et al. 2014; van der Rijt et al. 2020; López-Otín et al. 2023), le lien entre mitochondrie, taux métabolique, stress oxydant et vieillissement reste controversé (Speakman et al. 2004; Stier et al. 2014; Koch et al. 2021). Il convient donc d'en explorer plus précisément, et au sein d'une plus grande diversité d'organismes, le fonctionnement mitochondrial et la diversité des modifications bioénergétiques qui ont pu accompagner l'évolution de longévités contrastées entre et à l'intérieur des espèces.





**Figure 9** : Fonctionnement de la chaîne respiratoire et production de ROS. Les substrats métaboliques entrent dans le cycle de Krebs. Ce dernier correspond à une suite de réactions enzymatiques aboutissant à la formation de gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) et à la fixation d'électrons sur deux coenzymes de la matrice mitochondriale, le NADH et  $\text{FADH}_2$ . Les coenzymes sont ensuite acheminés vers la chaîne respiratoire, située dans la membrane mitochondriale interne (plus précisément au niveau des complexes I et II), y sont oxydés, et perdent leurs électrons. La chaîne respiratoire assure le transfert de ces électrons d'une protéine à l'autre (flèches noires) jusqu'à l'accepteur final, le dioxygène (complexe IV), pour former des molécules d'eau (NB : il n'y a pas de flux d'électrons entre les complexes I et II). Durant le transfert d'électrons le long des protéines de la chaîne respiratoire, des protons sont pompés de façon unidirectionnelle de la matrice vers l'espace intermembranaire, au niveau des complexes I, III et IV. Cela crée un gradient de protons  $\text{H}^+$  ( $\Psi_m$ ). Les ions  $\text{H}^+$  entrent de nouveau dans la matrice mitochondriale par l'intermédiaire de l'ATP synthase (ou complexe V). L'ATP synthase ajoute un phosphate inorganique sur les molécules d'ADP pour former finalement de l'ATP. La production de ROS dans la mitochondrie est un sous-produit normal du processus de production d'énergie. Les ROS produites au niveau du complexe I sont dirigées vers la matrice uniquement, celles produites au niveau du complexe III peuvent quant à elles se diriger également vers le cytoplasme. L'aconitase, l'une des enzymes du cycle de Krebs, est particulièrement sensible au stress oxydant, et son activité est notamment dosée pour mesurer ledit stress. La cellule possède des mécanismes antioxydants (des enzymes par exemple, soulignées en vert) capables de neutraliser les ROS afin de minimiser leurs effets délétères. ME : membrane externe ; EIM : espace intermembranaire ; MI : membrane interne ; Q : ubiquinone (ou coenzyme Q) ; cyt c : cytochrome c ; MnSOD : superoxyde dismutase à manganèse.



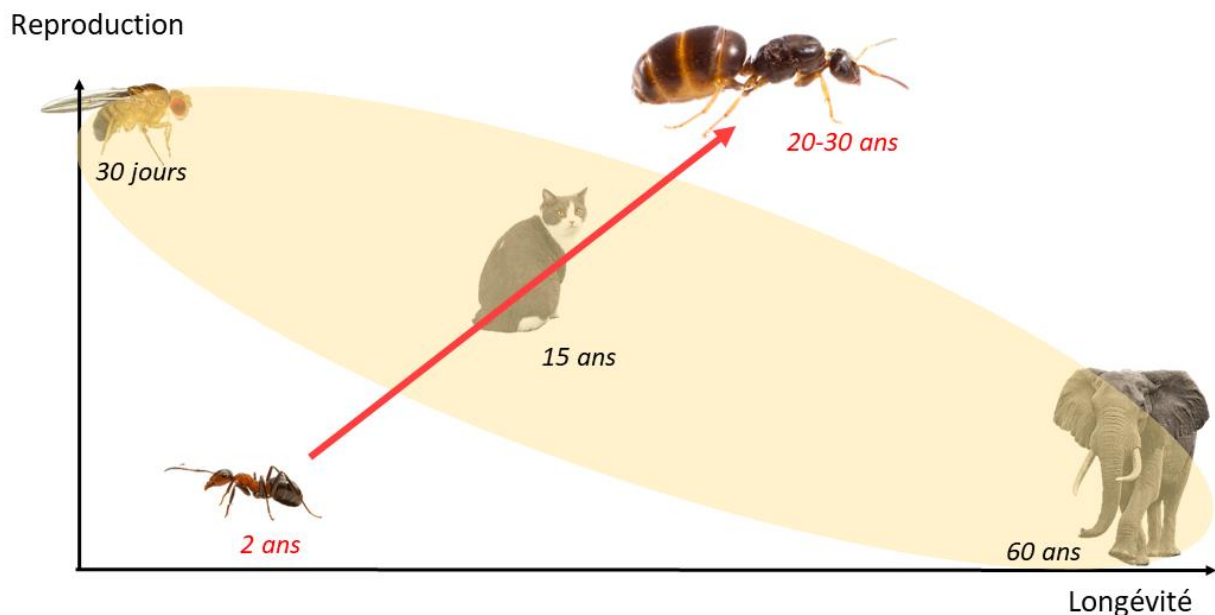


**Figure 10** : Schéma du mécanisme de l'homéostasie redox. Un équilibre homéostatique entre les antioxydants et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) est nécessaire pour le bon fonctionnement d'un organisme. Si des oscillations physiologiques sont admises, notamment pour la signalisation cellulaire ou encore la réponse inflammatoire (oscillations représentées par les lignes en pointillés noirs), il arrive que le déséquilibre entre la production de ROS et la production d'antioxydants ne soit plus suffisamment compensé (pointillés rouges). Les cellules subissent alors un stress oxydant, conduisant à divers dommages cellulaires. Les réactions de la chaîne électronique mitochondriale, ainsi que l'activation de NOX font partie des principales sources intracellulaires de ROS, telles que  $O_2^{\circ-}$ ,  $H_2O_2$  et  $OH^{\circ}$ . NOX, NADPH oxydase ; SOD, superoxyde dismutases ; Gpx, glutathion peroxydase ; ADNn, ADN nucléaire ; ADNmt, ADN mitochondrial.



### III. Quand la socialité influe sur la longévité

Dans le cadre de comparaisons interspécifiques des longévités, certaines espèces ont révélé des schémas contre-intuitifs, voire paradoxaux, par rapport aux théories évolutives du vieillissement évoquées ici. Parmi ces espèces singulières, je me suis intéressée au cas d'un insecte eusocial : la fourmi. En effet, la reine des fourmis peut être considérée (presque) comme un "**diable de Darwin**", un organisme capable de se reproduire des centaines de milliers de fois tout en vivant plusieurs dizaines d'années - un exploit pour un organisme à la taille corporelle aussi petite - alors que les ouvrières, stériles, vont présenter des longévités de l'ordre de quelques semaines à quelques mois (Keller and Genoud 1997)<sup>i</sup>, ce qui contredit donc le compromis entre reproduction et survie communément rencontré et présenté Figure 11 (Stearns 1989; Heinze and Giehr 2021) .



**Figure 11** : compromis fondamental entre reproduction et survie. Modèle suivi par la plupart des organismes, le « live fast, die young » (vivre vite, mourir jeune), en jaune. La flèche rouge indique le modèle suivi par les organismes eusociaux, avec les espérances de vie retrouvées chez *Lasius niger*. De plus, contrairement à la plupart des autres organismes, chez lesquels la durée de vie moyenne diminue avec l'augmentation de l'effort reproductif, les reines avec des taux de ponte élevés peuvent survivre aussi longtemps que les reines moins fécondes, comme chez *Cardiocondyla* (Heinze and Schrempf 2012).

<sup>i</sup> Une grande variance existe entre ces différences de longévités entre castes sociales, selon les espèces de fourmis, qui est exposée plus en détail dans les articles





## 1. Qu'entend-on par (eu)socialité ?

### A. Introduction

Peut-on considérer toute espèce vivant en groupe comme sociale? Non. Certains animaux se rassemblent en masse uniquement en réponse à des facteurs environnementaux tels que la lumière, ou encore la disponibilité en eau et en nourriture. La vie sociale, elle, se distingue par le groupement d'animaux influencés par leurs congénères plutôt que l'environnement.

Au cours de l'évolution, le passage d'une vie solitaire à une vie sociale complexe a impliqué différentes étapes de socialité, marquées par des comportements sociaux de plus en plus élaborés. Ces étapes permettent d'identifier cinq degrés de socialité (excluant le solitarisme), allant du grégarisme, où les individus se regroupent sans pour autant synchroniser leurs activités, à l'eusocialité, le niveau le plus avancé d'organisation sociale (Rehan and Toth 2015). Le terme "eusocial" (dérivé de social avec le préfixe –eu pour « vrai ») a été introduit par Batra en 1966 pour décrire des espèces d'abeilles chez lesquelles les fondatrices du nid coopèrent avec leur progéniture et où se met en place une division du travail au sein du groupe (Boomsma and Gawne 2018).

Ce terme a ensuite été repris par Wilson, qui a complété les classifications proposées depuis le début du XXe siècle (des familles d'individus mobiles avec la reproduction comme "Leitmotiv" de leur association d'après Wheeler à titre d'exemple (Wheeler 1911)), pour donner lieu à la classification la plus communément usitée aujourd'hui (Crespi and Yanega 1995; Boomsma and Gawne 2018). Selon ses critères, les animaux eusociaux partagent (i) une coopération dans les soins aux jeunes (certains s'occupent de la progéniture qui n'est pas la leur), (ii) une division du travail reproductif (tous les individus ne se reproduisent pas), et (iii) le chevauchement d'au moins deux générations pour l'élevage des jeunes (Wilson 1971).

Deux espèces de mammifères seulement répondent aux critères de l'eusocialité, le rat-taupe nu et le rat-taupe de Damara (Burda et al. 2000). Parmi les invertébrés, le niveau le plus complexe d'organisation sociale est retrouvé chez une espèce de crevettes (*Synalpheus regalis*, (Duffy 1996)) ; mais il concerne surtout les insectes (Kramer and Meunier 2019). Aussi, bien que l'eusocialité ne soit retrouvée que dans environ 2 % des espèces d'insectes (ce qui concerne tout de même un peu plus de 13 000 espèces sur 750 000 au total), elle représente



plus de la moitié de la biomasse des insectes dans le monde (Wilson 1997, 2008; Nowak et al. 2010) ; cela illustre son succès écologique dans cette branche du vivant (Wilson 1997).

L'eusocialité représente la dernière grande transition évolutive vers une complexité accrue (Rehan and Toth 2015; Bernadou et al. 2021). Bien que rare, cette organisation sociale a évolué de manière convergente dans différents ordres d'insectes : Hyménoptères (abeilles, fourmis et guêpes), Blattoptères (cafards et termites [les Isoptères ayant rejoint les Blattopères dans la classification]) et Coléoptères (Mikhailova et al. 2024). ; on pense qu'elle est apparue pour la première fois chez les termites, au début du Crétacé (Engel et al. 2016). La totalité des 2600 espèces de termites est eusociale (Thorne 1997). Dans l'ordre des Hyménoptères, seule une minorité d'espèces a évolué vers l'eusocialité. En revanche, à l'instar des termites, toutes les espèces de fourmis sont concernées.

Comme énoncé un peu plus haut, les insectes sociaux vivent dans des sociétés complexes où seuls quelques individus se reproduisent (reine/roi ou dominants) tandis qu'une grande majorité (ouvriers/soldats) renonce à la reproduction, au moins temporairement. Alors que les organismes eusociaux dits primitifs ne montrent aucune différence morphologique entre les femelles reproductrices et les non-reproductrices (Crespi and Yanega 1995; Masuoka et al. 2021) - ce qui est le cas de certaines espèces de fourmis comme les *Diacamma* (reproduction basée sur une hiérarchie de dominance, (Okada et al. 2015)) - les femelles des espèces eusociales avancées peuvent montrer différentes morphologies selon leur statut reproducteur (perte de la pluripotence et apparition de castes immuables (Hunt 2012)), et même une spécialisation au sein des non-reproductrices (ouvrières soldats chez les fourmis des genres *Pheidole* ou *Messor* par exemple).

## B. La complexification de l'organisation sociale provoque des disparités de longévités

L'espérance de vie est extrêmement variable chez les insectes. Les moins longévifs (éphémères) et les plus longévifs (reines fourmis et termites) présentent ainsi des différences d'un facteur de plus de 5000, ce qui contraste énormément avec les différences d'un facteur 50 observées chez les mammifères (Carey 2001). Des différences de longévité plus ou moins importantes sont également rapportées chez les insectes eusociaux (Figure 12). Ces disparités



se retrouvent au sein d'une même espèce, entre mâles et femelles d'une part, et entre femelles non reproductrices et reproductrices d'autre part (ouvrières et reines).

En effet, alors que la durée de vie des rois termites égale celle des reines (Thorne 1997; Tasaki et al. 2021), les mâles des hyménoptères sociaux sont généralement considérés comme morts peu de temps après le vol nuptial (Heinze 2016). Cela est particulièrement vrai dans le cas d'espèces pour lesquelles le vol nuptial est hautement synchronisé ; la longévité des mâles n'est pas corrélée à la durée de vie des reines mais semble être plutôt adaptée aux opportunités d'accouplement (Heinze 2016).

En ce qui concerne les différences entre femelles d'une même espèce, l'exemple le plus connu est probablement celui de l'abeille mellifère : les reines sont capables de vivre 3 à 5 ans, mais les ouvrières (phénotype d'été) ne vivent que 6 à 8 semaines (Wilson 1971; Corona et al. 2007; Haddad et al. 2007). La génétique des ouvrières et des jeunes reines quittant le couvain étant la même, ces différences de développement sont dues notamment au fait que les larves de reines se développent dans des cellules royales, plus grandes, et sont nourries avec de la gelée royale, hautement nutritive (Yang et al. 2017).

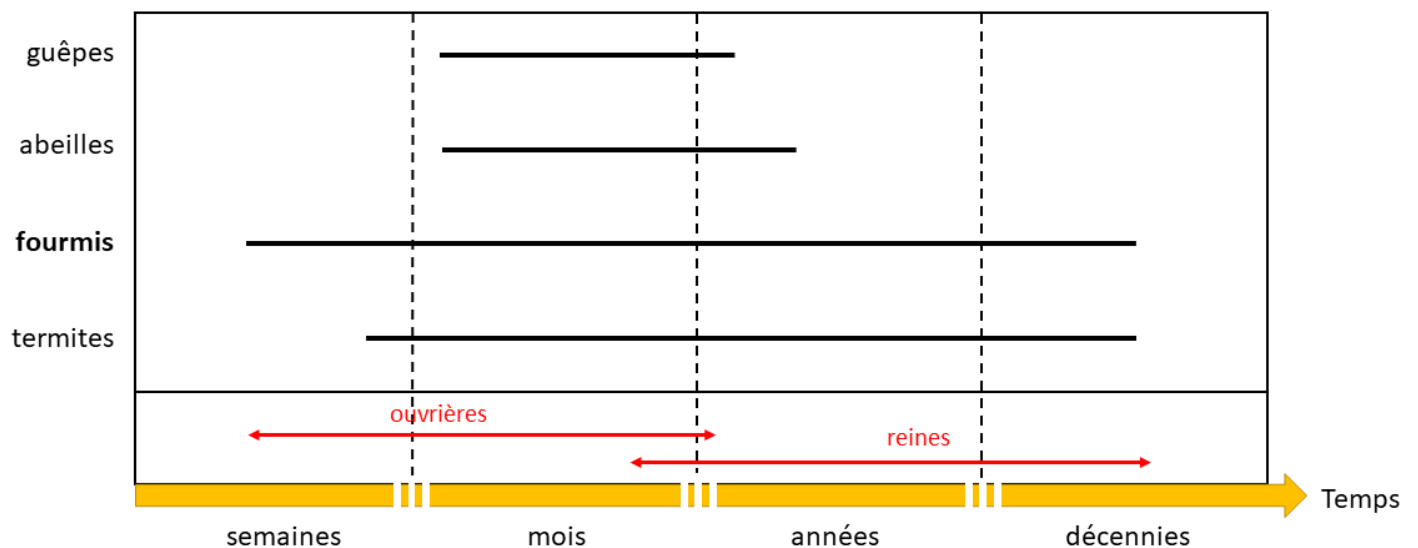


Figure 12 : représentation schématique des gammes de durée de vie des espèces au sein des quatre principaux groupes d'insectes sociaux (d'après Carey 2001).

## 2. Vieillesse et organisation sociale des fourmis

Alors que l'impact du stress social, chronique et psychologique, sur la sénescence cellulaire a été prouvé chez l'homme (Epel et al. 2004), les principaux mécanismes impliqués et le degré



d'influence du contexte social sur le processus de vieillissement n'ont pas encore été totalement élucidés. Les expériences de laboratoire jouent un rôle inestimable pour mieux comprendre l'impact de la socialité sur le vieillissement. Dans ce contexte, les fourmis constituent l'un des exemples les plus spectaculaires de modèles biologiques facilement manipulables et présentant des organisations sociales très diversifiées. En effet, elles présentent une grande gamme de variations de comportements sociaux et des patterns de vieillissement à la fois entre espèces et au sein d'une même espèce (Keller and Jemielity 2006).

### A. La division du travail

Les colonies de fourmis sont basées sur la division du travail assumée par différentes castes (reine, nourrices, nettoyeuses, butineuses), ce qui conduit à une organisation sociale qui est labile dans le temps ou qui peut changer en réponse à la pression environnementale (Michener 1974). La division du travail est le résultat d'un degré suffisant de cohérence comportementale au sein d'un groupe donné d'individus. Les ouvrières appartenant à une caste sociale donnée diffèrent de celles d'une autre caste par leur comportement, et parfois même par leur taille et leur morphologie. Les trajectoires de développement des ouvrières sont déclenchées par des changements environnementaux survenant au cours du développement des fourmis, qui jouent probablement un rôle crucial dans la différenciation des ouvrières (Weidenmüller et al. 2009).

Des études antérieures portant sur la socialité et le vieillissement ont souligné comment les individus (en tant qu'unité physiologique et de vieillissement) et le contexte social dans lequel ils vivent (structure de la colonie) sont intimement liés<sup>i</sup>. La connectivité des groupes découle des caractéristiques des sous-groupes (comme la ségrégation spatiale dérivée des différences d'âge et de caste, (Mersch et al. 2013)), ainsi que des différences comportementales individuelles (par exemple, dans une colonie de fourmis, les interactions individuelles sont positivement liées à l'âge) et des différences de comportement entre les individus. De plus, les interactions individuelles sont positivement asymétriques, ce qui signifie que certains individus interagissent entre eux plus que d'autres (Adler and Gordon 1992).

---

<sup>i</sup> Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'isolation sociale est également un facteur réduisant, à travers des effets pro-oxydants, la durée de vie des fourmis (Koto et al. 2023)



Cette variation de la connectivité entre les individus devrait avoir un impact à la fois sur la durée de vie des individus et sur la santé de la colonie. La première est probablement affectée par les différences d'exposition aux risques extrinsèques de mortalité, ce qui tend à expliquer pourquoi les reines ou les ouvrières vivant à l'intérieur de la colonie ont évolué vers des durées de vie plus longues que les fourrageuses (Giraldo and Traniello 2014). La seconde semble être directement affectée par la topologie du réseau d'interactions entre les individus : des clusters dans les réseaux d'interaction peuvent ainsi réduire les risques de propagation d'une infection (Keeling 2005; House and Keeling 2011).

Il est intéressant de noter que les individus passent par un continuum de tâches sociales en fonction de leur âge. Les individus plus âgés (c'est-à-dire les fourrageuses) sont les plus susceptibles de prendre des risques dans le cadre de la défense de la colonie et de la recherche de ressources alimentaires extérieures (Wilson 1971; Agarwal et al. 2011). La proportion de fourmis dans chaque caste (nourrices, nettoyeuses, butineuses) dépend directement de l'organisation sociale de la colonie. Le changement de l'une de ces pressions (plus de larves à nourrir ou diminution des ressources) conduit à un ajustement dans chaque caste et à un changement de rôle, par le biais d'une reprogrammation comportementale et probablement épigénétique (Simola et al. 2016). Le phénomène de coévolution âge-caste s'accompagne d'une modification du phénotype individuel de vieillissement, comme la résistance au stress oxydant ou la modification des histones, dont on sait qu'elle est plus élevée chez les individus qui passent d'une caste à faible espérance de vie à une caste plus longévive (Schneider et al. 2011). Ensuite, les caractéristiques de vieillissement des individus façonnent la structure de la colonie, ce qui, en retour, a un impact sur les individus par l'amélioration ou la diminution de la « fitness » de la colonie (e.g., dynamique de croissance de la population). Cependant, les pressions écologiques devraient façonner la structure de la colonie, ce qui se traduit par des changements dans le comportement des individus et, théoriquement, dans leur trajectoire de vieillissement.

Une étude récente sur le vieillissement chez les fourmis sociales suggère l'existence d'une sélection positive au niveau de la colonie basée sur la taille de la colonie (Giraldo and Traniello 2014). Une colonie plus grande a un effet positif sur la « fitness » de la colonie et est corrélée à l'âge de la colonie elle-même. De même, une colonie plus grande entraîne une augmentation de la longévité des travailleurs. Chez *P. californicus*, les ouvriers deviennent plus spécialisés et



la division du travail augmente avec la taille de la colonie (Holbrook et al. 2014). Les grandes colonies d'*O. longonoda* sont plus efficaces pour patrouiller et recruter des compagnons de nidification pendant les combats territoriaux intraspécifiques (Hölldobler and Wilson 1978). Cela suggère que la modulation de la taille de la colonie peut constituer une approche expérimentale pour tester la façon dont le contexte social et le taux de vieillissement individuel sont interconnectés.

## B. *Lasius niger*, modèle de laboratoire

*Lasius niger* (Linnaeus, 1758) est une espèce de fourmi que l'on retrouve dans la littérature scientifique depuis des décennies (description du vol nuptial depuis les années 1910's (Turner 1915)), et qui occupe toute l'Europe ainsi que des parties de l'Asie et de l'Amérique du Nord. Elle se caractérise par des colonies généralement de taille moyenne à petite (Schläppi et al. 2021), souvent souterraines. Les colonies établies sur le terrain peuvent tout de même atteindre des tailles importantes, avec des effectifs atteignant 10 000 ouvrières (Parker and Parker 2006). L'espèce est retrouvée dans une grande diversité d'environnements : villes, parcs et jardins, prairies et terres arables (Seifert 1992). Cette espèce est agressive envers les autres fourmis, y compris les populations conspécifiques (Seifert 1992), en raison de l'existence d'un « passeport colonial », des hydrocarbures cuticulaires spécifiques à des individus apparentés (Lenoir et al. 2009). Cela implique donc que **dans le cadre d'élevages en animalerie, toutes les colonies doivent être placées dans des boîtes séparées.**

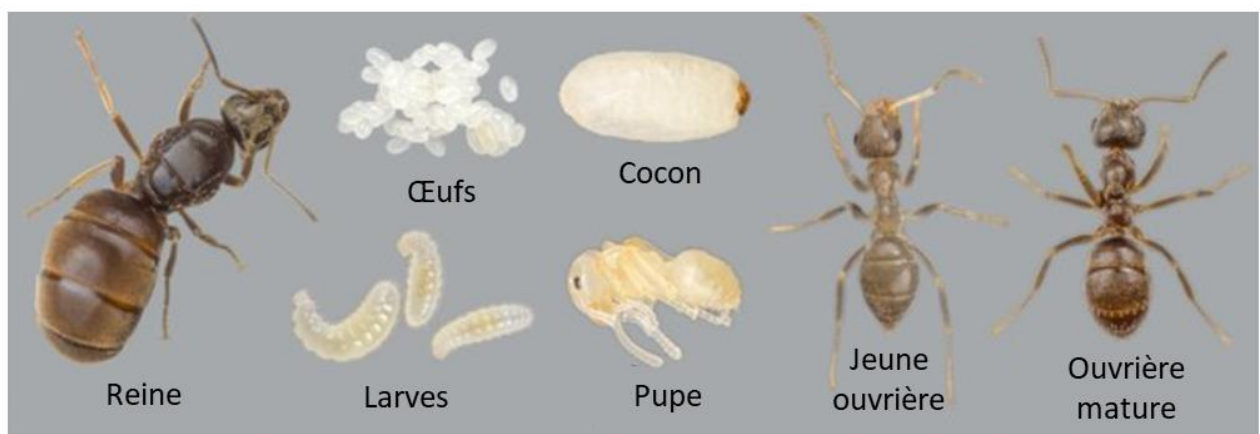
Les colonies de *L. niger* sont **monogynes**, et n'ont donc qu'une seule reine. Ces dernières, dans le nord de l'Europe, ne s'accouplent généralement qu'une fois, avec un seul mâle, ce qui conduit à une parenté élevée parmi les ouvrières (Boomsma and Isaaks 1985), et diminue donc l'influence de la variabilité génétique. Des analyses microsatellites ont révélé que certaines reines peuvent néanmoins s'accoupler plus d'une fois en raison d'un manque de quantité de sperme transféré lors de l'accouplement (Corley and Fjerdingstad 2011). La polygamie est également un comportement retrouvé sur des latitudes plus au sud, comme dans le Sud de la France ou encore en Suisse (Fjerdingstad et al. 2003; Corley and Fjerdingstad 2011). Les reines stockent le sperme dans un organe spécialisé, la spermathèque, qui



permettra de féconder les œufs durant toute une vie, soit près de 30 ans. Les mâles, quant à eux, meurent quelques heures après l'accouplement (Boomsma and Van Der Have 1998).

Des centaines de jeunes reines fécondées peuvent facilement être collectées après l'essaimage (ou vol nuptial) alors qu'elles errent sur le sol à la recherche d'un site de nidification (Parker and Parker 2006). C'est au cours de cette période post-accouplement que Martin Quque, le précédent doctorant du laboratoire qui travaillait sur ce modèle, a **capturé les reines** des colonies les plus anciennes utilisées au laboratoire (capture en juillet 2018 de reines utilisées dans le chapitre 2).

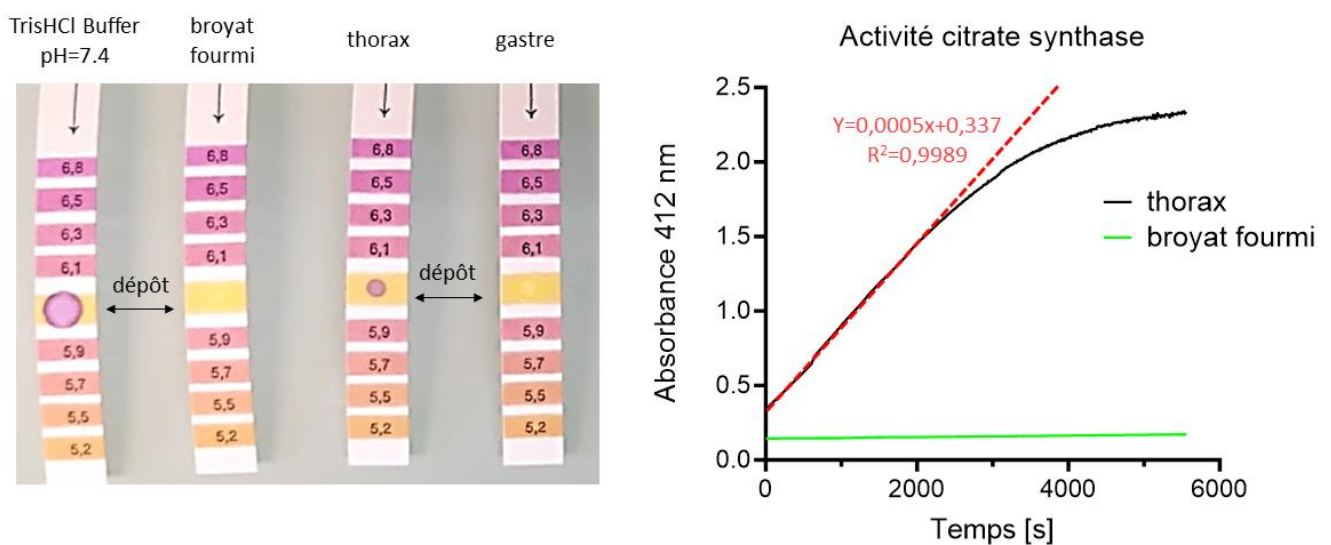
L'espèce est composée de deux caste (voir Figure 13): les reines, qui peuvent mesurer jusqu'à 16 mm, et les ouvrières, dont la taille est de l'ordre de 5 mm (Konorov et al. 2017). Kutter et Stumper ont rapporté dans un article de 1969 des longévités de 18 à 29 ans en laboratoire chez des reines de cette espèce (Kramer et al. 2016), ce qui est dix fois plus important que celles des ouvrières (Keller and Genoud 1997). Parmi les ouvrières, on distingue principalement les nourrices, qui s'occupent du soin au couvain et à la reine, et les fourrageuses (ou pourvoyeuses), qui assurent les tâches à l'extérieur du nid, comme la recherche de nourriture (Lenoir and Ataya 1983). 50% des ouvrières présentent une transition comportementale liée à l'âge (Lenoir 1979), phénomène que l'on appelle polyéthisme d'âge. Les analyses menées durant cette thèse se basent sur cette caractéristique pour distinguer les jeunes travailleuses des plus âgées.



**Figure 13** : issue de (Gutiérrez et al. 2020) présentant les deux castes de fourmis retrouvées chez *Lasius niger* (reine et ouvrières), ainsi que leurs différents stades de développement. Dans la caste des ouvrières, les plus jeunes s'occupent du couvain, tandis que les plus âgées sortent du nid en quête de nourriture. On parle de polyéthisme d'âge.



*Lasius niger* fait partie de la sous-famille des Formiciniés. Elle possède une glande à poison au niveau de l'abdomen qui produit de l'acide formique (Morgan). Ceci est à prendre en compte lorsque l'on souhaite travailler sur individus entiers, notamment pour des mesures enzymatiques. Il faut s'assurer que les solutions tampons utilisées en routine pour les dosages sont bien adaptées, comme par exemple le dosage de l'activité de la citrate synthase, 1ère enzyme du cycle de Krebs, (Figure 14). Le changement d'un tampon Tris (Srere 1969) pour un tampon phosphate qui a un pK<sub>A</sub> plus bas (7,2 contre 8,3 à 20°C) permet de régler le problème de pH rencontré (tampon utilisé pour la mesure dans le chapitre 2).



**Figure 14** : lecture sur bandelette du pH obtenu sur une fourmi entière, thorax seul ou gastre seul après homogénéisation dans un tampon Tris HCl 0,1M EDTA 1mM (à gauche). Mesure de l'activité citrate synthase à 412 nm après ajout de DTNB 110μM, AcoA 330μM et déclenchement de la cinétique par addition de 10mM Oxaloacetate. Le pH du broyat de fourmi entière étant trop acide, l'activité enzymatique est inhibée.

### C. Bases mécanistiques des différences de longévités des castes sociales

Une durée de vie plus courte devrait être associée à une progression plus rapide des modifications des traits physiologiques liés à l'âge. Par exemple, le modèle fourmi a été utilisé précédemment pour évaluer comment l'accumulation de dommages oxydants avec l'âge, les capacités antioxydantes ou la dynamique des télomères peuvent expliquer la longévité des fourmis, produisant un soutien mitigé pour la théorie du Soma jetable (Schneider et al. 2011).





Jemielity et collaborateurs ont mené l'une des premières études sur la dynamique des télomères chez les insectes, et l'ont faite dans le contexte de la division du travail chez la fourmi *Lasius niger*. Ils ont constaté que les télomères dans les tissus somatiques (tête et thorax) sont significativement plus longs chez les reines et les ouvrières que chez les mâles, mais aussi que les longueurs des télomères ne différaient pas entre les ouvrières et les reines (Jemielity et al. 2007). Notons que les reines utilisées ici étaient des reines vierges âgées de 1 à 3 jours, ce qui donne peu d'indications sur l'implication des télomères dans le vieillissement de cette caste sociale à longue durée de vie. La télomérase est une enzyme qui assure le maintien de la longueur des télomères en allongeant les séquences des télomères. L'activité de la télomérase est notamment régulée à la hausse dans les corps gras des reines de bourdons en pré-diapause (Koubová et al. 2019) et dans les castes à longue durée de vie des termites, même s'il n'y a pas de différence de longueur des télomères (Koubová et al. 2021). Comme la longueur des télomères est deux fois supérieure à la longueur moyenne chez d'autres insectes, il a été suggéré que les télomères longs pourraient être une préadaptation à la vie relativement longue des insectes eusociaux (Koubová et al. 2021). Ainsi, les reines ne présentent pas de télomères plus longs (un déterminant potentiel de la durée de vie des cellules et de la survie individuelle) que les ouvrières à courte durée de vie (c'est cependant le cas des mâles à courte durée de vie (Jemielity et al. 2007)). Ces résultats suggèrent qu'au-delà de la longueur ou la structure des télomères (Gomes et al. 2010), le processus de restauration ou la signalisation cellulaire qui en dépend (apoptose) peuvent jouer un rôle clé dans la détermination de la longévité des reines.

L'un des écueils physiologiques actuels de la détermination de la nature des mécanismes impliqués dans les longévités contrastées des castes sociales est que personne n'a encore contrôlé les effets des différences de taille et de taux métabolique spécifique dans l'équation conduisant à une durée de vie plus longue chez les reines que chez les ouvrières. Cela pose également la question de savoir s'il existe des différences dans l'efficacité mitochondriale (production d'ATP par rapport aux ROS) au niveau intraspécifique. Il est notable qu'une étude récente (2023) a exploré la contribution génétique au vieillissement chez *Cardiocondyla obscurior*, soulignant une expression plus importante de gènes mitochondriaux chez les vieilles reines (Jaimes Niño 2023), un résultat en contraste avec les attendus d'une régulation progressivement réduite des gènes mitochondriaux chez les individus âgés (Frenk and



Houseley 2018). Une autre possibilité est que les facteurs sociaux brouillent notre compréhension des causes mécaniques de la variabilité du vieillissement des fourmis. Quelle est l'importance relative des dommages oxydants, du fonctionnement des mitochondries, de la dynamique des télomères, de la signalisation cellulaire telle que TOR ou les sirtuines dans la détermination spécifique de la plus grande longévité de certaines castes ? Comment sont-elles modifiées lorsqu'une ouvrière change de rôle, faisant passer son phénotype de vieillissement d'un taux faible à un taux rapide ? Quel est l'impact du contexte social sur la sénescence individuelle ? Récemment, il a été suggéré que l'augmentation de la durée de vie et de la résistance au stress chez les fourmis seraient médiées par la vitellogénine (Corona et al. 2007), la principale protéine vitelline chez les insectes, probablement impliquée dans plusieurs fonctions dont le vieillissement (Amdam 2011).

### 3. L'appareil respiratoire des insectes

#### A. Présentation de l'appareil respiratoire

Chez la grande majorité des Arthropodes terrestres (Insectes, Myriapodes, certains Arachnides), l'air est conduit directement sous forme gazeuse jusqu'aux tissus par un réseau ramifié de tubes, nommé système trachéal (Figure 14). Les trachées s'ouvrent sur la cuticule par des spiracles (ou stigmates), sur les côtés des segments thoraciques et abdominaux. Les valves musculaires des spiracles, fermées la plupart du temps, ne s'ouvrent que pour permettre l'absorption de l'oxygène et l'évacuation du dioxyde de carbone.

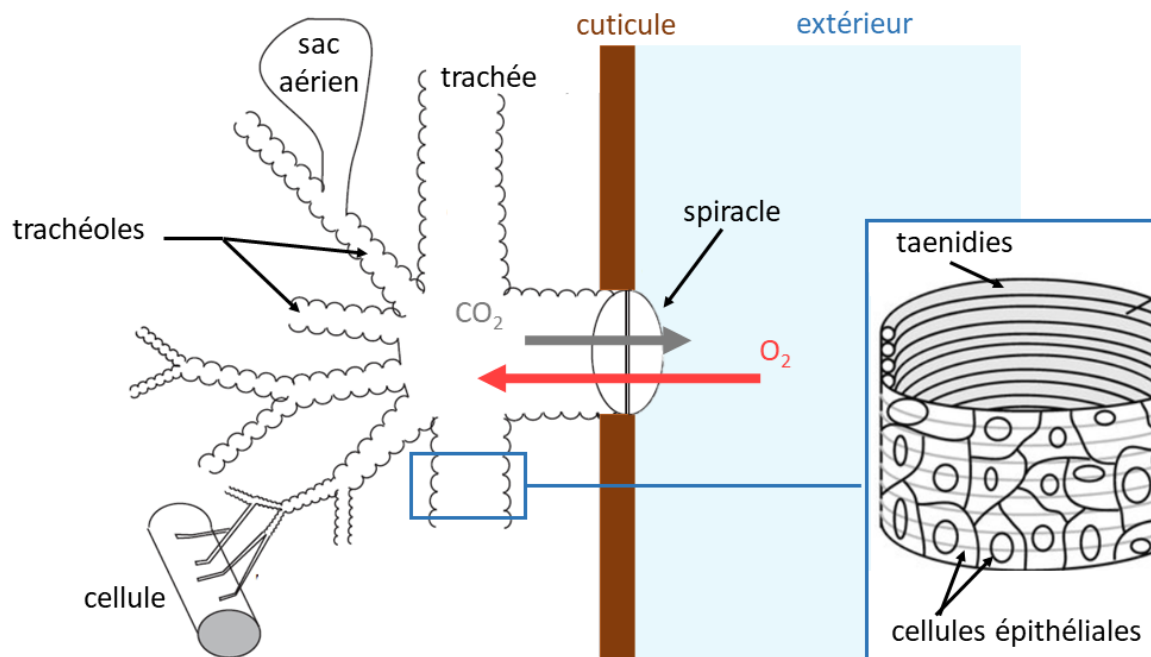
Les trachées sont rigidifiées par des épaissements cuticulaires appelés taenidies pour empêcher leur écrasement, et elles se terminent par des trachéoles très fines, de moins d'un micron de diamètre. Ces trachéoles sont entourées d'une cellule trachéolaire dans laquelle les gaz respiratoires sont dissous, et peuvent se prolonger dans les tissus. *In fine*, les échanges de gaz se font soit par diffusion, soit via des changements de pression interne produits par le mouvement du corps de l'insecte ou la circulation de l'hémolymphe, lorsque les insectes sont plus gros et la simple diffusion insuffisante (Westneat et al. 2003; Terblanche and Woods 2018).

Certains insectes, en particulier ceux dotés d'une cuticule rigide, présentent des portions agrandies de leur système trachéal, pour former des sacs aériens au niveau de la tête et du thorax (Waters et al. 2013). Ces derniers n'ont pas de taenidies et peuvent donc se contracter et se dilater avec les variations de pression de l'hémolymphe, et servent de soufflet pour



améliorer le mouvement d'air dans le système trachéal (ils représentent la majorité du volume dudit système). Les sacs aériens sont courants chez les insectes volants adultes de nombreux ordres, notamment les **Hyménoptères**. Les fourmis en sont donc majoritairement équipées, même les ouvrières, qui ne développent pas d'ailes (Westneat et al. 2003; Harrison et al. 2023). NB : Les échanges gazeux se font directement avec les cellules qui en ont besoin, sans passer par le système circulatoire. L'hémolymphe n'a aucune fonction respiratoire directe, et est dépourvue de pigments transporteurs d'oxygène (Law and Wells 1989). Seules quelques espèces vivant dans un environnement temporairement hypoxique, telles que les larves aquatiques des chironomidés, ou encore certains Hémiptères aquatiques, possèdent des hémoglobines, qui se situent soit dans l'hémolymphe, soit dans des tissus spécialisés (Weber and Vinogradov 2001).

Un phénomène de compression trachéale a également été décrit chez certains insectes, notamment la fourmi charpentière *Camponotus pennsylvanicus*, lors d'analyses de vidéos d'insectes passés aux rayons X. La compression trachéale pourrait faciliter la diffusion de l'oxygène vers les tissus, à la manière de poumons : si elle se produit avec des spiracles fermés, la pression, accrue, augmente le gradient de diffusion de l'oxygène à travers la frontière trachéole/tissu (Westneat et al. 2003).



**Figure 14 :** Vue d'ensemble du système trachéal. Les spiracles sont reliés aux trachées, qui se ramifient de manière répétée à l'intérieur de l'insecte, menant finalement aux trachéoles, qui



se trouvent à proximité de la plupart des cellules. Les taenidies maintiennent les trachées distendues, permettant ainsi le libre passage de l'air. Chez certains insectes, des sacs aériens mous et compressibles sont présents pour améliorer les échanges gazeux. Schémas repris de (Harrison 2009; Webster et al. 2015)

## B. Régulation de la ventilation chez l'insecte

De nombreux insectes sont capables de moduler leur ventilation, via l'ouverture et la fermeture des spiracles. On distingue trois principaux schémas d'échanges de gaz (Figure 15), souvent mesurés par l'efflux de  $\text{CO}_2$ , bien que le même principe s'applique à l'absorption d' $\text{O}_2$ , dont la mesure est plus délicate (Lighton and Halsey 2011). Ces trois schémas correspondent à (i) un échange de gaz continu dans lequel il y a un efflux irrégulier d' $\text{O}_2/\text{CO}_2$ , (ii) un échange de gaz discontinu (DGC pour discontinuous gas exchange cycles), dans lequel on observe une éruption périodique de  $\text{CO}_2$  séparée par des intervalles de très faible voire nulle émission de  $\text{CO}_2$  pendant plusieurs minutes voire plusieurs heures (Levy and Schneiderman 1958; Lighton 1990; Lighton and Turner 2008), et (iii) un schéma d'échange de gaz cyclique caractérisé par une augmentation régulière de  $\text{CO}_2$ , mais sans intervalles d'émissions minimales de  $\text{CO}_2$  (Terblanche and Woods 2018).

Depuis sa première observation sur des chrysalides lépidoptères en diapause par Punt (1950), le DGC a suscité l'intérêt de la communauté scientifique, puisque le schéma d'échange de gaz respiratoires ne favorise pas l'homéostasie, mais génère plutôt de grands écarts internes dans les valeurs de pression partielle en oxygène ( $\text{PO}_2$ ),  $\text{PCO}_2$  et de pH de l'hémolymphe (Matthews 2018). De plus, la ou les raisons pour lesquelles ces cycles d'échanges gazeux ont évolué indépendamment chez les insectes d'au moins cinq ordres reste source de discussion (Marais et al. 2005; Schimpf et al. 2013; Oladipupo et al. 2022). Trois hypothèses sont avancées pour rationaliser le processus :

- Le DGC permettrait de limiter la perte d'eau/évaporation par le système trachéal (hypothèse hydrique). Cependant, de nombreuses études ont trouvé que la respiration représente une petite fraction de la perte totale d'eau et que les insectes arrêtent de réaliser des DGC à des moments où ce schéma serait plus opportun, comme chez certains insectes vivant dans des zones désertiques (Hadley and Quinlan 1993; Lighton 2007; Oladipupo et al. 2022). De plus, beaucoup d'insectes, même d'habitats humides, pratiquent la ventilation discontinue.

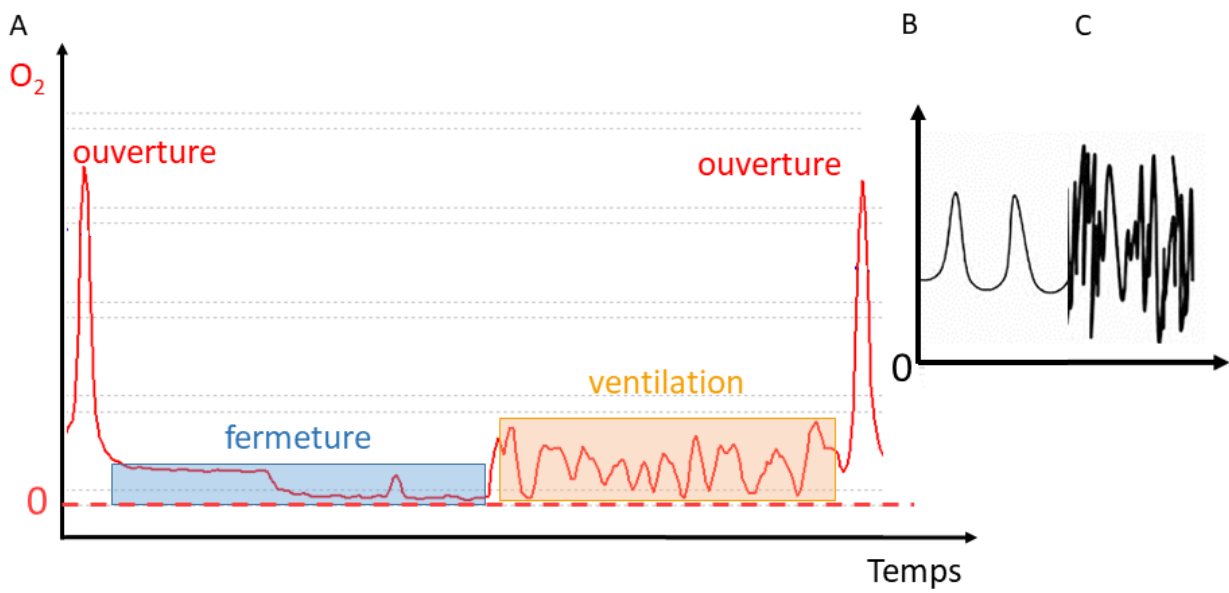


- Le DGC permettrait de faciliter les échanges gazeux dans des environnements souterrains hypercapniques *i.e.* riches en CO<sub>2</sub> (hypothèse chthonique (Lighton and Berrigan 1995; LIGHTON 1998)). En gardant les spiracles fermés, les insectes concentreraient le CO<sub>2</sub> et augmenteraient le gradient pour sa diffusion extérieure. La libération rapide de CO<sub>2</sub> permettant conjointement de limiter les pertes en eau. L'hypothèse chthonique prédit donc que les DGC minimisent le ratio de la perte d'eau respiratoire par rapport à la libération de CO<sub>2</sub>, comparé à d'autres modes d'échange de gaz (Gibbs and Johnson 2004)

- Le DGC contribuerait à limiter les dommages oxydant (Hetz and Bradley 2005). La phase de fermeture des spiracles est caractérisée par une diminution rapide de la concentration en oxygène trachéal à de faibles pressions partielles, tandis qu'une phase de flutter cruciale garantit que l'apport en oxygène correspond aux taux de consommation des tissus. (Contreras and Bradley 2009). Une autre hypothèse souligne plutôt jouer un rôle de signalisation plutôt que de limiter les dommages oxydants, étant donné que la production de ROS et la libération de CO<sub>2</sub> dans les chambres de respiration peuvent être négativement corrélés (Boardman et al. 2012).

Enfin, les DGC sont plus probables pendant les périodes de faible activité métabolique, comme l'inactivité, les basses températures ou la diapause. À mesure que le métabolisme augmente, les schémas d'échange gazeux évoluent vers des cycles alternés avant de devenir continus à des taux métaboliques élevés (Matthews 2018).





**Figure 15 :** les trois phases de la respiration discontinue (A) reflétant l'état d'ouverture des spiracles. Au moment de la phase d'**ouverture** des spiracles, une entrée massive d'O<sub>2</sub> est observée, conjointement à une libération de CO<sub>2</sub>. Au cours de la phase de **fermeture**, les spiracles sont fermés et l'entrée d'O<sub>2</sub> / libération de CO<sub>2</sub> est faible, les valeurs obtenues correspondent au bruit de fond de l'appareil utilisé pour la mesure (cette phase n'est en revanche pas observée lorsque la respiration est cyclique ou continue). Enfin, la phase de fermeture des spiracles est suivie d'une phase de battement (ou **ventilation**) durant laquelle l'entrée d'O<sub>2</sub> se produit uniquement pendant de brèves ouvertures des spiracles. Respiration cyclique (B), et continue (C).





Figure 16 : marquage de fourmis *Lasius niger* au crayon POSCA



#### IV. Objectifs de la thèse



Bien que l'étude des mécanismes de vieillissement, dans le contexte de la socialité, se soit développée ces dernières années, elle n'a pas encore totalement exploré l'implication de la mitochondrie dans la différence de longévité des castes sociales au sein d'une même espèce. Ceci est une question d'autant plus fascinante que l'ensemble des individus femelles d'une colonie possèdent une lignée matrimoniale mitochondriale identique, qui mène cependant à des longévités différentes.

Le sujet de ce travail de thèse vise à faire un premier pas pour combler cette lacune, en explorant le fonctionnement mitochondrial de la fourmi, principalement entre les castes de *Lasius niger*, la fourmi noire des jardins.

**Dans le premier chapitre**, nous présenterons la **méthodologie** employée pour aborder l'étude de la **bioénergétique mitochondriale** de *Lasius niger*. Nous testerons si l'*Oroboros* est une machine adaptée à la mesure de la respiration chez de petits insectes comme les fourmis. Nos résultats valident l'approche métabolique comparative par la méthode d'oxymétrie ?

**Dans le second chapitre**, nous présenterons les résultats **d'une étude descriptive** la plus complète possible sur les différences **des aspects bioénergétiques de la mitochondrie des reines** et de 2 types d'ouvrières, **nurses et fourrageuses** (marquées au crayon, comme sur la Figure 16). Basée sur les prédictions de la théorie du soma disponible, notre prédiction principale est que la mitochondrie des reines devrait, pour une même consommation d'oxygène, produire une même quantité d'ATP pour une quantité de ROS (ou de dommages oxydants) plus faible.

**Dans le troisième chapitre**, nous mêlerons nos conclusions sur la validation par nos résultats des prédictions issues de la théorie du soma disponible à une discussion générale et des perspectives à la lumière de :

- résultats préliminaires d'une approche comparative de protéomes mitochondriaux de 2 espèces de fourmis
- la caractérisation d'une respiration discontinue chez *Lasius niger*
- l'idée que la mitochondrie peut être non pas une source mais un puit à ROS cellulaires





## Références de l'introduction

Aanen DK (2018) Social Immunity: The Disposable Individual. *Curr Biol* 28:R322–R324.

Adams KL, Song K, Roessler PG, et al (1999) Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13863–13868

Adler FR, Gordon DM (1992) Information collection and spread by networks of patrolling ants. *Am Nat* 140:373–400.

Agarwal M, Guzmán MG, Morales-Matos C, et al (2011) Dopamine and Octopamine Influence Avoidance Learning of Honey Bees in a Place Preference Assay. *PLOS ONE* 6:e25371.

Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, et al (2008) Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J Cell Sci* 121:1046–1053.

Alciatoire G, Ugelvig LV, Frank E, et al (2021) Immune challenges increase network centrality in a queenless ant. *Proc Biol Sci* 288:20211456.

Allen JF (2015) Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: Colocation for redox regulation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:10231–10238.

Allen JF, Martin WF (2016) Why Have Organelles Retained Genomes? *Cell Syst* 2:70–72.

Altmann R (1894) *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*. Veit

Amdam GV (2011) Social context, stress, and plasticity of aging. *Aging Cell* 10:18–27.

Ardia DR, Gantz JE, Brent C., et al (2012) Costs of immunity in insects: an induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity. *Funct Ecol* 26:732–739.

Arendt JD (2011) Size-fecundity relationships, growth trajectories, and the temperature-size rule for ectotherms. *Evol Int J Org Evol* 65:43–51.

Austad SN, Hoffman JM (2018) Is antagonistic pleiotropy ubiquitous in aging biology? *Evol Med Public Health* 2018:287–294.

Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol* 13:729–744.

Barbieri M, Bonafè M, Franceschi C, Paolisso G (2003) Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1064-1071.



Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:547–581.

Bennett JP, Onyango IG (2021) Energy, Entropy and Quantum Tunneling of Protons and Electrons in Brain Mitochondria: Relation to Mitochondrial Impairment in Aging-Related Human Brain Diseases and Therapeutic Measures.

Bernadou A, Kramer BH, Korb J (2021) Major Evolutionary Transitions in Social Insects, the Importance of Worker Sterility and Life History Trade-Offs. *Front Ecol Evol* 9:

Blackburn EH (1991) Structure and function of telomeres. *Nature* 350:569–573.

Boardman L, Terblanche JS, Hetz SK, et al (2012) Reactive oxygen species production and discontinuous gas exchange in insects. *Proc R Soc B Biol Sci* 279:893–901.

Bock R (2017) Witnessing Genome Evolution: Experimental Reconstruction of Endosymbiotic and Horizontal Gene Transfer. *Annu Rev Genet* 51:1–22.

Boggs CL (2009) Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Funct Ecol* 23:27–37.

Bonasio R, Zhang G, Ye C, et al (2010) Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Science* 329:1068–1071.

Boomsma JJ, Gawne R (2018) Superorganismality and caste differentiation as points of no return: how the major evolutionary transitions were lost in translation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 93:28–54.

Boomsma JJ, Isaaks JA (1985) Energy Investment and Respiration in Queens and Males of *Lasius niger* (Hymenoptera: Formicidae). *Behav Ecol Sociobiol* 18:19–27

Boomsma JJ, Van Der Have TM (1998) Queen mating and paternity variation in the ant *Lasius niger*. *Mol Ecol* 7:1709–1718.

Bouwhuis S, Charmantier A, Verhulst S, Sheldon BC (2010) Individual variation in rates of senescence: natal origin effects and disposable soma in a wild bird populations. *J Anim Ecol* 79:1251–1261

Bowles EJ, Campbell KHS, St John JC (2007) Nuclear transfer: preservation of a nuclear genome at the expense of its associated mtDNA genome(s). *Curr Top Dev Biol* 77:251–290.

Bradley TJ (2007) Control of the respiratory pattern in insects. *Adv Exp Med Biol* 618:211–220.

Breton S, Beaupré HD (2007) Un système de transmission de l'ADN mitochondrial sexuellement équitable. *médecine/sciences* 23:1038–1040.

Breton S, Beaupré HD, Stewart DT, et al (2007) The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough? *Trends Genet TIG* 23:465–474.



Burda H, Honeycutt RL, Begall S, et al (2000) Are Naked and Common Mole-Rats Eusocial and If so, Why? *Behav Ecol Sociobiol* 47:293–303

Burger G, Gray MW, Lang BF (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet* 19:709–716

Bussolati O, Uggeri J, Belletti S, et al (1996) The stimulation of Na,K,Cl cotransport and of system A for neutral amino acid transport is a mechanism for cell volume increase during the cell cycle. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 10:920–926.

Byard R (2020) The execution of the Romanov family at Yekatarinberg. *Forensic Sci Med Pathol* 16:.

Calabi P, Porter SD (1989) Worker longevity in the fire ant *Solenopsis invicta*: Ergonomic considerations of correlations between temperature, size and metabolic rates. *J Insect Physiol* 35:643–649.

Calvo SE, Mootha VK (2010) The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11:25–44.

Campisi J (2003) Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol* 38:5–11.

Carey JR (2001) Demographic mechanisms for the evolution of long life in social insects. *Exp Gerontol* 36:713–722.

Cawthon RM (2002) Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e47–e47.

Cayuela H, Dorant Y, Forester BR, et al (2022a) Genomic signatures of thermal adaptation are associated with clinal shifts of life history in a broadly distributed frog. *J Anim Ecol* 91:1222–1238.

Cayuela H, Lemaître J-F, Bonnaire E, et al (2020) Population position along the fast-slow life-history continuum predicts intraspecific variation in actuarial senescence. *J Anim Ecol* 89:1069–1079.

Cayuela H, Lemaître J-F, Léna J-P, et al (2022b) Sex-related differences in aging rate are associated with sex chromosome system in amphibians. *Evol Int J Org Evol* 76:346–356.

Cerriotti G (1955) DETERMINATION OF NUCLEIC ACIDS IN ANIMAL TISSUES. *J Biol Chem* 214:59–70.

Chistiakov DA, Sobenin IA, Revin VV, et al (2014) Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. *BioMed Res Int* 2014:238463.

Claude A (1946) FRACTIONATION OF MAMMALIAN LIVER CELLS BY DIFFERENTIAL CENTRIFUGATION. *J Exp Med* 84:51–59



Coble MD, Loreille OM, Wadhams MJ, et al (2009) Mystery Solved: The Identification of the Two Missing Romanov Children Using DNA Analysis. PLoS ONE 4:e4838.

Cohen AA, Kennedy BK, Anglas U, et al (2020) Lack of consensus on an aging biology paradigm? A global survey reveals an agreement to disagree, and the need for an interdisciplinary framework. Mech Ageing Dev 191:111316.

Contreras H, Bradley TJ (2009) Metabolic rate controls respiratory pattern in insects. J Exp Biol 212:424–8.

Corley M, Fjerdingstad E (2011) Mating strategies of queens in *Lasius niger* ants-is environment type important? | Behavioral Ecology & Sociobiology | EBSCOhost.

Corona M, Velarde RA, Remolina S, et al (2007) Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. Proc Natl Acad Sci U S A 104:7128–7133.

Courtil J-C (2018) Ralentir le vieillissement : les origines antiques d'une théorie entre physiologie et éthique. Cah Études Anciennes 197–215

Cowdry EV (1953) HISTORICAL BACKGROUND OF RESEARCH ON MITOCHONDRIA. J Histochem Cytochem 1:183–187.

Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P (2007) Social Immunity. Curr Biol 17:R693–R702.

Crespi BJ, Yanega D (1995) The definition of eusociality. Behav Ecol 6:109–115.

Criscuolo F, Monaghan P, Nasir L, Metcalfe NB (2008) Early nutrition and phenotypic development: “catch-up” growth leads to elevated metabolic rate in adulthood. Proc Biol Sci 275:1565–1570.

Dańko MJ, Burger O, Argasiński K, Kozłowski J (2018) Extrinsic Mortality Can Shape Life-History Traits, Including Senescence. Evol Biol 45:395–404.

de Duve C (2007) The origin of eukaryotes: a reappraisal. Nat Rev Genet 8:395–403.

de Jaeger C, Cherin P (2011) Les théories du vieillissement. Médecine Longévité 3:155–174.

De la Fuente IM, Cortés JM, Valero E, et al (2014) On the Dynamics of the Adenylate Energy System: Homeorhesis vs Homeostasis. PLoS ONE 9:e108676.

Delorme P (2021) XII. Louis XVII. Le retour du dauphin perdu. In: Les énigmes de l'histoire de France. Perrin, Paris, pp 223–240

Delwiche CF, Palmer JD (1996) Rampant horizontal transfer and duplication of rubisco genes in eubacteria and plastids. Mol Biol Evol 13:873–882.

Dobson FS (2007) A lifestyle view of life-history evolution. Proc Natl Acad Sci U S A 104:17565–17566.



Doutremepuich C (2012) Les empreintes génétique en pratique judiciaire. Bull Académie Natl Médecine 196:1117–1130.

Duan M, Tu J, Lu Z (2018) Recent Advances in Detecting Mitochondrial DNA Heteroplasmic Variations. *Molecules* 23:323.

Dudek J, Rehling P, van der Laan M (2013) Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochim Biophys Acta* 1833:274–285.

Duffy JE (1996) Eusociality in a coral-reef shrimp. *Nature* 381:512–514.

Ebeling M, Rau R, Malmström H, et al (2021) The rate by which mortality increase with age is the same for those who experienced chronic disease as for the general population. *Age Ageing* 50:1633–1640.

Elorza AA, Soffia JP (2021) mtDNA Heteroplasmy at the Core of Aging-Associated Heart Failure. An Integrative View of OXPHOS and Mitochondrial Life Cycle in Cardiac Mitochondrial Physiology. *Front Cell Dev Biol* 9:625020.

Engel MS, Barden P, Riccio ML, Grimaldi DA (2016) Morphologically Specialized Termite Castes and Advanced Sociality in the Early Cretaceous. *Curr Biol* 26:522–530.

Epel ES, Blackburn EH, Lin J, et al (2004) Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17312–17315.

Ephrussi B, Hottinguer H (1951) On an unstable cell state in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 16:75–85.

Ephrussi B, Slonimski PP (1955) Yeast Mitochondria: Subcellular Units involved in the Synthesis of Respiratory Enzymes in Yeast. *Nature* 176:1207–1208.

Estaquier J, Vallette F, Vayssiere J-L, Mignotte B (2012) The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 942:157–183.

Ferreira Santos P, Arias M, Kapheim K (2019) Loss of Developmental Diapause as Prerequisite for Social Evolution in Bees. *Biol Lett* 15:1–7.

Fjerdingsstad EJ, Gertsch PJ, Keller L (2003) The relationship between multiple mating by queens, within-colony genetic variability and fitness in the ant *Lasius niger*. *J Evol Biol* 16:844–853.

Flatt T (2012) A New Definition of Aging? *Front Genet* 3:148.

Flatt T, Partridge L (2018) Horizons in the evolution of aging. *BMC Biol* 16:93.

Freitak D, Ots I, Vanatoa A, Hörak P (2003) Immune Response Is Energetically Costly in White Cabbage Butterfly Pupae. *Proc Biol Sci* 270:S220–S222

Frenk S, Houseley J (2018) Gene expression hallmarks of cellular ageing. *Biogerontology* 19:547–566.



Gaillard F, Scaillet B, Arndt NT (2011) Atmospheric oxygenation caused by a change in volcanic degassing pressure. *Nature* 478:229–232.

Gaillard J-M, Garratt M, Lemaître J-F (2017) Senescence in Mammalian Life History Traits. In: Jones OR, Shefferson RP, Salguero-Gómez R (eds) *The Evolution of Senescence in the Tree of Life*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 126–155

Gaillard J-M, Lemaître J-F (2020) An integrative view of senescence in nature. *Funct Ecol* 34:4–16.

Galipaud M, Kokko H (2020) Sex, senescence, sources and sinks. *Funct Ecol* 34:55–64.

Gavrilov LA, Gavrilova NS (2001) The reliability theory of aging and longevity. *J Theor Biol* 213:527–545.

Ghesquier D (2002) La centrifugation et la cellule : La déconstruction du protoplasme entre 1880 et 1910 / Centrifugation and the cell : The deconstruction of protoplasm between 1880 and 1910. *Rev Hist Sci* 55:323–377.

Gibbs AG, Johnson RA (2004) The role of discontinuous gas exchange in insects: the chthonic hypothesis does not hold water. *J Exp Biol* 207:3477–3482.

Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, et al (1994) Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 6:130–135.

Giraldo YM, Traniello JFA (2014) Worker senescence and the sociobiology of aging in ants. *Behav Ecol Sociobiol* 68:1901–1919.

Giroud S, Ragger M-T, Baille A, et al (2023) Food availability positively affects the survival and somatic maintenance of hibernating garden dormice (*Eliomys quercinus*). *Front Zool* 20:19.

Gomes NMV, Shay JW, Wright WE (2010) Telomere biology in Metazoa. *FEBS Lett* 584:3741–3751.

Gonzalez DL, Giannerini S, Rosa R (2012) On the origin of the mitochondrial genetic code: Towards a unified mathematical framework for the management of genetic information. *Nat Preced* 1–1.

Greider CW (1991) Telomeres. *Curr Opin Cell Biol* 3:444–451.

Guérin B (2004) *Bioénergétique*. EDP Sciences

Gutiérrez Y, Phung T, Mumma H, et al (2020) Growth and survival of the superorganism: Ant colony macronutrient intake and investment. *Ecol Evol* 10:.

Haag-Liautard C, Coffey N, Houle D, et al (2008) Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* 6:1706–1714.



Haddad LS, Kelbert L, Hulbert AJ (2007) Extended longevity of queen honey bees compared to workers is associated with peroxidation-resistant membranes. *Exp Gerontol* 42:601–609.

Hadley NF, Quinlan MC (1993) Discontinuous Carbon Dioxide Release in the Eastern Lubber Grasshopper *Romalea Guttata* and its Effect on Respiratory Transpiration. *J Exp Biol* 177:169–180.

Hagström E, Andersson SG (2018) The challenges of integrating two genomes in one cell. *Curr Opin Microbiol* 41:89–94.

Hamel S, Gaillard J-M, Yoccoz NG, et al (2010) Fitness costs of reproduction depend on life speed: empirical evidence from mammalian populations. *Ecol Lett* 13:915–935.

Harizanis PC, Gary NE, Hedrick JL (1987) Analysis and Content of ATP in Spermatozoa of Honeybees. *J Apic Res* 26:150–155.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458–460.

Harrison J (2009) Tracheal System. In: *Encyclopedia of Insects*. Elsevier Inc., pp 1011–1015

Harrison JF, McKenzie EKG, Talal S, et al (2023) Air sacs are a key adaptive trait of the insect respiratory system. *J Exp Biol* 226:jeb245712.

Hausmann MF, Marchetto NM (2010) Telomeres: Linking stress and survival, ecology and evolution. *Curr Zool* 56:714–727.

Hazkani-Covo E, Zeller RM, Martin W (2010) Molecular Poltergeists: Mitochondrial DNA Copies (numts) in Sequenced Nuclear Genomes. *PLoS Genet* 6:.

Heinze J (2016) The male has done his work - the male may go. *Curr Opin Insect Sci* 16:22–27.

Heinze J, Frohschammer S, Bernadou A (2013) Queen life-span and total reproductive success are positively associated in the ant *Cardiocondyla cf. kagutsuchi*. *Behav Ecol Sociobiol* 67:1555–1562.

Heinze J, Giehr J (2021) The plasticity of lifespan in social insects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 376:20190734.

Heinze J, Schrempf A (2012) Terminal Investment: Individual Reproduction of Ant Queens Increases with Age. *PLOS ONE* 7:e35201.

Henze K, Martin W (2001) How do mitochondrial genes get into the nucleus? *Trends Genet* 17:383–387.

Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M (2018) Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* 28:436–453.



Hésiode PON dit (1814) LES TRAVAUX et LES JOURS

Hetz SK, Bradley TJ (2005) Insects breathe discontinuously to avoid oxygen toxicity. *Nature* 433:516–519.

Holbrook C, Wright C, Pruitt J (2014) Individual differences in personality and behavioural plasticity facilitate division of labour in social spider colonies. *Anim Behav* 97:177–183.

Hölldobler B, Wilson EO (1978) The multiple recruitment systems of the african weaver ant *Oecophylla longinoda* (Latreille) (Hymenoptera: Formicidae). *Behav Ecol Sociobiol* 3:19–60.

Holman L, Helanterä H, Trontti K, Mikheyev AS (2019) Comparative transcriptomics of social insect queen pheromones. *Nat Commun* 10:1593.

Holmbeck MA, Donner JR, Villa-Cuesta E, Rand DM (2015) A *Drosophila* model for mitochondrial diseases generated by an incompatible interaction between tRNA and tRNA synthetase. *Dis Model Mech* 8:843–854.

Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 14:R115.

House T, Keeling MJ (2011) Epidemic prediction and control in clustered populations. *J Theor Biol* 272:1–7.

Hunt JH (2012) A conceptual model for the origin of worker behaviour and adaptation of eusociality. *J Evol Biol* 25:1–19.

Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, et al (1996) Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet* 12:417–420.

Jaimes Niño LM (2023) Defying Senescence: The causes of death and the costs of living of ant queens. Phd

J.b.s Haldane (1941) *New Paths In Genetics*

Jehaes E, Decorte R, Peneau A, et al (1998) Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette. *Eur J Hum Genet EJHG* 6:383–395.

Jehaes E, Pfeiffer H, Toprak K, et al (2001) Mitochondrial DNA analysis of the putative heart of Louis XVII, son of Louis XVI and Marie-Antoinette. *Eur J Hum Genet EJHG* 9:185–190.

Jemielity S, Chapuisat M, Parker JD, Keller L (2005) Long live the queen: studying aging in social insects. *Age* 27:241–248.

Jemielity S, Kimura M, Parker KM, et al (2007) Short telomeres in short-lived males: what are the molecular and evolutionary causes? *Aging Cell* 6:225–233.





Jones OR, Gaillard J-M, Tuljapurkar S, et al (2008) Senescence rates are determined by ranking on the fast-slow life-history continuum. *Ecol Lett* 11:664–673.

Keeling M (2005) The implications of network structure for epidemic dynamics. *Theor Popul Biol* 67:1–8.

Keeling PJ, Palmer JD (2008) Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet* 9:605–618.

Keller L, Genoud M (1997) Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing. *Nature* 389:958–960.

Keller L, Jemielity S (2006) Social insects as a model to study the molecular basis of ageing. *Exp Gerontol* 41:553–556.

Kipyatkov V, Lopatina E (2009) Temperature and photoperiodic control of diapause induction in the ant *Lepisiota semenovi* (Hymenoptera, Formicidae) from Turkmenistan. *J Evol Biochem Physiol* 45:238–245.

Kirkwood TB, Austad SN (2000) Why do we age? *Nature* 408:233–238.

Kirkwood TB, Cremer T (1982) Cytoogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress. *Hum Genet* 60:101–121.

Kirkwood TB, Holliday R (1979) The evolution of ageing and longevity. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 205:531–546.

Kirkwood TBL (1977) Evolution of ageing. *Nature* 270:301–304.

Kirkwood TBL (2005) Understanding the odd science of aging. *Cell* 120:437–447.

Kirkwood TBL, Kowald A (2019) Disposable Soma Aging Theory. In: Gu D, Dupre ME (eds) *Encyclopedia of Gerontology and Population Aging*. Springer International Publishing, Cham, pp 1–6

Klarsfeld A (2007) Mourir, est-ce bien utile ? *Bull D'histoire D'épistémologie Sci Vie* Volume 14:203–212.

Kleine T, Maier UG, Leister D (2009) DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis. *Annu Rev Plant Biol* 60:115–138.

Koch RE, Buchanan KL, Casagrande S, et al (2021) Integrating Mitochondrial Aerobic Metabolism into Ecology and Evolution. *Trends Ecol Evol* 36:321–332.

Konorov EA, Nikitin MA, Mikhailov KV, et al (2017) Genomic exaptation enables *Lasius niger* adaptation to urban environments. *BMC Evol Biol* 17:39.

Koto A, Tamura M, Wong PS, et al (2023) Social isolation shortens lifespan through oxidative stress in ants. *Nat Commun* 14:5493.



Koubová J, Jehlík T, Kodrík D, et al (2019) Telomerase activity is upregulated in the fat bodies of pre-diapause bumblebee queens (*Bombus terrestris*). *Insect Biochem Mol Biol* 115:103241.

Koubová J, Pangráčová M, Jankásek M, et al (2021) Long-lived termite kings and queens activate telomerase in somatic organs. *Proc R Soc B Biol Sci* 288:20210511.

Kramer BH, Nehring V, Buttstedt A, et al (2021a) Oxidative stress and senescence in social insects: a significant but inconsistent link? *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 376:20190732.

Kramer BH, Nehring V, Buttstedt A, et al (2021b) Oxidative stress and senescence in social insects: a significant but inconsistent link? *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 376:20190732.

Kramer BH, Schaible R, Scheuerlein A (2016) Worker lifespan is an adaptive trait during colony establishment in the long-lived ant *Lasius niger*. *Exp Gerontol* 85:18–23.

Krebs HA, Salvin E, Johnson WA (1938) The formation of citric and  $\alpha$ -ketoglutaric acids in the mammalian body. *Biochem J* 32:113–117

Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113 ( Pt 20):3613–3622.

Lane N, Martin W (2010) The energetics of genome complexity. *Nature* 467:929–934.

Latham KE, Miller JJ (2018) DNA recovery and analysis from skeletal material in modern forensic contexts. *Forensic Sci Res* 4:51–59.

Law JH, Wells MA (1989) Insects as biochemical models. *J Biol Chem* 264:16335–16338

Leigh EG (2010) The group selection controversy. *J Evol Biol* 23:6–19.

Lenoir A (1979) The feeding behaviour and division of work in the ant *Lasius niger* (L.).

Lenoir A, Ataya H (1983) Polyéthisme et répartition des niveaux d'activité chez la fourmi *Lasius niger* L. [Polyethism and distribution of activity levels in the ant *Lasius niger* L.]. *Z Für Tierpsychol* 63:213–232.

Lenoir A, Depickère S, Devers S, et al (2009) Hydrocarbons in the Ant *Lasius niger*: From the Cuticle to the Nest and Home Range Marking. *J Chem Ecol* 35:913–921.

Leverve X, Fontaine E, Péronnet F (2007) Bioénergétique. 13–28.

Levy RI, Schneiderman HA (1958) An Experimental Solution to the Paradox of Discontinuous Respiration in Insects. *Nature* 182:491–493.

Li X, Fang P, Mai J, et al (2013) Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol* 6:19.



Lighton, Berrigan (1995) Questioning paradigms: caste-specific ventilation in harvester ants, *Messor pergandei* and *M. julianus* (Hymenoptera: Formicidae). *J Exp Biol* 198:521–530

Lighton JR (1990) Slow Discontinuous Ventilation in the Namib Dune-sea Ant *Camponotus Detritus* (Hymenoptera, Formicidae). *J Exp Biol* 151:71–82.

Lighton JRB (2007) Respiratory Biology: Why Insects Evolved Discontinuous Gas Exchange. *Curr Biol* 17:R645–R647.

LIGHTON JRB (1998) Notes from Underground: Towards Ultimate Hypotheses of Cyclic, Discontinuous Gas-Exchange in Tracheate Arthropods<sup>1</sup>. *Am Zool* 38:483–491.

Lighton JRB, Halsey LG (2011) Flow-through respirometry applied to chamber systems: Pros and cons, hints and tips. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 158:265–275.

Lighton JRB, Turner RJ (2008) The hygric hypothesis does not hold water: abolition of discontinuous gas exchange cycles does not affect water loss in the ant *Camponotus vicinus*. *J Exp Biol* 211:563–567.

Lima T, Li TY, Mottis A, Auwerx J (2022) Pleiotropic effects of mitochondria in aging. *Nat Aging* 2:199–213.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al (2013) The Hallmarks of Aging. *Cell* 153:1194–1217.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al (2023) Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 186:243–278.

Lubawy J, Chowański S, Adamski Z, Słocińska M (2022) Mitochondria as a target and central hub of energy division during cold stress in insects. *Front Zool* 19:1.

Lucas ER, Keller L (2020) The co-evolution of longevity and social life. *Funct Ecol* 34:76–87.

Lucke JC, Hall W (2005) Who wants to live forever? *EMBO Rep* 6:98–102.

Majoe M, Libbrecht R, Foitzik S, Nehring V (2021) Queen loss increases worker survival in leaf-cutting ants under paraquat-induced oxidative stress. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 376:20190735.

Marais E, Klok CJ, Terblanche JS, Chown SL (2005) Insect gas exchange patterns: a phylogenetic perspective. *J Exp Biol* 208:4495–4507.

Margulis L (1970) Origin of eukaryotic cells: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth. Yale University Press, New Haven

Masuoka Y, Nuibe K, Hayase N, et al (2021) Reproductive Soldier Development Is Controlled by Direct Physical Interactions with Reproductive and Soldier Termites. *Insects* 12:76.



Matthews PGD (2018) The mechanisms underlying the production of discontinuous gas exchange cycles in insects. *J Comp Physiol [B]* 188:195–210.

McInerney J, Pisani D, O’Connell MJ (2015) The ring of life hypothesis for eukaryote origins is supported by multiple kinds of data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370:20140323.

Medvedev ZA (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65:375–398.

Mendez-Romero O, Ricardez-García C, Castañeda-Tamez P, et al (2022) Thriving in Oxygen While Preventing ROS Overproduction: No Two Systems Are Created Equal. *Front Physiol* 13:874321.

Mersch DP, Crespi A, Keller L (2013) Tracking Individuals Shows Spatial Fidelity Is a Key Regulator of Ant Social Organization. *Science* 340:1090–1093.

Metcalf CJE, Roth O, Graham AL (2020) Why leveraging sex differences in immune trade-offs may illuminate the evolution of senescence. *Funct Ecol* 34:129–140.

Meyer A (2008) Genomes evolve, but how? *Nature* 451:771–772.

Michener CD (1974) *The Social Behavior of the Bees: A Comparative Study*. Harvard University Press

Mikhailova AA, Rinke S, Harrison MC (2024) Genomic signatures of eusocial evolution in insects. *Curr Opin Insect Sci* 61:101136.

Moll UM, Zaika A (2001) Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett* 493:65–69.

Moller A (2007) Senescence in relation to latitude and migration in birds. *J Evol Biol* 20:750–7.

Møller AP (2006) Sociality, age at first reproduction and senescence: comparative analyses of birds. *J Evol Biol* 19:682–689.

Monaghan P, Charmantier A, Nussey DH, Ricklefs RE (2008) The evolutionary ecology of senescence. *Funct Ecol* 22:371–378.

Monaghan P, Haussmann MF (2006) Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan? *Trends Ecol Evol* 21:47–53.

Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett* 12:75–92.

Moorad J, Promislow D, Silvertown J (2019) Evolutionary Ecology of Senescence and a Reassessment of Williams’ “Extrinsic Mortality” Hypothesis. *Trends Ecol Evol* 34:519–530.

Morgan ED *Chemical sorcery for sociality: Exocrine secretions of ants (Hymenoptera: Formicidae)*



Morley SA, Nielsen BL (2017) Plant mitochondrial DNA. *Front Biosci Landmark Ed* 22:1023–1032.

Münch D, Amdam GV, Wolschin F (2008) Ageing in a Eusocial Insect: Molecular and Physiological Characteristics of Life Span Plasticity in the Honey Bee. *Funct Ecol* 22:407–421

Nakai K, Tsuruta D (2021) What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and Oxidative Stress in Skin Diseases? *Int J Mol Sci* 22:10799.

Nowak MA, Tarnita CE, Wilson EO (2010) THE EVOLUTION OF EUSOCIALITY. *Nature* 466:1057–1062.

Nussey DH, Coulson T, Festa-Bianchet M, Gaillard J-M (2008) Measuring senescence in wild animal populations: towards a longitudinal approach. *Funct Ecol* 22:393–406.

Okada Y, Sasaki K, Miyazaki S, et al (2015) Social dominance and reproductive differentiation mediated by dopaminergic signaling in a queenless ant. *J Exp Biol* 218:1091–1098.

Oladipupo SO, Wilson AE, Hu XP, Appel AG (2022) Why Do Insects Close Their Spiracles? A Meta-Analytic Evaluation of the Adaptive Hypothesis of Discontinuous Gas Exchange in Insects. *Insects* 13:117.

O'Rourke B (2010) From Bioblasts to Mitochondria: Ever Expanding Roles of Mitochondria in Cell Physiology. *Front Physiol* 1:7.

Park J, Park J (2021) Complete mitochondrial genome of the jet ant *Lasius spathepus* Wheeler, W.M., 1910 (Formicidae; Hymenoptera). *Mitochondrial DNA Part B Resour* 6:505–507.

Parker JD, Parker KM (2006) Ants as naturally long-lived insect models for aging. In: Conn PM (ed). *Academic Press*, pp 277–282

Partridge L, Barton NH (1997) On measuring the rate of ageing. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 263:1365–1371.

Péron G, Lemaître J-F, Ronget V, et al (2019) Variation in actuarial senescence does not reflect life span variation across mammals. *PLOS Biol* 17:e3000432.

Peter Medawar (1951) Medawar 1952 Unsolved Problem

Petralia RS, Mattson MP, Yao PJ (2014) Aging and longevity in the simplest animals and the quest for immortality. *Ageing Res Rev* 0:66–82.

Plattner H, Verkhatsky A (2016) Inseparable tandem: evolution chooses ATP and Ca<sup>2+</sup> to control life, death and cellular signalling. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 371:20150419.

Pollack M, Leeuwenburgh C (2001) Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56:B475-482



Promislow DEL (1991) SENESCENCE IN NATURAL POPULATIONS OF MAMMALS: A COMPARATIVE STUDY. *Evol Int J Org Evol* 45:1869–1887.

Qiu Y, Filipenko SJ, Darracq A, Adams KL (2014) Expression of a transferred nuclear gene in a mitochondrial genome. *Curr Plant Biol* 1:68–72.

Quque M (2020) Coevolution of sociality and ageing in animal societies. These de doctorat, Strasbourg

Rehan SM, Toth AL (2015) Climbing the social ladder: the molecular evolution of sociality. *Trends Ecol Evol* 30:426–433.

Reichert S, Stier A, Zahn S, et al (2014) Increased brood size leads to persistent eroded telomeres. *Front Ecol Evol* 2:

Ricchetti M, Tekaia F, Dujon B (2004) Continued Colonization of the Human Genome by Mitochondrial DNA. *PLoS Biol* 2:.

Rice DW, Palmer JD (2006) An exceptional horizontal gene transfer in plastids: gene replacement by a distant bacterial paralog and evidence that haptophyte and cryptophyte plastids are sisters. *BMC Biol* 4:31.

Ricklefs RE (1998) Evolutionary theories of aging: confirmation of a fundamental prediction, with implications for the genetic basis and evolution of life span. *Am Nat* 152:24–44.

Ricklefs RE (2010) Insights from comparative analyses of aging in birds and mammals. *Aging Cell* 9:273–284.

Robson S, Crozier R (2009) An evaluation of two biochemical methods of age determination in insects (pteridines and lipofuscins) using the ant *Polyrhachis sexpinosa* Latrielle (Hymenoptera: Formicidae). *Aust J Entomol* 48:102–106.

Rolfe DF, Brand MD (1997) The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. *Biosci Rep* 17:9–16.

Ronget V, Gaillard J-M (2020) Assessing ageing patterns for comparative analyses of mortality curves: Going beyond the use of maximum longevity. *Funct Ecol* 34:65–75.

Røy H, Kallmeyer J, Adhikari RR, et al (2012) Aerobic Microbial Respiration in 86-Million-Year-Old Deep-Sea Red Clay. *Science* 336:922–925.

Sagan L (1967) On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14:255–274.

Sanders JL, Newman AB (2013) Telomere length in epidemiology: a biomarker of aging, age-related disease, both, or neither? *Epidemiol Rev* 35:112–131.

Schatz G, Haslbrunner E, Tuppy H (1964) Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 15:127–132.



Schimpf NG, Matthews PGD, White CR (2013) Discontinuous gas exchange exhibition is a heritable trait in speckled cockroaches *Nauphoeta cinerea*. *J Evol Biol* 26:1588–1597.

Schläppi D, Kettler N, Glauser G, et al (2021) Varying impact of neonicotinoid insecticide and acute bee paralysis virus across castes and colonies of black garden ants, *Lasius niger* (Hymenoptera: Formicidae). *Sci Rep* 11:20500.

Schmauck-Medina T, Molière A, Lautrup S, et al (2022) New hallmarks of ageing: a 2022 Copenhagen ageing meeting summary. *Aging* 14:6829–6839.

Schneider S, Schrader C, Wagner A, et al (2011) Stress Resistance and Longevity Are Not Directly Linked to Levels of Enzymatic Antioxidants in the Ponerine Ant *Harpegnathos saltator*. *PloS One* 6:e14601.

Searcy DG (2003) Metabolic integration during the evolutionary origin of mitochondria. *Cell Res* 13:229–238.

Seifert B (1992) A taxonomic revision of the Palaearctic members of the ant subgenus *Lasius* s. str. (Hymenoptera, Formicidae). [antbase.org](http://antbase.org)

Sheldon BC, Verhulst S (1996) Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol* 11:317–321.

Sicard MA (2022) RENCONTRE AVEC BORIS EPHRUSSI, FONDATEUR DE LA GÉNÉTIQUE EN FRANCE. In: Mémoires de l'Académie des Sciences, Inscription et Belles lettres de Toulouse, 2022,. Académie des Sciences, Inscription et Belles lettres de Toulouse, pp 113–120

Simola DF, Graham RJ, Brady CM, et al (2016) Epigenetic (re)programming of caste-specific behavior in the ant *Camponotus floridanus*. *Science* 351:aac6633.

Singhapol C (2013) Mitochondrial localisation of hTERT protects against nuclear DNA damage and mitochondrial ROS production after endogenous and exogenous stress. Thesis, Newcastle University

Sloan DB, Warren JM, Williams AM, et al (2018) Cytonuclear integration and co-evolution. *Nat Rev Genet* 19:635–648.

Sozou PD, Seymour RM (2004) To age or not to age. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 271:457–463.

Speakman JR (2005) Body size, energy metabolism and lifespan. *J Exp Biol* 208:1717–1730.

Speakman JR, Selman C, McLaren JS, Harper EJ (2002) Living fast, dying when? The link between aging and energetics. *J Nutr* 132:1583S–97S.

Speakman JR, Talbot DA, Selman C, et al (2004) Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *Aging Cell* 3:87–95.



Srere PA (1969) [1] Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 3–11

Stearns SC (1989) Trade-Offs in Life-History Evolution. *Funct Ecol* 3:259–268.

Stier A, Bize P, Roussel D, et al (2014) Mitochondrial uncoupling as a regulator of life-history trajectories in birds: an experimental study in the zebra finch. *J Exp Biol* 217:3579–3589.

Stroeymeyt N, Casillas-Pérez B, Cremer S (2014) Organisational immunity in social insects. *Curr Opin Insect Sci* 5:1–15.

Syndercombe Court D (2021) Mitochondrial DNA in forensic use. *Emerg Top Life Sci* 5:415–426.

Szatmári EZ, Csordás A, Kerepesi C (2023) Unique Patterns in Amino Acid Sequences of Aging-Related Proteins. *Adv Biol* e2300436.

Tasaki E, Kobayashi K, Matsuura K, Iuchi Y (2018) Long-Lived Termite Queens Exhibit High Cu/Zn-Superoxide Dismutase Activity. *Oxid Med Cell Longev* 2018:e5127251.

Tasaki E, Sakurai H, Nitao M, et al (2017) Uric acid, an important antioxidant contributing to survival in termites. *PLoS ONE* 12:e0179426.

Tasaki E, Takata M, Matsuura K (2021) Why and how do termite kings and queens live so long? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 376:20190740.

Tatar M, Yin C (2001) Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Exp Gerontol* 36:723–738.

Terblanche JS, Woods HA (2018) Why do models of insect respiratory patterns fail? *J Exp Biol* 221:jeb130039.

Thompson LV (2006) Oxidative stress, mitochondria and mtDNA-mutator mice. *Exp Gerontol* 41:1220–1222.

Thorne BL (1997) Evolution of Eusociality in Termites. *Annu Rev Ecol Syst* 28:27–54

Thorsness PE, Fox TD (1990) Escape of DNA from mitochondria to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 346:376–379.

Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* 5:123–135.

Tricola GM, Simons MJP, Atema E, et al (2018) The rate of telomere loss is related to maximum lifespan in birds. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 373:20160445.

Turbill C, Ruf T, Smith S, Bieber C (2013) Seasonal variation in telomere length of a hibernating rodent. *Biol Lett* 9:20121095.





- Turner CH (1915) The mating of *Lasius Niger* L. *J Anim Behav* 5:337–340.
- van der Rijt S, Molenaars M, McIntyre RL, et al (2020) Integrating the Hallmarks of Aging Throughout the Tree of Life: A Focus on Mitochondrial Dysfunction. *Front Cell Dev Biol* 8:594416.
- Vaupel JW, Baudisch A, Dölling M, et al (2004) The case for negative senescence. *Theor Popul Biol* 65:339–351.
- Vigneron A, Jehan C, Rigaud T, Moret Y (2019) Immune Defenses of a Beneficial Pest: The Mealworm Beetle, *Tenebrio molitor*. *Front Physiol* 10:138.
- Wallin IE (1927) *Symbiogenesis and the origin of species*. Williams & Wilkins company, Baltimore
- Wang Z, Wu M (2014) Phylogenomic reconstruction indicates mitochondrial ancestor was an energy parasite. *PLoS One* 9:e110685.
- Waters JS, Lee W-K, Westneat MW, Socha JJ (2013) Dynamics of tracheal compression in the horned passalus beetle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304:R621-627.
- Weber RE, Vinogradov SN (2001) Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol Rev* 81:569–628.
- Webster MR, Socha JJ, Teresi L, et al (2015) Structure of tracheae and the functional implications for collapse in the American cockroach. *Bioinspir Biomim* 10:066011.
- Weidenmüller A, Mayr C, Kleineidam CJ, Roces F (2009) Preimaginal and adult experience modulates the thermal response behavior of ants. *Curr Biol* 19:1897–1902.
- Westneat MW, Betz O, Blob RW, et al (2003) Tracheal respiration in insects visualized with synchrotron x-ray imaging. *Science* 299:558–560.
- Wheeler WM (1911) The ant-colony as an organism. *J Morphol* 22:307–326.
- Williams GC (1957) Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution* 11:398–411.
- Wilson EO (1971) *The Insect Societies*: Belknap Press, Cambridge, MA
- Wilson EO (2008) One Giant Leap: How Insects Achieved Altruism and Colonial Life. *BioScience* 58:17–25.
- Wilson EO (1997) *Success, Dominance, and the Superorganism: The Case of the Social Insects*. University of California Press
- Woodson JD, Chory J (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet* 9:383–395.



Xie P (2021) Who is the missing “matchmaker” between proteins and nucleic acids? *The Innovation* 2:.

Yan H, Opachaloemphan C, Carmona-Aldana F, et al (2022) Insulin signaling in the long-lived reproductive caste of ants. *Science* 377:1092–1099.

Yang W, Tian Y, Han M, Miao X (2017) Longevity extension of worker honey bees (*Apis mellifera*) by royal jelly: optimal dose and active ingredient. *PeerJ* 5:e3118.

Zapico SC, Ubelaker DH (2013) mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences. *Aging Dis* 4:364–380.

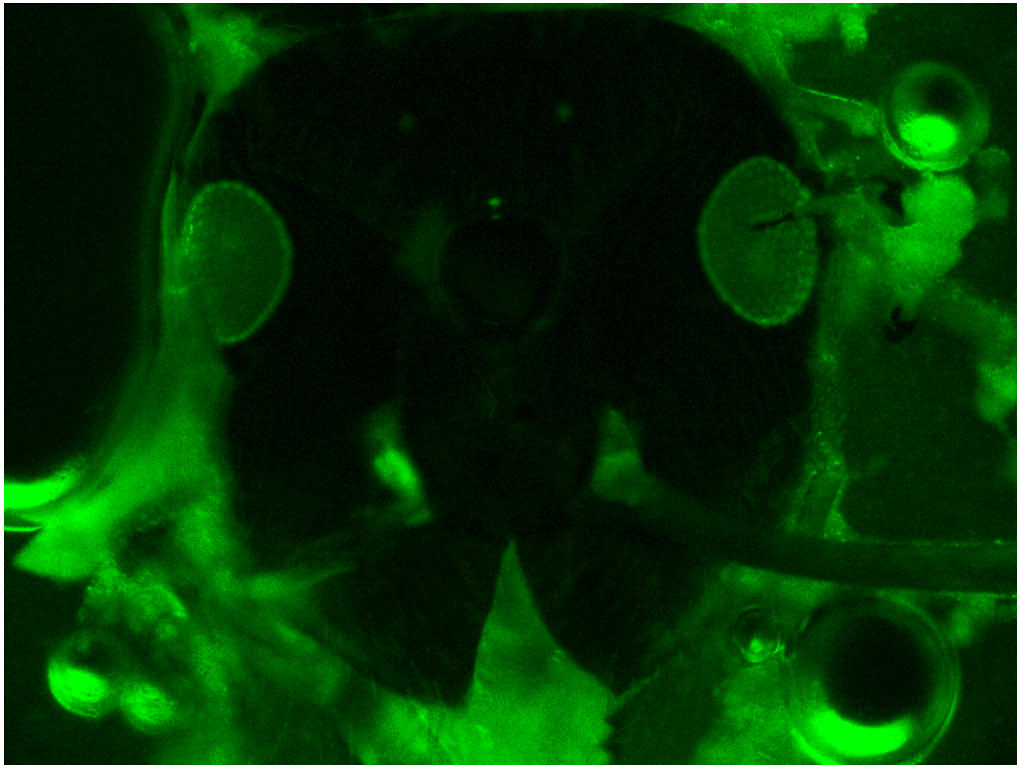
Zhang W, Cui H, Wong L-JC (2012) Comprehensive one-step molecular analyses of mitochondrial genome by massively parallel sequencing. *Clin Chem* 58:1322–1331.

Zhu H, Traore K, Santo A, et al (2016) Oxygen and Oxygen Toxicity: The Birth of Concepts. *React Oxyg Species Apex NC* 1:1–8.

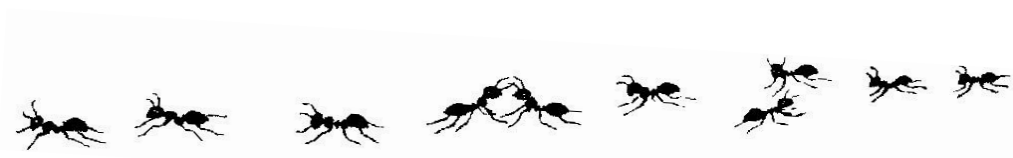
Zupanič Pajnič I, Gornjak Pogorelc B, Balažic J (2010) Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second World War Konfin I mass grave in Slovenia. *Int J Legal Med* 124:307–317.



# Chapitre 1 : Validation des mesures de respirométrie avec une électrode de Clark



*Observation microscopique d'une tête de fourmi en présence de Rhodamine (février 2021).*





## Résumé

Chez *Lasius niger*, on estime que la reine peut vivre plus de 20 ans (record de 28 ans en laboratoire) tandis que les ouvrières ne vivent que 2 ans. Dans le contexte des théories énoncées plus haut, nous avons émis l'hypothèse que **les castes à courte durée de vie devraient présenter un taux métabolique plus élevé et par conséquent une production plus élevée de molécules délétères (ROS).**

Travaillant sur un modèle biologique original, et petit (une ouvrière *Lasius niger* pèse moins de 1mg, une reine environ 30mg) il nous fallait développer ou adapter certaines méthodes au format des insectes, ce à quoi aura été consacrée la première année de thèse. Des électrodes de Clark, qui servent à mesurer la consommation d'isolats de mitochondries (ou d'homogénats tissulaires) en solution ont notamment été commandées pour le projet. Malheureusement, les fourmis employées produisent de l'acide formique, ce qui joue sur le pH et l'intégrité des préparations. Malgré l'emploi de différents tampons pour préserver l'organite, nous n'avons pas réussi à obtenir des préparations exploitables. Nous avons alors décidé d'utiliser les machines comme respiromètre (mesure de consommation des insectes, vivants, en phase gazeuse), et de comparer nos flux respiratoires avec d'autres machines utilisées en routine (système Sable Li-Cor, pour des mesures de production de CO<sub>2</sub>, article de méthodologie soumis). Les chambres de la machine ont été scellées avec de l'agarose au moment des acquisitions, et la consommation en oxygène a ensuite été ramenée à la masse (avec une correction allométrique).



*Fourmi dans une chambre Oroboros*



# Utilization of a Clark electrode device as a respirometer for small insects: a convincing test on ants allowing to detect discontinuous respiration

Maïly Kervella<sup>1,2</sup>, Céline Cansell<sup>3</sup>, François Criscuolo<sup>1</sup> & Frederic Bouillaud<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France – 23 rue du Loess, 67037 Strasbourg Cedex 2, France

<sup>2</sup> Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Université Paris-Cité-Paris 5, Paris, France

<sup>3</sup> Université Paris-Saclay, AgroParisTech, CNRS UMR 0914, INRAE, PNCA, Paris, France

Key words: respirometry, insects, ants, indirect calorimetry

\*Corresponding author: [maily.kervella@iphc.cnrs.fr](mailto:maily.kervella@iphc.cnrs.fr)

## Abstract

Respirometry provides a direct measure of an organism's respiration, which is a significant component of its metabolic rate. Amongst ants, variations in lifespan between different social castes (such as workers and queens) can be substantial, varying according to the species. As metabolic rate is higher in short-living species, we aimed to establish how metabolic rate and longevity may have coevolved within ant casts. Measuring metabolic rate in such tiny animal models can be challenging and as a first methodological step, we validate here the use of a Clark electrode, initially design for measuring mitochondrial respiration control pathways, for flow-through oxygen consumption in ants by comparison with stop flow oxygen consumption and carbon dioxide production utilizing the indirect calorimetry methodology. The global aim is to provide a reliable protocol to conduct accurate comparisons of metabolic rates within and among ant species. As expected, using Clark electrode entails high time resolution and revealed that queens and workers exhibited discontinuous respiration, with episodes of apnea up to 20 minutes.

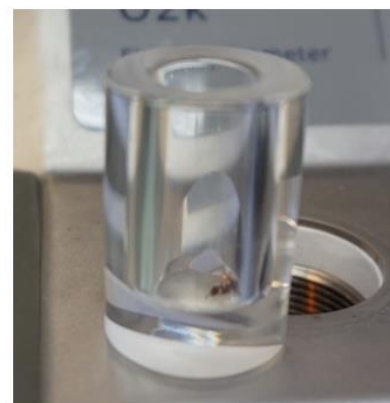


## Introduction

Respirometry is a technique used to measure the metabolic rate in a wide range of organisms. Aerobic respiration is a fundamental process by which these living organisms break down organic molecules (carbohydrates, peptides and lipids) to produce energy, primarily in the form of adenosine triphosphate (ATP). The rate at which an organism utilizes oxygen to produce energy through aerobic respiration to sustain their vital functions and living activities is called metabolic rate [1]. Depending on the recording conditions and physiological status of the individuals, metabolic rate can be measured as BMR for Basal Metabolic Rate, as RMR for Resting Metabolic Rate, as FMR for Field Metabolic rate, or as SMR for Standard Metabolic Rate primarily for invertebrates and poikilothermic vertebrates [2]. In brief, metabolic rate can vary between individuals, species, and even different physiological states under circadian cycle. For example, a resting animal will have a lower metabolic rate compared to the same animal when it is active. Metabolic rate can be measured by different methodologies [3]. First, it can be assessed by direct calorimetry, *i.e.* the measure of the amount of energy expended in the form of heat generated by the body in a calorimeter. Unfortunately, it requires very expensive equipment and may not be used in field studies [4]. With indirect calorimetry (thereafter called respirometry [5]), an evaluation of the heat generated by the organism is obtained via measurements of O<sub>2</sub> consumption and/or CO<sub>2</sub> production associated with the oxidation of energy substrates by the organisms. Gas measurements have the advantage of providing the nature of the substrates that are oxidized when the two gas are simultaneously quantified, allowing the calculation of the respiratory quotient, or RQ, the ratio of CO<sub>2</sub> produced to O<sub>2</sub> consumed (which is the highest for carbohydrate substrates). Indirect calorimetry also informs on metabolic efficiency, which is the number of ATP produced per O<sub>2</sub> consumed. Metabolic efficiency depends not only on the type of substrate oxidized, but also on metabolic state or exercise intensity, both implying additional anaerobic pathways that increase the RQ (CO<sub>2</sub> production increases but not O<sub>2</sub> consumption [6–8]). Thus, respirometry serves as a valuable tool to assess the variations and the efficiency with which individuals modulate their metabolic activities and energy requirements, in response to environmental challenges. Because those regulations are likely to be affected by life stages (*e.g.*, reproduction) and age, respirometry has proven itself to be a key methodology when focusing on organisms' health and fitness (*i.e.*, individual relative reproductive success over life [9,10]).



Getting metabolic data is then crucial for understanding various ecological [11,12], physiological and evolutionary processes [10], having applications in numerous fields from functional ecology up to medical research, for instance in the study of respiratory diseases in humans [13]. Most past studies used the measurement of CO<sub>2</sub> release rather than O<sub>2</sub> consumption for small animals [14]. This is because the lower concentration of CO<sub>2</sub> in the atmosphere (0.4%) makes it easier to detect small changes, allowing for more precise measurements during respirometry experiments and reduced interferences (CO<sub>2</sub> sensors are less sensitive to humidity). Furthermore, CO<sub>2</sub> is a more accurate proxy of the metabolic processes because it reflects the complete oxidation of substrates, and gives a comprehensive picture of the total metabolic activity and energy expenditure of an organism. On the other hand, O<sub>2</sub> consumption is a direct indicator of an organism's aerobic metabolic rate. In the case of studying oxygen consumption and aerobic metabolic rates, an oxygen analyser is therefore more appropriate. Still, respirometry can be challenging to accurately detect gas exchanges in small organisms due to small volume of respiratory gases, one solution being to pool individuals. Additionally, the stress induced during the measurement process can further affect the reliability of the results.





**Figure 1:** Presentation of the two different devices. Top: Oroboros with two acquisition O2k-sV chamber (0.8 cm<sup>3</sup>) and (right) an O2k-sV chamber containing an ant. Down: Calofly system from SABLE, with 32 chambers of 30cm<sup>3</sup> (right).

Social insect colonies have genetically closely related individuals that however may exhibit significant differences in size, behaviour, physiology, and life expectancy. For example, social insects' queens can live up to 10-30 times longer than workers in some species, 800 times for extreme cases [15,16]. Among social insects, ants are therefore a relatable model for studying ageing mechanisms while avoiding the confounding factors of different genetic background [15]. Interspecific comparisons of metabolic rate and longevity covariation has yielded the general observation that metabolic rate is higher in short-living species [17]. However, there are very few existing studies assessing how the metabolic rate and longevity may have coevolved within a given ant species, *i.e.* among individuals of different social casts assuming distinct social roles in the colony. In this respect, studies addressing this question indirectly, via the assessment of different proxies of metabolic differential regulations according to the social role have been recently published [18–21]. Proteins and metabolites associated with metabolic activity are for instance more abundant in *Lasius niger* workers [18,20], which is in line with a higher metabolic rate measured in some species [21]. This raises the question of the evolution of a specific trade-off between energy metabolism and longevity in castes of eusocial species, beyond the classical predictions of the free-radical theory of ageing [22] (*i.e.*, notably the queens' ability to apparently escape to the cost of reproduction [23]).

Our laboratory conducted a project on the comparative study of ageing mechanisms among social casts of insects, based on a measure of metabolic rate in different ants' species. As mitochondrial respiration was assessed using a Clark electrode system (Oxygraph O2k, Oroboros Instrument GmbH, Innsbruck, Austria), the same system was tested for indirect calorimetry. A Clark electrode is a polarographic oxygen sensor usually used for measuring the concentration of dissolved oxygen (DO) in a liquid. It was developed by Leland C. Clark Jr. in the 1950s and has since become a widely used tool in various scientific and industrial applications such as water treatments and biomedical research [24,25]. In 1968, Hayes and collaborators used modified Clark-type electrodes to measure the O<sub>2</sub> consumption in the gaseous phase for insects weighing between 50 and 500 mg. The results were of the same order of magnitude as those obtained with the manometric system [26]. Oroboros instrument

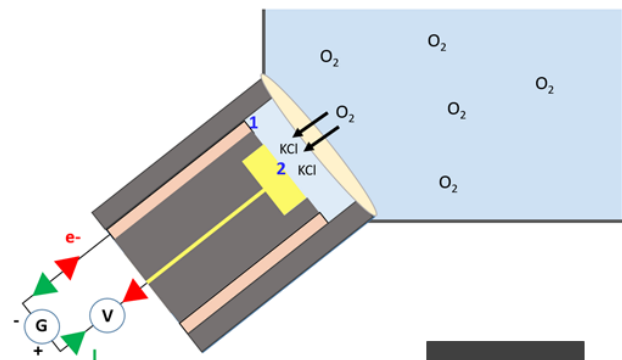


presented Figures 1 (pictures) and Figure 2 (Clark electrode functioning) are used to assess mitochondrial and cell bioenergetics through OXPHOS (mitochondrial oxidative phosphorylation system) thanks to accurate and real-time measurements of DO. The electrode consists of a cathode and an anode separated by an electrolyte, a potassium chloride (KCl) solution. The cathode is made of platinum/gold, while the anode is silver. The electrolyte allows the movement of ions between the two electrodes. When a voltage of 600 to 800 mV (potential for reducing O<sub>2</sub>) is applied to the Clark electrode immersed in a liquid sample containing dissolved O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> molecules diffuse through a gas-permeable membrane, and reach the cathode surface where they undergo a reduction reaction. This results in an electrical current whose intensity is proportional to the concentration of dissolved oxygen in the sample (or oxygen pressure). By measuring this current, which is calibrated from 0% to 100% oxygen, the oxygen concentration can be determined : the output of the Clark electrode is connected to a computer with the data acquisition system that converts the current into an oxygen concentration reading, taking account pressure in the chamber, temperature and pH of the solution [27].

Body size and composition have an impact on resting metabolic rate and energy expenditure [28]. This point is of importance in social insect colonies, as there is polyphenism, which means individuals exhibit physical traits specific to their caste. For example, in *Lasius niger* or *Formica rufibarbis* colonies, queens are larger and heavier compared to workers. These morphological differences, accompanied by division of labour within the colony, imply variations in body composition as in Isoptera [29] . There are also modifications in lipid composition within a caste based on seasonality, with ants being fatter in colder seasons [30], or based on task allocation [31]. Additionally, the mature or non-mature reproductive status of an individual queen also plays a role. In *Lasius niger* queens, fat mass increases by 132% from emergence to mating time [32], even by 455% in *Lasius flavus* [32] Therefore, we believe it is pertinent to explore potential differences in oximetry and allometric coefficient according to caste to scale their metabolism *per* mass unit and facilitate comparison.

In this study, we describe the protocol used to adapt the Oroboros instrument for measuring oxygen consumption in living ants (pools of a few mg), and compared it with currently used indirect calorimetry method for insects. We used three different species with contrasting body masses, to illustrate how those methodologies may underline some metabolic differences among social castes.





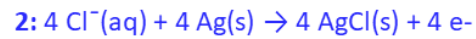
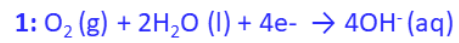
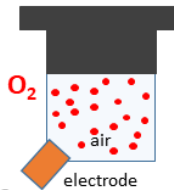
[O2] in air

$$V = nRT/P \text{ avec } P = 101300 \text{ Pa}$$

$$T = 20 + 273,15 \text{ K}$$

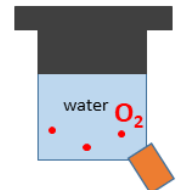
- Volume for 1 mol of an ideal gas  
 $V_0 = 24,0610 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$

- O2 quantity in air = 20,95%  
 $[O_2] = 0,2095 * 1/V_0$   
 $= 8,7070 * 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 $= \underline{8,7070 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}}$



Oroboros Chamber

O2 maximum concentration in O2k chamber at 20°C (calculated by the machine for water) = 284,70 μM  
 $= 284,70 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$   
 $= \underline{0,2847 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}}$



**Figure 2:** Top: Functioning of the Clark electrode. Dissolved oxygen in water passes into KCl solution via a Teflon membrane. Under the influence of the redox potential, the dissolved oxygen is ionized into hydroxide at the cathode (in pink) upon contact; Cl<sup>-</sup> precipitate at the anode (in yellow) to form AgCl. As a result, a very weak current is generated, proportional to the concentration of oxygen in the environment surrounding the electrode. This current is then amplified and used to calculate oxygen concentration in real-time. Below: schematic conversion of units between DatLab software and samples measured with air (on the left) or liquid (on the right) in the chamber.



## Materials and Methods

Three ant species has been used during the tests: the black garden ant (*Lasius niger*, Linnaeus 1758), the carpenter ant (*Camponotus herculeanus*, Linnaeus, 1758) and red-barbed ant (*Formica rufibarbis*, Linnaeus, 1761). Colonies were maintained at room temperature (20-25°C) and natural photoperiod, and were fed *ad libitum* with sugar water and mealworms. They were fasted the day before measurements. Workers were randomly chosen, *i.e.* mixing foragers and nest-workers. For *Lasius niger*, 1 to maximum 13 individuals were pooled per chamber. This size of pooled sample was chosen while taking into account the diameter of a chamber and the fact that *Formicidae* can release formic acid when they are stressed. In comparison, queens were placed alone, as well as workers and queens of *Camponotus herculeanus* and *Formica rufibarbis*.

### Oroboros oxygen consumption set-up

Ant's O<sub>2</sub> consumption was measured using an Oxygraph O2k (Oroboros Instrument GmbH, Innsbruck, Austria) and DatLab software. The system is usually used with stirred liquid suspensions such as isolated mitochondria, and calibrated with water solution equilibrated with ambient air oxygen (100 % oxygen reference point) and by addition of sodium disulfite in excess, a chemical consuming all oxygen present (0 % oxygen). In this case, to proceed with a gaseous atmosphere, the electrodes were calibrated with empty chambers open to ambient air (100 %) or closed and filled with argon for 0%. We therefore assumed that air saturated with oxygen (20.95 % O<sub>2</sub> in air) results a signal equivalent to that when the electrode is in contact with a 100% saturated water (270 μmol.L<sup>-1</sup>), expressed in the O2k software with units in pmol.mL<sup>-1</sup>. The calculation is mapped Figure 2. The molar volume of an ideal gas is V<sub>0</sub>= 24,22 L.mol<sup>-1</sup> at 20°C (293,15°K) and 101,3 kPa. Taking account that O<sub>2</sub> quantity in air is about 20,95 %, [O<sub>2</sub>]= 0,2095\*1/V<sub>0</sub> = 8,65 μmol.mL<sup>-1</sup>, and the conversion factor between O2k units is (8.65 μmol.mL<sup>-1</sup>) / (0.270 μmol.mL<sup>-1</sup>) = 30,58. Oxygen flux obtained with the machine were considered without the background correction automatically proposed by DatLab. Indeed, oxygen consumption by the Clark oxygen electrode has fewer consequences in air than in water due to the 30,58 times higher oxygen content in air. In addition, back diffusion was neglected because of sealing of the chambers with agarose (chambers are not normally completely sealed since stoppers have a section allowing injections with Hamilton syringe).



Empty chambers were sealed at the end of each run day, and oxygen consumption by the polarographic sensor itself remained quite constant as shown Figure 4.

#### Ant oxygen consumption session

We proceeded as follow: ants were isolated from their colony in a tube, temporary anesthetized on ice (less than a minute to allow an easier manipulation of individuals) and placed in a small sized respiration chamber ( $v = 0.800 \text{ mL}$ ,  $12 \text{ mm } \varnothing$ ). Chambers were completely sealed with agarose 2.5% casted in stoppers. Real-time  $\text{O}_2$  consumption was recorded at  $20^\circ\text{C}$  for 40 min after agarose polymerization, and respiration rate was obtained as mean  $\text{O}_2$  consumption during all 40 minutes acquisition (for a total time in the chamber of about an hour).

#### Carbon dioxide production on Sable device:

For methodological comparison, ants' metabolism was also assessed using indirect calorimetry with the Calofly device (as shown in pictures Figure 1), which allowed simultaneous measurements of metabolic activity of individuals placed in different chambers (Sable Systems Europe GmbH). In brief, the setup consists of 32 respirometer chambers of  $30 \text{ cm}^3$  connected to flow devices for generating the main flow ( $37\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Li  $\text{CO}_2$  analyzer (Li-COR Biosciences) and an Oxzilla  $\text{O}_2$  analyzer (Sable Systems) were used. The flow was calibrated using an  $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$  mixture with known concentrations (Air Liquide, S.A. France). The device was operated in a stop-flow mode with a 128-minute cycle analysis, under constant darkness (due to activity measurements) and at room temperature ( $26^\circ\text{C}$ ). Values were regularly compared to a reference empty chamber. Dedicated software ExpeData was used to obtain final metabolic values.

### **Results and Discussion:**

#### The Clark electrode versus indirect calorimetry measurements

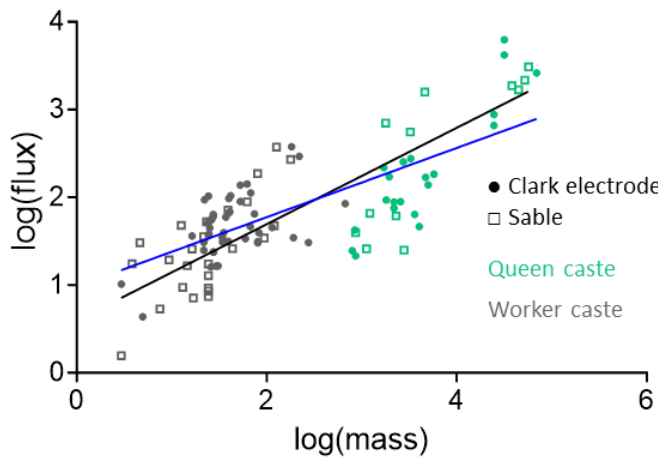
In Figure 4A, an example of an acquisition run is presented, showing that the mean oxygen consumption of a pool of 6 *Lasius niger* workers is of  $2.8956 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$  (equivalent to  $6.2996 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  after conversion, or  $1.050 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  per individual). The layout for the empty control cell is shown in Figure 4B, indicating a zero consumption rate of  $0.0945$  ( $0.21 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Our



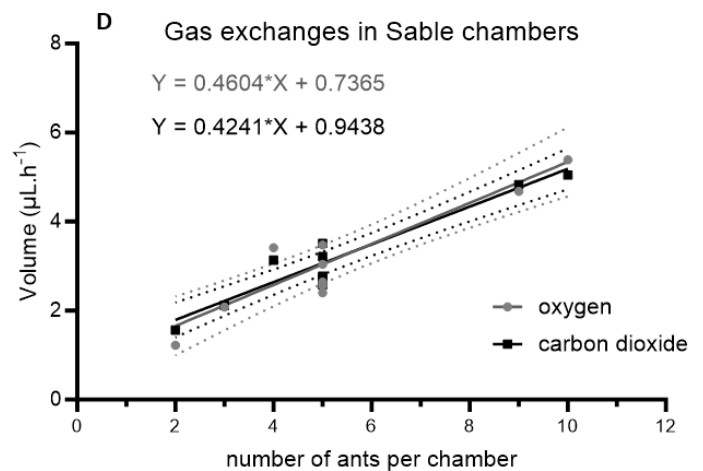
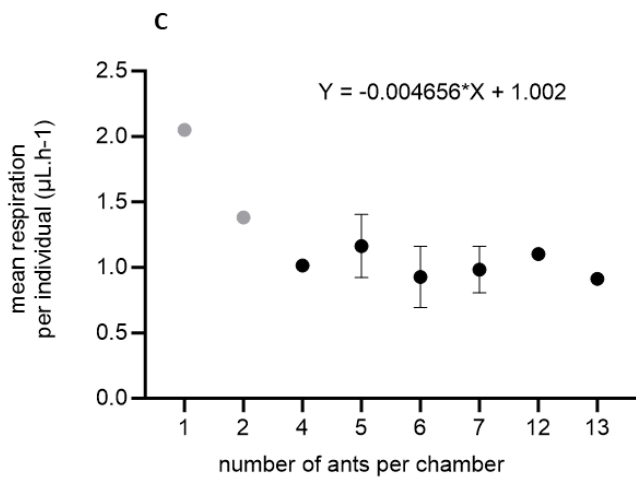
experimental sample size was driven by the need to avoid social stress effects, considering that social isolation of individuals can induce stress, potentially leading to an increase in metabolic rate. In addition, using a larger number of workers can potentially lead to stress and formic acid spread, which may also interfere with gas measurements (data not shown). To investigate the effect of the device (Oroboros vs Sable) used to assess the O<sub>2</sub> flux, a linear model was run (*lm* function) for the three ant species including workers and queens (66 samples measured with Oroboros device, 37 with the Sable device). Results are presented in Figure 3A. Power laws were fitted on log-transformed data of O<sub>2</sub> consumption flux as the response variable, and device, body mass and caste as independent variables, including interactions term between the last two. The *anova (type III)* function was then performed on the model to obtain the p-value of each explanatory variable. Parameter estimates and associated standard errors are given in Table 3B. O<sub>2</sub> consumption scaled to body mass as expected [33,34], but differently depending of the caste (see below for allometric coefficient calculation). Finally, there was no significant effect of the methods used, even though that the Clark electrode values tended to be slightly higher for lower body mass, and lower for the higher body mass. Metabolic measurements were not all done at the same temperature (temperature is not controlled in the Sable device), and thus the temperature effect may still be a confounding factor in our comparison. A temperature effect may have driven part of the differential metabolic results we get with the Sable device, since increased ambient temperature is known to impact ectotherms' physiological traits [33,35,36]). Figure 3C depicts the consistent mean oxygen consumption per *Lasius niger* individual across a range of group sizes, from 1 to 13 individuals. Comparing the three sample sizes with at least four biological replicates (n = 5-7, Figure 3C) led to no significant differences in oxygen consumption relative to the number of ants present in the chamber (F=1.809, df = 2, P = 0.184). The mean oxygen consumption per individual, measured using the Clark electrode was  $0.9851 \pm 0.2325 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ . When a single individual was introduced, the oxygen consumption was doubled (Figure 3C). This may reflect the stress effect linked to isolation as ants are social insects. An alternative explanation for this rise in oxygen consumption could be that social isolation triggers foraging or exploration activity in ants, which may contribute to increased metabolism. Unfortunately, locomotor activity was not assessed in the Oroboros. Most data were obtained for the sample size of 6 individuals, with 21 replicates and a maximal variation of 2,5 times for oxygen consumption. It is not surprising to have variations between individuals: they are not of same



age, do not have same social role among workers (there is an age-related division of labour in the species [37]). In addition, short-term variability in body mass may affect our measurements as metabolic rate was found to covary with individual mass. Furthermore, body composition changes with age and caste [31].

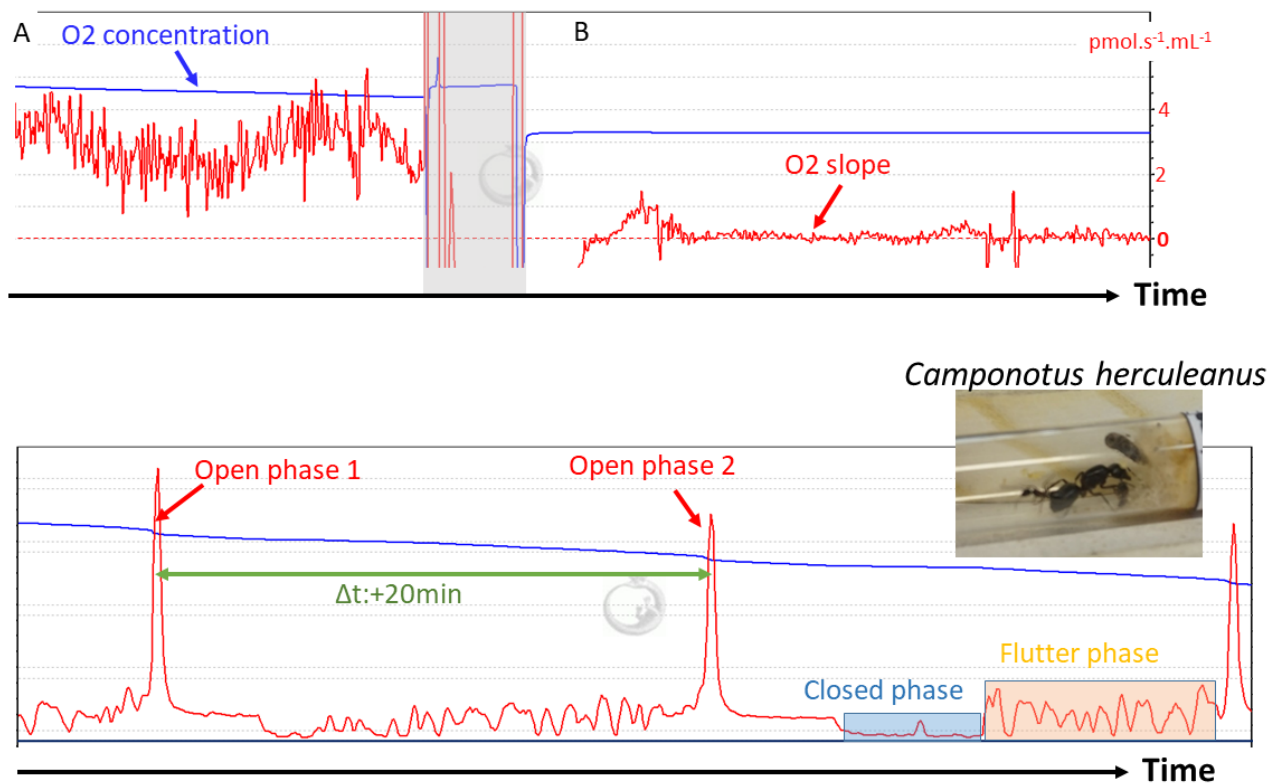


Predictors	flux.log		
	Estimates	CI	p
(Intercept)	1.52	1.27 – 1.76	<0.001
device [S]	-0.09	-0.25 – 0.07	0.259
mass	0.02	0.01 – 0.02	<0.001
caste [W]	-0.38	-0.70 – -0.06	0.019
mass × caste [W]	0.08	0.04 – 0.11	<0.001
Observations	103		
R <sup>2</sup> / R <sup>2</sup> adjusted	0.679 / 0.666		



**Figure 3:** A: Comparison of oxygen consumption measurements obtained using the Clark electrode (Oroboros, 20°C acquisition, blue line and filled circles) and the Sable system (room temperature, black line, squares). Workers are depicted in grey, while queens are shown in green. B: Parameter estimates and associated standard errors of the Mixed Linear Model used to test for differences in metabolic measurements between the two devices. C: Mean oxygen consumption *per ant* in Oroboros chambers depending on the number of individuals (mean ±SD). D: SABLE measurements, where O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> were measured concomitantly to determine RQ in pools of *Lasius niger* in relation to sample size of ants present in the chambers.





**Figure 4:** Top: example of a session recording respiration of 6 workers of *Lasius niger* on DatLab software (A), followed by empty chambers sealed to verify electrode derivation (B). The oxygen concentration in the chamber is measured and indicated in blue, the oxygen flux (or slope) is in red, with units used on the right side. Below: surprisingly, the Clark electrode permitted to observe discontinuous gaz exchanges in some queens and workers from the biggest individuals (i.e., the oxygen pic during open respiration phase). Here, an example on a *Camponotus herculeanus* queen is presented, for which all different phases of respiration already described in insects were observed (open phase with pic of oxygen, closed phase when spiracles do not permit gas exchanges at all, flutter phase with fast fluctuating  $O_2$  consumption).





Jensen and coll. used in the 70's the Warburg technique (based on pressure change in a closed system) to measure ant oxygen consumption [38]. They found individual *Lasius niger* consume  $1.08 \pm 0.50 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  at room temperature, and  $0.68 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  at  $20^\circ\text{C}$  [39] (see Table 1). *Lasius niger* workers had a similar  $\text{O}_2$  consumption between Oroboros and the Warburg system at RT, while being 19.4 % higher than with the gas analyser Sable. At  $20^\circ\text{C}$ , the Oroboros gave 44% higher  $\text{O}_2$  consumption than the Warburg apparatus. Queens *Lasius niger* had an oxygen consumption 27% higher using the Oroboros than using the gas analyser. Results between the two respirometers tested here were comparable when used to assess oxygen consumption in *Formica rufibarbis* workers. Oxygen consumption values obtained using the Oroboros were lowered by a factor two for *F. rufibarbis* queens, and even by three for the *Camponotus herculeanus* queens. Prolonged periods of apnea were observed in the latter case, corresponding to the pattern of discontinuous gas exchange (DGC) as shown in Figure 4. Periods between two burst of oxygen consumption can encompass half of the acquisition time and this can partly influence regression lines. Whether this may also account for differences in metabolic measurements between devices needs further study.

#### Castes do not have a same allometric coefficient

Based on the differences in body composition and the conclusions of the linear regression, we calculated an allometric coefficient for each caste given by the formula:  $Y = a \cdot \text{BW}^b$ , with Y the oxygen consumption, BW the body weight, a and b the coefficient and exponent of the allometric equation (or  $\log(Y) = \log(a) + b \cdot \log(\text{BW})$ ). We found the following values for workers:  $a = 1.914$  and  $b = 0.6492$ , *i.e.* a negative allometry that means that the more the ants are heavy, the less is their metabolic rate. For the queen caste,  $a = 0.234$  and  $b = 1.039$ , b being close to isometry, which means that oxygen consumption increases proportionally with queen's size.



**Table 1:** Gas exchanges measurements in three *Formicinae* species, in workers and queens. Comparison between the two devices tested, and values found in *Jensen et al.*, 1975 in grey [38] or Jensen 1978 [39]. \* indicates when the device measured O<sub>2</sub> consumption, but non-reliable ants RQ.

Species	Caste	Material	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	Respirometry method	T°C	n	mean	SD
<i>L. niger</i>	W	Clark electrode	✓		flow-through	20	33	0.9851	0.2325
<i>L. niger</i>	W	gas analyser	✓*	✓	stop-flow	RT	15	0.8251	0.4095
<i>L. niger</i>	W	manometer	✓		stop-flow	RT	RT	1.08	0.58
<i>L. niger</i>	W	manometer	✓		stop-flow	20	RT	0.68	ND
<i>L. niger</i>	Q	Clark electrode	✓		flow-through	20	8	6.147	2.138
<i>L. niger</i>	Q	gas analyser	✓*	✓	stop-flow	RT	4	4.846	0.9922
<i>C. herculeanus</i>	W	Clark electrode	✓		flow-through	20	7	4.989	0.9015
<i>C. herculeanus</i>	W	gas analyser	✓*	✓	stop-flow	26	5	9.579	2.867
<i>C. herculeanus</i>	W	manometer	✓		stop-flow	RT	RT	13.56	5.57
<i>C. herculeanus</i>	W	manometer	✓		stop-flow	20	RT	7.90	ND
<i>C. herculeanus</i>	Q	Clark electrode	✓		flow-through	20	6	30.34	10.75
<i>C. herculeanus</i>	Q	gas analyser	✓*	✓	stop-flow	26	4	107.6	8.248
<i>F. rufibarbis</i>	W	Clark electrode	✓		flow-through	20	5	4.183	2.019
<i>F. rufibarbis</i>	W	gas analyser	✓	✓	stop-flow	26	5	4.157	1.132
<i>F. rufibarbis</i>	Q	Clark electrode	✓		flow-through	20	6	9.958	1.163
<i>F. rufibarbis</i>	Q	gas analyser	✓*	✓	stop-flow	26	4	15.94	7.682



### Calculation of RQ and circadian cycle effects on Sable device

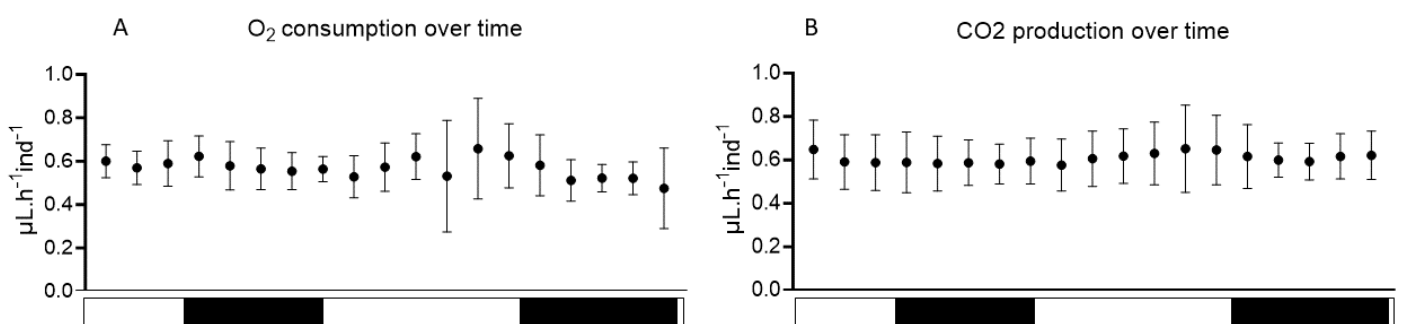
Similar slopes were obtained for O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> flux for different pool sizes of *Lasius niger* workers (Figure 3B). Since oxygen consumption is very low in such models, ΔO<sub>2</sub> after the chamber is opened does not decrease markedly and can be slightly misestimated compared to ΔCO<sub>2</sub>. Therefore, most RQ obtained were higher than 1 (corresponding to lipid synthesis), with no evolution over time despite the fact that the ants were fasting for more than 24 hours before going into the chambers (see Table 2). Hence it was not possible to determine the nature of substrate oxidized. In other insects like flies (note that their metabolic rate is higher than in ants [40,41]), while CO<sub>2</sub> can be assessed accurately in a single fly, flies were pooled *per* 25 individuals to measure O<sub>2</sub> more accurately in order to determine RQ [42].

**Table 2:** RQ obtained during the Sable system acquisition. The cases en grey correspond to RQ>1. n is the number of ants per chamber. Numbers indicated after RQ correspond to the chamber ID (see also Figure 6).

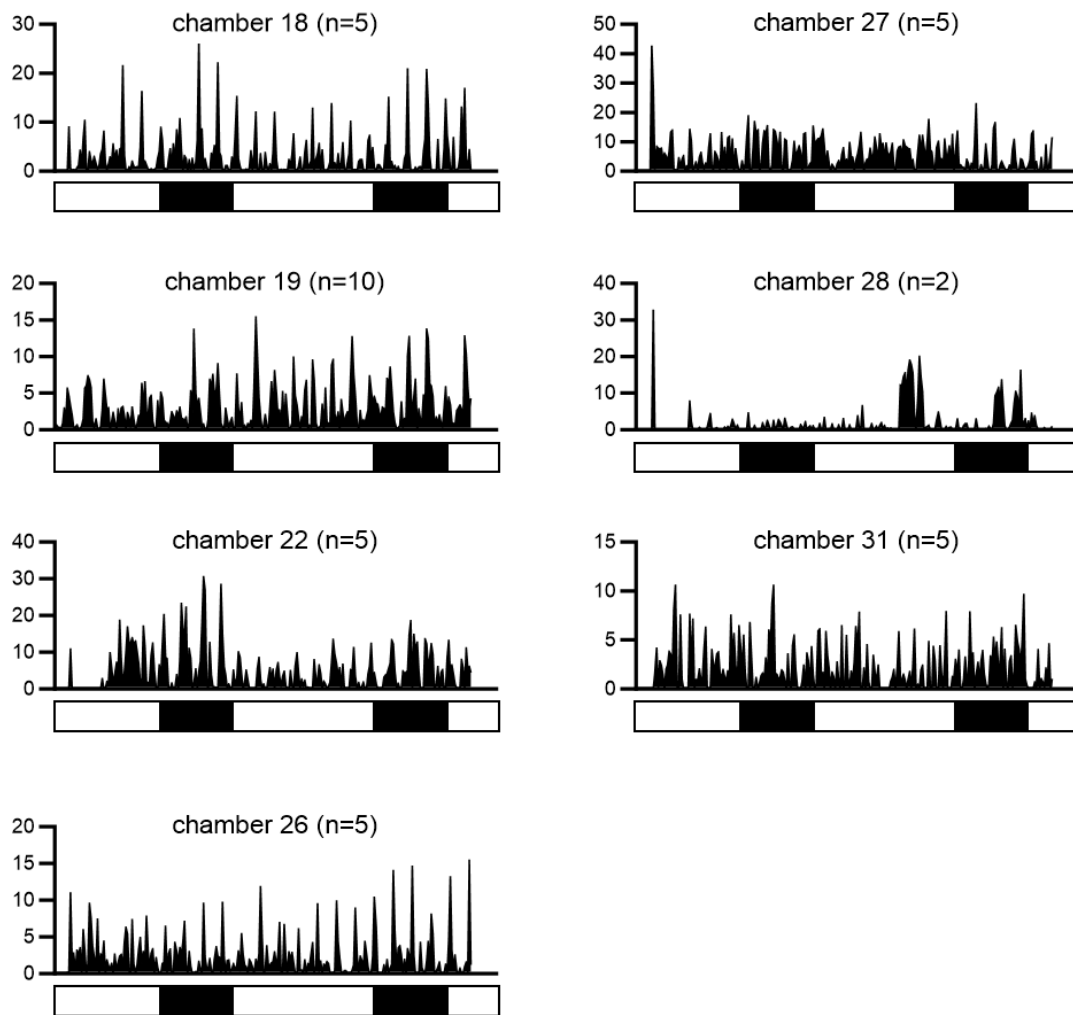
n	5	10	5	5	5	2	5
	RQ_18	RQ_19	RQ_22	RQ_26	RQ_27	RQ_28	RQ_31
16:08:04	0,9843771	0,8479304	1,05812	1,139547	1,009154	1,434737	1,076952
18:16:04	1,035072	0,8973882	1,004417	1,040707	0,9057006	1,372361	0,9867143
20:24:04	0,9778897	0,8655667	0,9245234	1,166726	0,9262109	1,133282	0,9705676
22:32:04	0,7252429	0,9371588	0,8793747	1,164221	0,8486915	1,312386	0,8047348
00:40:04	1,033311	0,8800876	0,7044209	1,266591	0,9256601	1,529205	0,8965204
02:48:04	1,007793	0,9459545	0,9002062	1,567793	0,9969299	1,206778	0,8154089
04:56:04	1,009547	0,9583928	1,020491	1,234648	1,027962	1,039096	1,064386
07:04:04	0,9479125	0,8497361	0,8983144	1,326314	1,137401	1,263359	0,9920726
09:12:04	1,074703	0,9157327	0,9480888	1,36398	1,071026	1,230585	1,066416
11:20:04	1,020342	0,8937598	1,012466	1,226922	1,021975	1,243248	0,9987755
13:28:04	0,9194415	0,9595323	0,8464941	1,261465	0,9967823	0,9980044	0,9851054
15:36:04	0,9130132	0,895824	0,9390872	1,362157	1,005835	1,290588	23,2103
17:44:04	1,07469	1,102292	0,8578913	1,125283	0,9750324	0,9253665	0,9649587
19:52:04	0,9607995	0,9448576	0,8842281	1,22971	0,9579208	1,136717	1,143873
22:00:04	1,107666	0,9464912	0,8810239	1,305277	1,038764	1,063407	1,132444
00:08:04	1,021079	0,9591442	0,8386973	1,334618	1,143914	1,870823	1,372764
02:16:04	0,9762473	1,035334	0,9532833	1,414549	1,145106	1,66622	0,921229
04:24:04	1,11228	0,9954199	0,8597758	1,254105	1,086647	2,125256	1,155826
06:32:04	5,791422	0,9693155	0,963133	1,323314	1,028135	1,638574	1,238518



To assess any circadian rhythm in metabolic rate, a Kwiatkowski-Phillips-Schmidt-Shin (KPSS) test was run on O<sub>2</sub> as CO<sub>2</sub> repeated measurements conducted over 36h, using the *tserie* R package [43]. Respiration rate (both using O<sub>2</sub> as CO<sub>2</sub> values) was significantly constant during the 36h acquisition, as shown in Figure 5, and no circadian rhythm of respiratory metabolism was observed. It can be due to the fact that heterogenous workers were merged (age and behaviour), excluding the possibility to see a social synchronization during the 36 hours acquisition, as it has been shown in honeybee [44]. Note that using our data on activity behaviour (Figure 6), we do not show rhythmicity, which can be surprising based on past studies in other ants. For instance, *Camponotus rufipes* foragers showed circadian foraging behaviour synchronized with food availability [45]. Japanese *Diacamma indicum* also exhibit circadian activity rhythms, showing typical actograms that depend on the tasks within the colony. In the present study, there were no food available, no pupae to take care of, no queen present *i.e.*, all being factors that can act as social rhythm regulators. In addition, young workers are found to be twice as inactive as older ones, displaying a more pronounced daily rhythm [46]. Rhythms also depend on the brood type being taken care of [47]. Interestingly, workers that interacted with different-aged individuals showed a reduction of circadian rhythmicity [48]. A mixed linear model was employed, with CO<sub>2</sub> flux as the response variable (as it is more sensitive than O<sub>2</sub> levels). Both the activity level and the number of ants per chamber were introduced as fixed factors. However, activity level did not exert a significant influence on CO<sub>2</sub> levels. Overall, our results on O<sub>2</sub> as CO<sub>2</sub> measurements are not supporting the hypothesis that there is a circadian rhythm in metabolic rate in our species, or that increased levels of locomotor activity lead to higher oxygen consumption.



**Figure 5:** mean O<sub>2</sub> consumption (A)/ CO<sub>2</sub> production (B) per ant during 36 hours acquisition. White bars labelled “Day”; black bars labelled “Nighttime”, but ants were in continuous dark due to activity detectors. Measurements have been conducted on 7 chambers with pool of 2 to 10 individuals.



**Figure 6:** Ants’ locomotor activity measured in the seven chambers used for RQ and circadian rhythm measurements by the SABLE system (numerous of the chamber used table 2). White bars labelled “Day”; black bars labelled “Nighttime”, but ants were in continuous dark due to activity detectors. Relative activity for 10 min is given in ordinate.



### The Clark electrode allows to analyse discontinuous gas exchanges in larger species

Interestingly, the flow-through system allowed observation of discontinuous gas exchanges (DGC, Figure. 4) in the biggest ants (*Camponotus herculeanus*). This has been previously described in other ant models, notably *Camponotus* species [49,50]. With the system being closed and lacking any gas homogenization, as achieved with a stirrer in an aqueous phase, the Clark electrode gave distinct and clear bursts of O<sub>2</sub> (slightly smoothed), making our protocol highly adapted to the study of discontinuous respiration in insects. There are a few comparisons of discontinuous respiration among castes of a same species in literature: within the same colony, ant castes may exhibit different gas patterns depending on the habitat characteristics and social roles [51,52]. Lighton and Berrigan discussed the fact that queen ants are confined to underground and hypercapnic chambers. Worker ants, in contrast, move between these chambers and the surface for colony tasks and should then have a normoxic metabolism. As a result, queens are predicted to likely use DGC during anoxia, thereby also reducing respiratory water loss. For foraging workers, the DGC probably helps to also lower transpirational water loss rates based on external conditions [53]. Based on available evidence, the DGC could potentially serve multiple adaptive functions, although their general occurrence remains uncertain [54]. Another explanation that benefits the metabolic rate and oxidative stress theories for social organisms is the oxidative damage hypothesis. The closed phase is characterized by a rapid decrease in tracheal oxygen concentration to low partial pressures, while a crucial flutter phase ensures oxygen supply matches tissue consumption rates [55]. Matthews and White also suggested that queen ants might also exhibit DGCs due to reduced brain size and activity related to their limited behavioural repertoires and a lack of visual stimulation found in their claustral condition [56,57]. Furthermore, metabolic rate has been shown lowest for queens using DGC in *Pogonomyrmex barbatus*, intermediate for individuals using cyclic gas exchange, and highest for individuals using continuous gas exchange [58]. Consequently, DGC may lower oxidative stress.



## General conclusion

The study confirmed the Clark electrode's suitability for quantifying oxygen consumption in ants, successfully capturing DGC in larger ants. This device offers temperature control and quasi-continuous measurements (1 measurement every 2 seconds for the shortest interval). However, it only provides two measures per run, and due to sealed chambers, additional waiting time is needed for agarose polymerization, which can be time-consuming for numerous insects. Moreover, while the results seem promising, it raises the question of whether they are sufficient to detect differences among workers with distinct social roles. For investigating DGC in smaller individuals, it implies that they are placed alone in respirometry chambers, and we highlighted putative stress effects on gas consumption. In that case, a more sensitive alternative system might be preferable, with a controlled flux allowing detailed description of DGC phases that are very short in time. Finally, our study also emphasizes the consideration of a different allometric coefficient based on caste for normalizing respirometry data.

**Conflict of interest declaration.** We declare we have no competing interests.

**Authors' contributions.** MK and CC did measurements, MK and FC wrote a first version of the text and all co-authors drafted the final manuscript and gave their approval for publication.

**Funding.** The ETERNEEL project was funded by a grant (2020-2021) from the MITI agency (Mission pour les Initiatives Transverses et Interdisciplinaires) of the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), which also granted M. Kervella with a PhD grant (2020-2023).

**Acknowledgements.** We acknowledge the technical support from Functional and Physiological Exploration platform (FPE) of the Université Paris Cité, CNRS, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, F-75013 Paris for generously providing us access to their Sable device. The authors are grateful to the CERFE team of the IPHC for taking care of our ant colonies, and would also like to express gratitude to Mary Lucienne Waller for proofreading the language.



## References

1. Lighton J. Measuring Metabolic Rates: A Manual for Scientists. Measuring Metabolic Rates: A Manual For Scientists. 2008.
2. Baškiera S, Gvoždík L. Repeatability and heritability of resting metabolic rate in a long-lived amphibian. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 1 mars 2021;253:110858.
3. Schoeller DA, Racette SB. A review of field techniques for the assessment of energy expenditure. *J Nutr*. nov 1990;120 Suppl 11(11 Suppl):1492-5.
4. Battley EH. The advantages and disadvantages of direct and indirect calorimetry. *Thermochim Acta*. 15 févr 1995;250(2):337-52.
5. Even PC, Nadkarni NA. Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. sept 2012;303(5):R459-76.
6. Jacobs DO, Matsuda T. 59 - Energetics. In: Souba WW, Wilmore DW, éditeurs. *Surgical Research* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2001. p. 813-23.
7. Gribok A, Leger JL, Stevens M, Hoyt R, Buller M, Rumpler W. Measuring the short-term substrate utilization response to high-carbohydrate and high-fat meals in the whole-body indirect calorimeter. *Physiol Rep*. 28 juin 2016;4(12):e12835.
8. Li X, Yu C, Yao J, Wang Z, Lu S. An Online Respiratory Quotient-Feedback Strategy of Feeding Yeast Extract for Efficient Arachidonic Acid Production by *Mortierella alpina*. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2018
9. Speakman JR. The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 8 août 2007;363(1490):375-98.
10. Welcker J, Speakman JR, Elliott KH, Hatch SA, Kitaysky AS. Resting and daily energy expenditures during reproduction are adjusted in opposite directions in free-living birds. *Funct Ecol*. 2015;29(2):250-8.
11. Brown JH, Gillooly JF, Allen AP, Savage VM, West GB. Toward a Metabolic Theory of Ecology. *Ecology*. 2004;85(7):1771-89.
12. van der Meer J. Metabolic theories in ecology. *Trends Ecol Evol*. 1 mars 2006;21(3):136-40.
13. De Waele E, van Zanten ARH. Routine use of indirect calorimetry in critically ill patients: pros and cons. *Crit Care*. 5 mai 2022;26:123.





14. Lighton JRB, Halsey LG. Flow-through respirometry applied to chamber systems: Pros and cons, hints and tips. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* mars 2011;158(3):265-75.
15. Keller L, Jemielity S. Social insects as a model to study the molecular basis of ageing. *Exp Gerontol.* juin 2006;41(6):553-6.
16. Johnson B, Carey JR. Hierarchy and Connectedness as Determinants of Health and Longevity in Social Insects. In: *Sociality, Hierarchy, Health: Comparative Biodemography: A Collection of Papers [Internet].* National Academies Press (US); 2014
17. Pearl R. *The rate of living.* University of London Press, LTD. 1928;
18. Quque M, Benhaim-Delarbre M, Deneubourg JL, Sueur C, Criscuolo F, Bertile F. Division of labour in the black garden ant (*Lasius niger*) leads to three distinct proteomes. *J Insect Physiol.* sept 2019;117:103907.
19. Quque M, Bles O, Bénard A, Héraud A, Meunier B, Criscuolo F, et al. Hierarchical networks of food exchange in the black garden ant *Lasius niger*. *Insect Sci.* juin 2021;28(3):825-38.
20. Quque M, Villette C, Criscuolo F, Sueur C, Bertile F, Heintz D. Eusociality is linked to caste-specific differences in metabolism, immune system, and somatic maintenance-related processes in an ant species. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 31 déc 2021;79(1):29.
21. Beros S, Lenhart A, Scharf I, Negroni MA, Menzel F, Foitzik S. Extreme lifespan extension in tapeworm-infected ant workers. *R Soc Open Sci.* 19 mai 2021;8(5):202118.
22. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol.* 1 juill 1956;11(3):298-300.
23. Monroy Kuhn JM, Korb J. Editorial overview: Social insects: aging and the re-shaping of the fecundity/longevity trade-off with sociality. *Curr Opin Insect Sci.* 1 août 2016;16:vii-x.
24. Kumar Kundu B. Chapter 1 - Introduction to sensors and types of biosensors. In: Singh L, Mahapatra D, Kumar S, éditeurs. *Multifaceted Bio-sensing Technology [Internet].* Academic Press; 2023 [cité 7 août 2023]. p. 1-12. (Bioelectrochemical Systems: The way forward; vol. 4).
25. Qazi S, Raza K. Smart biosensors for an efficient point of care (PoC) health management. In: *Smart Biosensors in Medical Care [Internet].* Elsevier; 2020



26. Hayes DK, Schechter MS, Mensing E, Horton J. Oxygen uptake of single insects determined with a polarographic oxygen electrode. *Anal Biochem.* 10 oct 1968;26(1):51-60.
27. Gnaiger E. Polarographic Oxygen Sensors, the Oxygraph, and High-Resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function. In: *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2008 [cité 22 août 2023]. p. 325-52.
28. Cunningham JJ. Body composition as a determinant of energy expenditure: a synthetic review and a proposed general prediction equation. *Am J Clin Nutr.* 1 déc 1991;54(6):963-9.
29. Costa-Leonardo AM, Laranjo LT, Janei V, Haifig I. The fat body of termites: Functions and stored materials. *J Insect Physiol.* 1 juin 2013;59(6):577-87.
30. Roeder DV, Remy S, Roeder KA. Temperature influences lipid content in the red harvester ant, *Pogonomyrmex barbatus*. *J Insect Sci Online.* 1 mai 2023;23(3):14.
31. Dussutour A, Poissonnier LA, Buhl J, Simpson SJ. Resistance to nutritional stress in ants: when being fat is advantageous. *J Exp Biol.* 15 mars 2016;219(6):824-33.
32. Keller L, Passera L. Size and fat content of gynes in relation to the mode of colony founding in ants (Hymenoptera; Formicidae). *Oecologia.* août 1989;80(2):236-40.
33. Vogt J, Appel A. Standard metabolic rate of the fire ant, *Solenopsis invicta* Buren: Effects of temperature, mass, and caste. *J Insect Physiol.* 1 juill 1999;45:655-66.
34. Waters JS, Holbrook CT, Fewell JH, Harrison JF, Gaston AEKJ, DeAngelis EDL. Allometric Scaling of Metabolism, Growth, and Activity in Whole Colonies of the Seed-Harvester Ant *Pogonomyrmex californicus*. *Am Nat.* 2010;176(4):501-10.
35. Ko H, Komilian K, Waters JS, Hu DL. Metabolic scaling of fire ants (*Solenopsis invicta*) engaged in collective behaviors. *Biol Open.* 28 févr 2022;11(2):bio059076.
36. Lighton JRB. Individual and Whole-Colony Respiration in an African Formicine Ant. *Funct Ecol.* 1989;3(5):523-30.
37. Lenoir A, Ataya H. Polyéthisme et répartition des niveaux d'activité chez la fourmi *Lasius niger* L. [Polyethism and distribution of activity levels in the ant *Lasius niger* L.]. *Z Für Tierpsychol.* 1983;63(2-3):213-32.
38. Jensen TF, Nielsen M. The influence of body size and temperature on worker ant respiration. *Nat Jutl.* 1 janv 1975;18:21-5.



39. Jensen TF. Annual Production and Respiration in Ant Populations. *Oikos*. 1978;31(2):207.
40. Khazaeli AA, Van Voorhies W, Curtsinger JW. Longevity and Metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. janv 2005;169(1):231-42.
41. Kucherenko MM, Marrone AK, Rishko VM, Magliarelli H de F, Shcherbata HR. Stress and muscular dystrophy: A genetic screen for Dystroglycan and Dystrophin interactors in *Drosophila* identifies cellular stress response components. *Dev Biol*. 15 avr 2011;352(2):228-42.
42. Brown EB, Klok J, Keene AC. Measuring metabolic rate in single flies during sleep and waking states via indirect calorimetry. *J Neurosci Methods*. 1 juill 2022;376:109606.
43. Adrian Trapletti and Kurt Hornik. tseries: Time Series Analysis and Computational Finance version 0.10-54 from CRAN
44. Southwick EE, Moritz RFA. Social synchronization of circadian rhythms of metabolism in honeybees (*Apis mellifera*). *Physiol Entomol*. juin 1987;12(2):209-12.
45. Mildner S, Roces F. Plasticity of Daily Behavioral Rhythms in Foragers and Nurses of the Ant *Camponotus rufipes*: Influence of Social Context and Feeding Times. *PLOS ONE*. 18 janv 2017;12(1):e0169244.
46. Fuchikawa T, Okada Y, Miyatake T, Tsuji K. Social dominance modifies behavioral rhythm in a queenless ant. *Behav Ecol Sociobiol*. 2014;68(11):1843-50.
47. Fujioka H, Abe MS, Fuchikawa T, Tsuji K, Shimada M, Okada Y. Ant circadian activity associated with brood care type. *Biol Lett*. févr 2017;13(2):20160743.
48. Fujioka H, Abe MS, Okada Y. Ant activity-rest rhythms vary with age and interaction frequencies of workers. *Behav Ecol Sociobiol*. mars 2019;73(3):30.
49. Lighton JR. Slow Discontinuous Ventilation in the Namib Dune-sea Ant *Camponotus Detritus* (Hymenoptera, Formicidae). *J Exp Biol*. 1 juill 1990;151(1):71-82.
50. Lighton JRB, Turner RJ. The hygric hypothesis does not hold water: abolition of discontinuous gas exchange cycles does not affect water loss in the ant *Camponotus vicinus*. *J Exp Biol*. 15 févr 2008;211(4):563-7.
51. Lighton null, Berrigan null. Questioning paradigms: caste-specific ventilation in harvester ants, *Messor pergandei* and *M. julianus* (Hymenoptera: Formicidae). *J Exp Biol*. 1995;198(Pt 2):521-30.



52. Vogt JT, Appel AG. Discontinuous gas exchange in the fire ant, *Solenopsis invicta* Buren.: Caste differences and temperature effects. *J Insect Physiol.* 1 avr 2000;46(4):403-16.
53. LIGHTON JRB. Notes from Underground: Towards Ultimate Hypotheses of Cyclic, Discontinuous Gas-Exchange in Tracheate Arthropods1. *Am Zool.* 1 juin 1998;38(3):483-91.
54. Oladipupo SO, Wilson AE, Hu XP, Appel AG. Why Do Insects Close Their Spiracles? A Meta-Analytic Evaluation of the Adaptive Hypothesis of Discontinuous Gas Exchange in Insects. *Insects.* 22 janv 2022;13(2):117.
55. Bradley TJ. Discontinuous ventilation in insects: protecting tissues from O<sub>2</sub>. *Respir Physiol Neurobiol.* nov 2006;154(1-2):30-6.
56. Matthews PGD, White CR. Reversible brain inactivation induces discontinuous gas exchange in cockroaches. *J Exp Biol.* 1 juin 2013;216(11):2012-6.
57. Julian GE, Gronenberg W. Reduction of brain volume correlates with behavioral changes in queen ants. *Brain Behav Evol.* 2002;60(3):152-64.
58. Gibbs AG, Johnson RA. The role of discontinuous gas exchange in insects: the chthonic hypothesis does not hold water. *J Exp Biol.* sept 2004;207(Pt 20):3477-82.



Chapitre 2 : Comparaison des capacités énergétiques  
des différentes castes de *Lasius niger*



Aquarelle de reine *Lasius niger* (Pauline Kervella)





## Résumé

Dans cet article, nous avons montré que les **reines** **présentaient un taux métabolique significativement plus bas que celui des ouvrières**. Nous avons également constaté **que les ouvrières les plus âgées (les fourrageuses) ont le métabolisme le plus élevé dans la colonie**. Des mesures de densité mitochondriales ont été faites via la mesure de la citrate synthase, par qPCR ainsi qu'en microscopie électronique.

Les ROS étant très instables, il est difficile d'obtenir des résultats reproductibles sur de faibles effectifs, notamment en microscopie. Nous avons alors décidé de déduire indirectement leur production par des mesures de dommages liés au stress oxydant. L'aconitase et la fumarase sont deux enzymes du cycle de l'acide citrique (ayant lieu dans la matrice mitochondriale). La première est sensible au stress oxydant, la seconde non. Leur ratio sert donc d'indicateur du stress lié aux ROS. Cette mesure ne nous a **pas permis de montrer que les reines ont moins de dommages liés aux ROS au sein des mitochondries**.

Nous avons également dosé le glutathion, qui sert plus généralement d'indicateur du stress oxydant dans la cellule. Aucune différence n'a non plus été constatée entre les individus.

Enfin, nous avons mesuré l'activité de la catalase, l'une des enzymes de la première barrière antioxydante dans la cellule. Etonnamment, **les reines** **présentaient une activité catalase significativement bien moins élevée**. En réalité, les enzymes anti-oxydantes ne sont pas toujours associées à un phénotype longévif chez les insectes sociaux, et



# Mitochondrial maintenance is involved in the exceptional longevity of reproductive queens of the eusocial ant *Lasius niger*

Maïly KERVELLA<sup>1,2,3</sup>, Fabrice BERTILE<sup>1,2</sup>, Alexandra Granger-Farbos<sup>4</sup>, Benoît PINSON<sup>4</sup>, Alain SCHMITT<sup>3</sup>, Martin QUQUE<sup>1,2</sup>, Frédéric BOUILLAUD<sup>3#</sup>, François CRISCUOLO<sup>1,2#</sup>

<sup>1</sup>Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, CNRS UMR 7178; <sup>2</sup>Université de Strasbourg ; <sup>3</sup>Institut Cochin, Inserm U1016 ; <sup>4</sup>Service analyses Métaboliques-TBMcore Université Bordeaux - CNRS UAR 3427 - INSERM US005

Contact: Maïly.kervella@gmail.com

# shared senior authorship

## Significance statement (120 words):

While social insect castes exhibit huge differences in longevity, *i.e.* months for workers vs. decades for queens, our research uncovers how mitochondrial bioenergetics underpins the queen's remarkable longevity. Contrary to conventional theories, we reveal that it's not merely about oxidative stress management but rather a sophisticated interplay of factors. Our findings highlight the queen's ability to optimize energy production, metabolic rate, and invest in mitochondrial maintenance, providing crucial insights into the enigmatic queen's paradox between longevity and reproduction. By digging these mechanisms, we pave the way for deeper exploration into the evolutionary underpinnings of insect longevity.





## Abstract

Most social insects are characterized by a wide disparity in life-history traits between individuals of the same species. Sterile workers live for months or years while queens may live for decades. Theories of ageing emphasise the importance of metabolism and oxidative stress in explaining longevity, with mitochondrial bioenergetics standing at the crossroads of energy and reactive oxygen species production. Studying mitochondrial functioning therefore takes on its full relevance in determining the nature of the mechanisms that explain the contrasting longevities between insect social castes. We addressed this question in an eusocial species, the black garden ant *Lasius niger*. We found that caste differences in mitochondrial bioenergetics and oxidative balance only partially match with predictions of the oxidative stress theory of ageing. Long-lived queens were characterized by a lower metabolic rate, lower mitochondrial density but not necessarily lower levels of mitochondrial oxidative damages. Despite this, queens also presented unexpected higher levels of ATP content and energy load in their mitochondria. Converging clues suggested better mitochondrial maintenance in queen ants, with enhanced dynamics of mitochondrial fission and fusion and a more marked expression of mitochondrial enzymes of the Krebs cycle. Overall, our data paves the way for studying deeper into how the rate of ATP production *per* mitochondria is related to the investment in mitochondrial and somatic cellular maintenance, and whether it has specifically been selected as a key mechanism in defining the still unexplained paradoxical longevity of the queen reproductive caste.

**Keywords:** Oxidative stress theory of Ageing, metabolism, somatic maintenance, indirect calorimetry, mitochondrial oximetry



## Introduction

In the fields of gerontology and anti-ageing medicine, a distinction is made between chronological age, which is the amount of time elapsed since birth, and biological/or physiological age, estimated using the progressive and highly variable rate of accumulation of damage in biomolecules and somatic cells. These damages lead to compromised biological functions proposed as hallmarks of ageing [1]. The list of the original 9 hallmarks (among which genomic instability, telomere attrition, mitochondrial dysfunction, cellular senescence...) recently completed by additional ones [2](e.g. compromised autophagy, inflammation) underline the involvement of mitochondria as the main site of both generation and integration of oxidative stress in the ageing process [3–5].

Mitochondria stand at the crossroads of bioenergetics and oxidative stress theory of ageing since: 1) this organelle is often referred to as the "powerhouse" of the cell because it is primarily responsible for producing adenosine triphosphate (ATP), the cell's main source of energy, 2) mitochondria are also referred to as the main producers of inevitable by-products of aerobic metabolism, namely reactive oxygen species (ROS) [6–8]. In that respect, some old-established theories of ageing emphasise the importance of energy metabolism and oxidative stress in explaining longevity and senescence [9,10,6]. Ageing is typified by a progressive decline in mitochondrial activity and stress resistance (*via* the mitochondrial stress response), leading to multiple effects such as decreased energy production (ATP), enhanced ROS production, accumulation of deleterious mitochondrial DNA mutations and abnormal accumulation of metabolites of the tricarboxylic acid cycle [11,12]. Some of these hallmarks of mitochondrial ageing have been key instruments in triggering the study of mitochondria in the field of the evolutionary biology of ageing [13,14]. Evolutionary biologists are not interested in solving the ageing issue, but rather in explaining the origins of the variability in ageing rates among and within species. In that context, an ever-growing numbers of studies have paved the way for mitochondrial explanations of, for instance from the interspecific to the interindividual levels of interest, the paradoxical longevity of hypermetabolic birds [15,16], the relationship between mitochondrial respiration and the whole organism energy expenditure [17,18], and as a correlate the link with individual fitness through the regulation of energy production and investment in competing life-history traits such as growth, reproduction and somatic maintenance (i.e., longevity) [19,20]. To date, the large majority of



these studies implemented the mitochondria in their explanatory schema by focusing on the multiple links among mitochondrial respiration ( $O_2$  consumption) and ATP/ROS production, using mitochondrial efficiency (i.e., the rate of ATP per  $O_2$  consumed or ROS produced) as the key variable [21–23]. In a nutshell, the oxidative phosphorylation (OXPHOS) merges (i) the creation of a protonmotive force between the mitochondrial matrix and the internal mitochondrial membrane space using the oxidation of food-derived energy into electron transport by the electron transport chain (i.e., OX), and (ii) the phosphorylation of ADP into ATP by the ATP synthase that feeds on the protonmotive force (i.e., PHOS). The coupling between these OX and PHOS components remains variable and under the modulation by internal (e.g., internal membrane protons' leaking, *i.e.* not returning in the mitochondrial matrix through the ATP synthase, [24]) and external factors (such as diet, [25]). Thus, measuring mitochondrial efficiency has proved to be of primary importance in enlightening us about the mechanisms underlying life-history trade-offs in multiple species [26,27]. However, the implication of mitochondrial bioenergetics in life-history trade-off and ageing cannot be apprehended solely through the change in mitochondrial efficiency (coupling) over age since (i) mitochondria respond not only to the ATP demand but also in relation to substrate availability (ADP) [28], (ii) the ratio ATP/ADP is likely to be a regulator of the rate of ATP hydrolysis [29], and as such of the amount of energy invested in somatic maintenance, (iii) mitochondria may affect cell ageing via particular maintenance processes like the fission-fusion mechanism [30]. The importance of such mitochondrial maintenance in ageing has been recently reinforced by the observation that mitophagy, *i.e.*, the removal of non-functional mitochondria and thereby the maintenance of an efficient aerobic metabolism (ATP produced at low ROS-related cost), is reduced throughout the ageing process in animals [2].

Social insects are a unique research animal model, notably because genetically similar individuals can express distinct phenotypes associated with different ageing rates [31]. In comparison to non-social species, they are notably characterized by immutable sterile castes (extreme altruistic behaviour), leading to a division of labour that in fact defines eusocial species [32]. In eusocial Hymenoptera (ants, bees and wasps), at least two distinct female castes coexist with specific functions: a single or a few queens, dedicated to reproduction, and workers, which can be either entirely (for the eusocial species) or partially sterile and carry out non-reproductive tasks. In this case, breeding individuals can have contrasting lifespans, since females are known to live longer than the non-breeding individuals (*i.e.*, workers), while



males live very short lives. For instance, ant queens can live by one or even two decades longer than workers, whereas males die soon after the mating flight [33]. In termites, kings and queens typically have longer lifespans than workers or soldiers (e.g., 20 years versus less than 1 year) [34,35]. Thus, the usual life history trade-off between fecundity and longevity does not seem to apply to social insects [13,32]. A fundamental challenge is to understand how a single genome can produce alternative phenotypes, and particularly alternative ageing phenotypes in monogyne species (i.e., all individuals originating from a single breeder). *Lasius niger* is a monogyne ant species, where the queen and the sterile workers coexist [33,36]. Within the latter, there is a division of labor based on temporal polyethism, with the specific behaviour of workers depending on their chronological age: older individuals are in charge of the riskiest task involving leaving the nest in search for food, while younger workers concentrate on brooding and caring for the queen. The lifespan of *Lasius niger* queens is about 10 times longer than that of workers [37,38]. Thus, despite the fact that individuals are genetically very close in a colony, the rate of biological ageing is extremely dissimilar, depending on individual's social and behavioural status.

Mechanistic data on ageing in social insects actually indicate caste specificities. In honeybees, functional decline of brain or motor functions reflects lifespan disparities between workers of different castes (with foragers presenting cues of reduced learning performances) but of the same chronological age [39,40]. Lipofuscin is a pigment that accumulates in multiple somatic cells with age and has been related to age-related diseases including brain disorders [41,42]. In social insects, lipofuscin accumulates at a lower rate in tissues of long-lived worker honeybees than in short-lived individuals of the same age [39]. Therefore, cognitive and more generally somatic ageing does not appear to be a strict function of chronological age in eusocial insects, and the social role of the animal into the hive seems to act as a modulator of biological ageing [40].

While data on ageing in eusocial insects reveals intriguing caste-specific patterns, investigating the ins and outs occurring specifically in long-lived queens remains a challenge. One potential factor contributing to their extended longevity is the shielding of queen physiology induced by reproduction *per se*. It has been observed that mating can actually increase the longevity of queen ants *Cardiocondyla obscurior*, regardless of whether the males have been sterilized or not [43]. Moreover, unlike reproductively active queens, non-reproductive queens of this species (identified in the study as not laying eggs at all) exhibit a



comparable or even lower life expectancy than workers when they are kept solitarily [44]. Interestingly, studies involving bees and ants have shown that when the queen is removed, and workers start reproducing, they tend to live longer than their counterparts which do not reproduce in colonies with a queen [45–47]. Furthermore, in queenless species such as *Diacamma sp.*, all females have a spermatheca and can theoretically mate at any time, but those that actually start being breeders (i.e., reproductive workers also called gamergate) also live longer than non-reproductive individuals even if they are indistinguishable from each other in terms of development and morphology. In laboratory, *Diacamma sp.* and *D. cyaneiventre* show a similar trend with average adult lifespan being three times longer for gamergates [48,49]. Here, neither mating nor insemination appears to extend gamergate life span, as non-mated workers that become reproductive also live longer. One hypothetical explanation for this paradoxical longer life expectancy of breeders is that workers assume a higher workload, a general pattern in social insects [49]. Negroni *et al* have investigated the transcriptomic regulation of lifespan extension in ant fertile workers of *Temnothorax rugatulus* [47]. They found that the most differentially expressed gene, encoding an isoform of catalase, was downregulated in reproductive individuals. Long-lived reproducers might therefore be exposed to lower levels of oxidative stress [47]. This situation is mirrored in the sub-family of ponerine and or in honeybees, where antioxidant enzymatic activity is lower in gamergates or queens than in workers [50]. On the other hand, there is an increase in catalase transcript abundance and activity in termite queens [51], and the same observation is made for Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) activity [52]. It is noteworthy that catalase is also upregulated in fat bodies of old *versus* young queens of *Temnothorax rugatulus*, suggesting a late-life up-regulation of anti-oxidant shielding that may regulate ageing rate [53]. Thus, it seems that taxon-specific (ants *vs.* termites) patterns of antioxidant mechanisms may have differently evolved in the regulation of caste-specific longevity among social insect species [54].

The mitochondrial function among ant castes of contrasted longevities has been poorly studied to date. Since all females in a given colony inherit their mitochondria from the founding queen, we sought to explore how mitochondria from a unique maternal line are actually associated with different longevities. In the present study, we assessed individual metabolic rate (oxygen consumption), mitochondrial density and functioning (efficiency in ATP production, energy charge), as well as different proxies of oxidative status in queens and



workers of *Lasius niger*. In line with the predictions of the oxidative stress theory of ageing, we hypothesized that mitochondrial characteristics should differ among castes, with long-lived queens likely to exhibit a bioenergetic profile associated to long lifespan, *i.e.* low ROS production, high antioxidant capacity and therefore less cellular damage for a given level of oxygen consumption and/or ATP production.

## Material and methods

### Ants' segregation/ caste identification

The majority of the colonies used in this study were derived from wild, newly-mated *Lasius niger* queens (Linnaeus, 1758), which were captured at the "Campus Plaine" site of the Université Libre de Bruxelles (50°49'08.4"N 4°23'57.0"E). These queens were reared in the laboratory for four years, initially at IPHC-DEPE in Strasbourg, France, for the first three years, and then relocated to Paris for measurements in the final year. The youngest colonies were ordered online through the website antstore.net and were from the current year.

Colonies were maintained at room temperature (25°C) with a relative humidity of 50-60% during the season, and were placed in diapause from December to February at 10°C (gradual decrease in temperatures). A test tube served as the nest, with water at the bottom of the tube separated by a cotton barrier to maintain humidity. Each tube was placed inside a plastic container measuring 20 to 30 cm on each side, with one nest per container due to inter-colony aggression (Fluon applied along the edges to prevent ants from escaping). The colony sizes varied, ranging from about twenty to sixty workers for a queen (monogyny species), depending on their age. The ants were provided with a diet of 0.3M sugar water and defrosted mealworms once a week.

In *L. niger*, there is an age-related division of labour [55], the youngest workers taking care of larvae (in-nest task, called nest-workers thereafter), while the oldest ones are devoted to out-nest tasks (as foraging [31], called foragers thereafter). Since there is no dimorphism between them, we separated workers according to their behaviour, as described in [56]. Briefly, the foraging behaviour was stimulated by a 4-day fast, at the end of which a high concentrated sugar solution (0.3 M) was supplied in a plastic tray. Individuals repeatedly found active in the foraging area were identified as foragers, whereas the ones repeatedly found cloistered inside the nest were identified as nest-workers. The tube used as anthill was



therefore clogged with cotton for trapping foragers outside and taking the time to mark their abdomen with an acrylic ink (Posca®). Ants were anesthetized by cold if necessary (0.5-1 min, on ice). We then collected the nest-workers and marked them with another colour. We particularly spotted those showing tendency to form immobile clusters as it has been described in *Caponotus fellah* [57]. All ants were put back into their colony where usual food and water were provided for 2 days. The fasting process was repeated 3 times, with alternating colours to avoid marking nest-workers which were too curious due to food deprivation. The ants finished being segregated a week before the start of the experiments (48 hours fasting).

Measurements were made between November and December. Since tagging was repeated, we assumed for our study that there was not any switch in ants' behaviour, and that foragers were the oldest workers, without knowing their exact age. Actually, we rarely observed starved nest-workers going out in search of food, and we almost exclusively marked the same ants. As we did not either remove the eggs progressively we can assume more heterogeneity among nest-workers. Workers were pooled *per* 5-7 individuals (some of them escaped during first step protocol just before oxygen consumption measurements). The sample sizes used in each experiment are summarized in Figure 1.

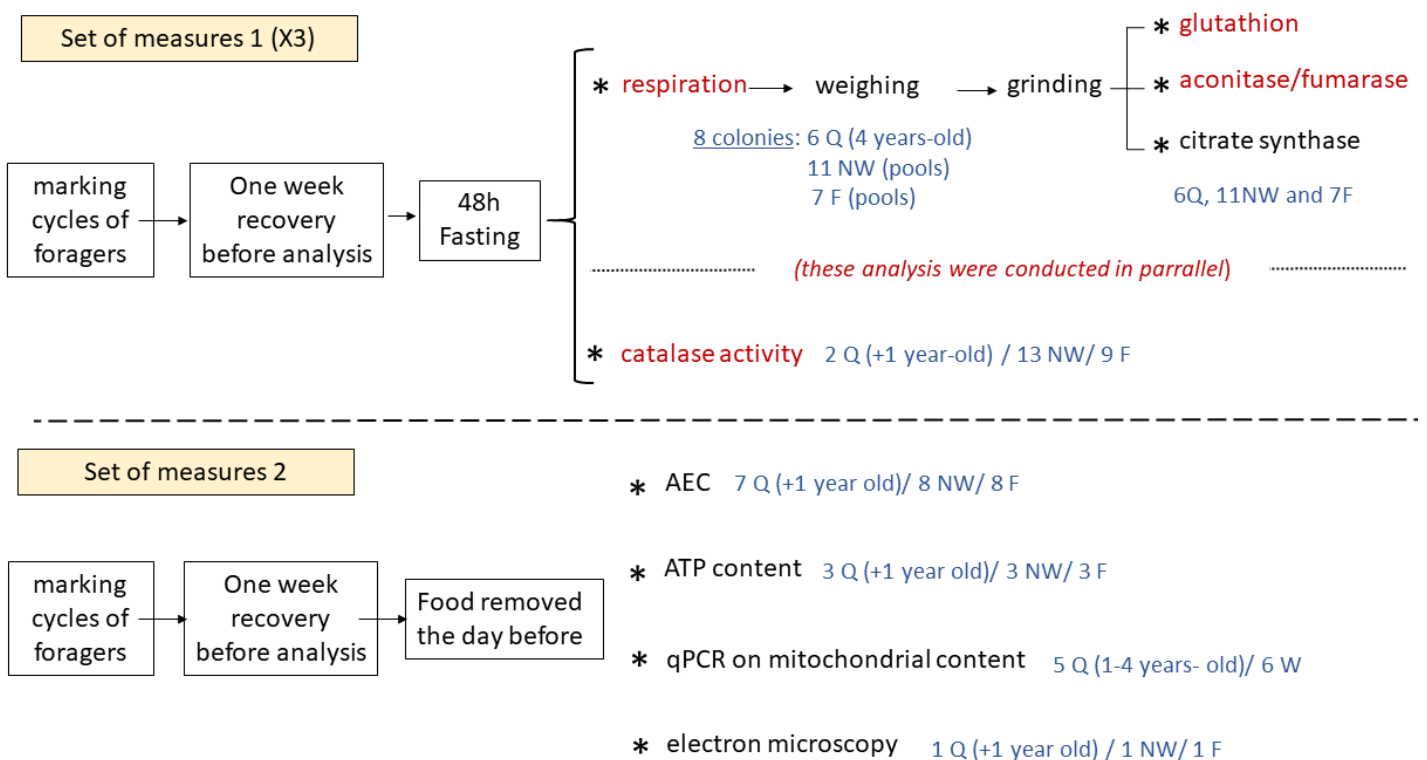
#### Oxygen consumption (indirect calorimetry)

We measured O<sub>2</sub> consumption from foragers, nest-workers and queens using an Oxygraph O2k (Oroboros Instrument GmbH, Innsbruck, Austria) and DatLab software. The system is normally used with stirred liquid suspensions such as isolated mitochondria. To proceed with a gaseous atmosphere, we followed the protocol detailed in [58]. The 6 queens (4 years-old) and the 18 worker pools for which the metabolic rate has been measured were done over 2 sessions.



## Body mass and metabolic rate calculation

All pools were weighed directly after oxygen measurements (Mettler Toledo AG285,  $\pm 0,01\text{mg}$  accuracy). To improve comparison between measurements made at different days, two calibration weights of 100 mg and 10 mg were prepared with platin wire and used as references. Mean body mass values in mg were (mean  $\pm$  SD): queens  $28.19 \pm 5,419$ , foragers pools  $4.271 \pm 0.5287$ , nest-workers pools  $5.147 \pm 1.055$ . We calculated the metabolic rate by dividing oxygen consumption rate by pool mass. After having their body mass measured, the ants were placed in a 15 mL falcon tube with cotton impregnated with water before being ground for subsequent measurements of enzymatic (aconitase, fumarase and citrate synthase) and glutathione content.



**Figure 1** : Schematic diagram of the experimental design, assays (asterisks) and corresponding sample sizes (in blue). Assays that were conducted in parallel the same day are in red. Q: queen caste, W: worker caste, NW: nest-worker, F: forager.





### Preparation for enzymatic measurements

The very next day of metabolic rate measurement sessions, ants were mashed into 300  $\mu\text{L}$  phosphate buffer (0.1M, 5mM EDTA, triton 0.1%, pH 7.3). Homogenates were immediately placed in dry ice and defrosted at room temperature, and centrifuged at 8,000 g at 4°C for 10 min. Resulting supernatants were used for enzymatic measurements. Aconitase/fumarase activities were assayed within 2 hours, other tubes were aliquoted and kept at -80°C for the measurement of the citrate synthase activity.

Homogenates from *Locusta migratoria* flight muscles and *Mus musculus* liver were previously frozen at -80°C were used as an inter-plate controls. Normalization of enzymatic activities was done using samples' protein content determined by BCA assay (Pierce Company).

### Glutathione content

Total glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) content was determined by the glutathione reductase enzymatic method [59]. However, 5-sulfosalicylic acid, whose role is to prevent spontaneous GSH oxidation, was not used in the buffer, because of its absorption at 240nm that compromised other enzymatic measurements. In preliminary tests, we checked and did not see any difference in GSSG/GSH ratio with or without the presence of 5-sulfosalicylic acid following our protocol. In all cases, GSSG amounts were in the lower limit of detection. Hence, we used half area plates to concentrate samples (Greiner Bio-One 675101) and small volumes of reagents. Fresh homogenate aliquots used for GSSG received a pre-incubation with 2-vinyl-pyridine (2 $\mu\text{L}$  for final volume of 100 $\mu\text{L}$ ) for 1h at room temperature and a treatment with triethanolamine (6 $\mu\text{L}$ ) for at least 10 min before measurements. Glutathione standards were prepared from a 3.28 mM GSSG stock solution for final concentrations from 0.048 to 3.78  $\mu\text{M}$ . A working solution of 5 U/mL of glutathione reductase and 2.6 mM of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) was prepared in assay buffer. All samples were deposited in duplicates. Reaction was initiated by mixing 20  $\mu\text{L}$  of the latter working solution with 35  $\mu\text{L}$  of homogenate/ standard for total glutathione, or 50  $\mu\text{L}$  for GSSG. We used 1:12 and 1:3 sample dilution for queens and workers respectively, no dilution for GSSG. Finally, 10  $\mu\text{L}$  of 1.2 mM NADPH solution were added and the increase in absorbance was recorded at 405 nm wavelength in 96 well plates, with a TECAN spectrophotometer (model Infinite M200). Final reaction volume was of 80 $\mu\text{L}$  *per well* for GSSG and 65 $\mu\text{L}$  *per well*



for GSH. Glutathione concentrations were normalized again using sample protein content (see above).

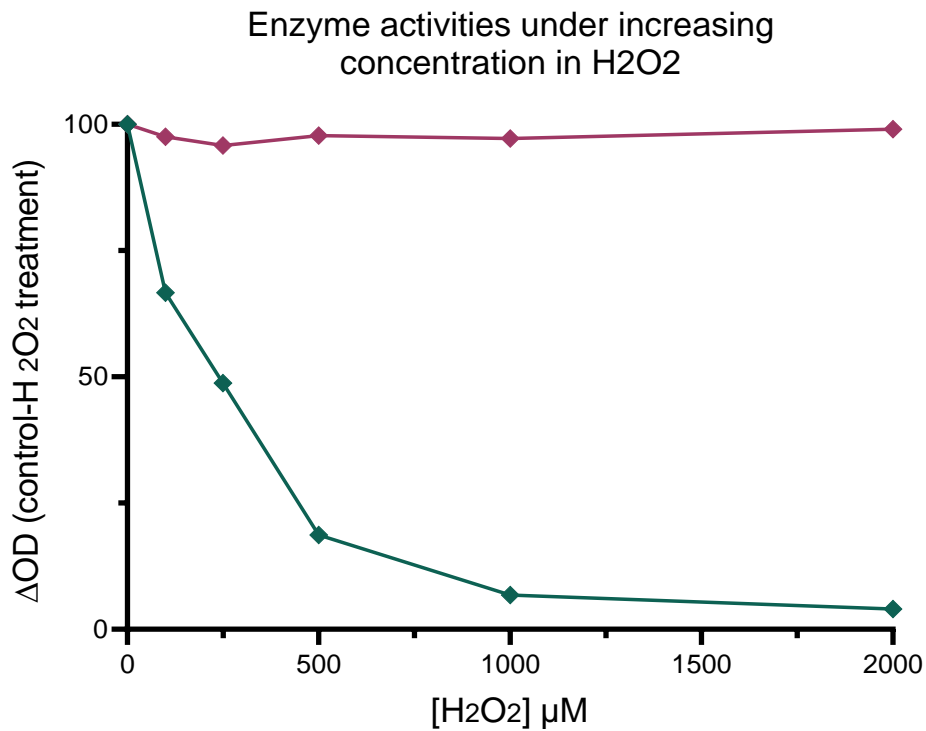
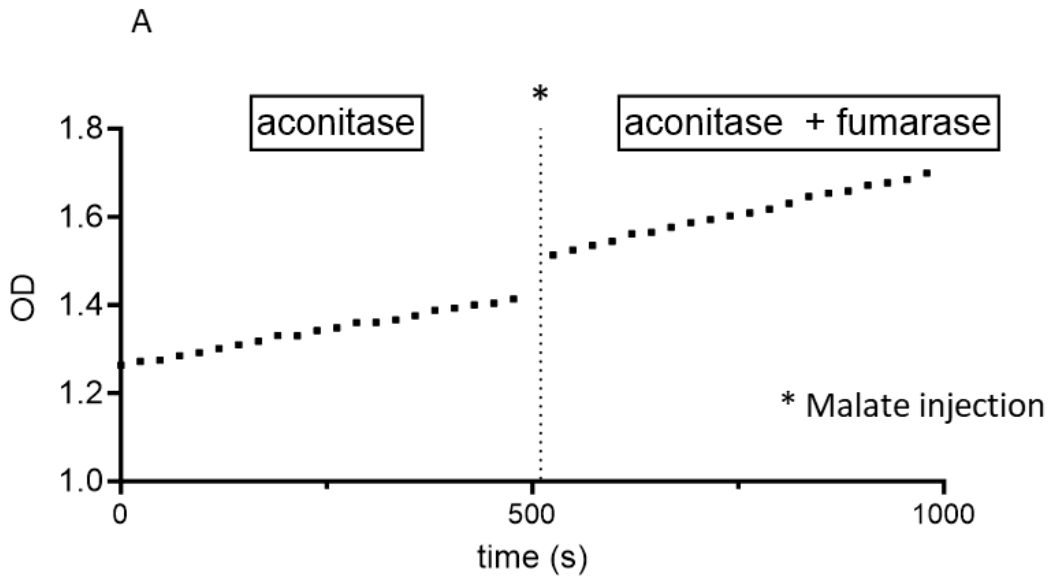
### Aconitase/fumarase activity ratio

The aconitase and fumarase activities were measured in 96 well plates allowing measurement at 240 nm wavelength (Greiner UV-Star® half area 675801) with the TECAN spectrophotometer. The test is measuring the rate of activity (slopes) of those enzymes in presence of increasing substrate concentrations. Firstly 50  $\mu\text{L}$  of Phosphate buffer (100 mM phosphate buffer, EDTA 5mM) were introduced in each well, followed by 20  $\mu\text{L}$  of the homogenate / 20 $\mu\text{L}$  buffer for negative control (1:4 dilution for Queens because optical density (OD) was too high *per se*). Samples were run in duplicate. The reading protocol for measurement of 240 nm wavelength was as follows: (1) Shaking (15 s, 2mm linear); (2) readings every 20s on 2min to evaluate the background and stability; (3) aconitase reaction with addition of isocitrate solution 120 mM (25  $\mu\text{L}$ ) with the aid of a multichannel pipette, shaking as before, 8 minutes of readings each 20s with 3s shaking (slope a); (4) fumarase reaction with addition of malate 250 mM (25 $\mu\text{L}$ ), rest of the procedure as before (slope b). Aconitase to fumarase ratio was calculated with the assumption that increase in OD summed the rates of aconitase and fumarase reactions (see supplementary Figure S1A). Hence, slope for fumarase was calculated as slope (a) –  $\alpha$  slope (b), with  $\alpha$  taking into account the dilution induced by next reagents ( $\alpha = 19/24$  for these volumes). Activities were calculated with  $\epsilon_{ac} = 3.410$  and  $\epsilon_{fum} = 2.440 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  for aconitase and fumarase respectively before expressing the ratio [60,61]. The activity was calculated as follow:

$$\text{Activity} : V_{\text{sample}}/V_{\text{reaction}} * 60 * (\text{slope}/(\epsilon * L))$$

with L the optical path length (cm) depending on the reaction volume of the half area plates (0.588 and 0.730 cm). Aconitase and fumarase activities were normalized by protein content (BCA assay), and we verified aconitase sensitivity to  $\text{H}_2\text{O}_2$  in our animal model (Figure S1B).





**Figure S1:** Procedure for measuring in a well. The first kinetic is initiated by adding isocitrate ( $t_0$ ), and the second by adding malate (A). Aconitase and fumarase activities in the same homogenate after increasing addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in order to verify aconitase sensitivity to oxidative stress in the model. Aconitase activity is in green, fumarase activity in purple (B).



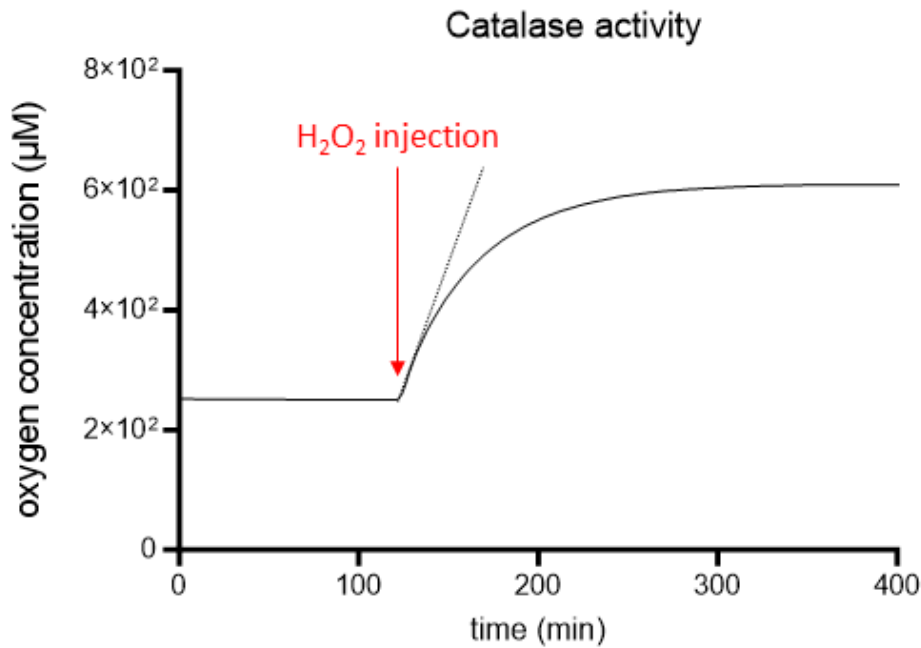
### Citrate synthase activity

Citrate synthase is a Krebs cycle enzyme (in the mitochondrial matrix) and its activity is generally used as a proxy for mitochondrial density/activity. Citrate synthase activity (CS) was carried out at room temperature (25°C) using the TECAN spectrophotometer by measuring the appearance of the CoA-SH [acetyl-CoA + oxaloacetate  $\leftrightarrow$  citrate + CoA-SH + H<sup>+</sup> (side reaction: CoA-SH + DTNB  $\rightarrow$  yellow TNB)]. For the CS assay, and as suggested by Eyer and collaborators [62], the molar extinction coefficient used in a phosphate buffer 0,1M at 25°C was  $\epsilon=14\ 150\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$  for DTNB at 412 nm wavelength. The reaction mix consisted of 135 $\mu\text{L}$  of phosphate buffer, EDTA 5mM, DTNB 0.11mM, and 0.33 mM acetyl CoA to which 5 $\mu\text{L}$  of sample homogenate were added. Reaction started with addition of 10 $\mu\text{L}$  of 10mM oxaloacetate *per* well (150 final volume). Kinetics were conducted during 5 minutes with 15 seconds interval measurements. Samples were deposited in duplicate into half area plates, and results normalized by sample protein content.

### Catalase activity

The catalase measurements were taken from pools of ants segregated in parallel with the previous experiments, but the colonies used here were young-of-the-year (so were the queens). The enzyme activity was obtained with the Oroboros reading, based on the following reaction:  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2}\ \text{O}_2$ . Calibration was done in water, chambers opened for 100% oxygen reference, closed with dithionite addition for 0% oxygen reference. A single segregated ant was mashed into 530  $\mu\text{L}$  phosphate buffer (0.1M triton 0.1%, 5mM EDTA, pH 8) and placed into 0.5 mL chamber volume. We used a data recording interval of 2 seconds with background correction, stirrer 750 rpm at 25°C (Figure S2). Slope was calculated on 10 points after injection. We injected 2 $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  into the chambers (final concentration 500 $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration checked at OD 240 nm). At the end of acquisition, each mashed sample was collected for normalization by protein content (BCA assay). We also injected  $\text{H}_2\text{O}_2$  into chambers containing phosphate buffer to verify that oxygen production was only due to biological content.





**Figure S2:** Catalase activity was measured with a Clark electrode by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to O<sub>2</sub> conversion

### Mitochondrial density by qPCR and electron microscopy

Mitochondrial density was first measured using qPCR amplification method. DNA extraction was done with TRIzol™ following the procedural guidelines, with volumes 1:2, that means ants were crushed into 500µL of TRIzol™ on ice (3-4 mg fresh material for worker pools). The homogenization step was followed by a first centrifugation at 8000g, 3min and 4°C after 5 min incubation, to remove cuticular debris. Samples were resuspended in 40 µL of DEPC-treated water at the end of DNA purification. The single-copy gene long wavelength rhodopsin previously (LW-Rh) defined by Quque [63] was used as reference. The primers' sequences were: LW-Rh-Forward 5' - GGA CCC TTG TTC TGT GAA CTG TA - 3' , LW-Rh-Reverse 5' - ATT ACG TTG TAC CTG TCG AAT GC - 3' for reference, Ln-COI-F 5' – ACC TGA TAT AGC ATA CCC CCG T -3', Ln-COI-R 5' – AAC AGT TCA TCC TGT TCC TAC TCC -3' for mitochondrial COI gene and Ln-16S-F1 5' – CCG CAG TAT TTT GAC TGT GC -3' Ln-16S-R2 5' – TCC TTC ATT CCA GTT CTT AAT -3' for mitochondrial 16S gene.

Mitochondrial density was also assessed using electron microscopy. One ant of each group was used (one queen and one ant for each workers' subcastes). They were individually



anesthetized on ice, and immediately dissected into fixative under binocular magnifier (mitochondria are first elements altered by ambient air), after needles were placed under the head and into clypeus (from the top before progharyngeal gland) to facilitate an opening of the head. Brain was recovered, followed by muscles from thorax. Since workers are smaller than queens, we used different workers for different parts of the body. The fixative was composed of glutaraldehyde diluted to 2.5% in phosphate-buffered formaldehyde solution (ROTI®Histofix 4 %), pH adjusted to 7.2 with a few drops of KOH. Tissues were washed in phosphate buffer, post-fixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in graded ethanol, and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections (50–90 nm) were cut on an ultramicrotome (8800 Ultratome III; LKB Bromma) and collected on 300-mesh nickel grids. Staining was performed on drops of 4% aqueous uranyl acetate, followed by Reynolds lead citrate. Ultrastructural analyses were performed with a JEOL JEM-1011 electron microscope and digitalized with the DigitalMicrograph software. Mitochondrial parameters such as densities, size, volume and shape (circularity index which indicate fission/fusion propensity) were measured on Fiji software following Lam protocol [64]. The higher the circularity index, the less frequent mitochondrial fission/fusion events [64]. Multiple image captures were taken under the microscope from a single preparation, enabling us to perform statistical analysis on the results (5 sections for the queen's brain, 4 for the forager and nest-worker). Unfortunately, the brain sections from the nest-worker did not originate from the same region, so we set them aside. Counting of lipofuscine aggregates were also conducted on these image captures (see supplementary).

#### Adenylate and guanylate energy charge and ATP content

The Adenylate Energy Charge (AEC), proposed by Atkinson in 1967 [65], is used as a practical index of the physiological status and health of the cells. It is given by the following formula:  $AEC = ([ATP] + 0.5[ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$ . The normal AEC for viable organisms (eukaryotes as prokaryotes) is comprised between 0.8 and 0.9 [66,67], i.e. ATP producing reactions are in balance with the ATP consuming reactions. When AEC drops of between 0.7-0.5, organisms are still in a viable state, but homeostasis is not maintained [68]. Very unfavourable conditions are when  $AEC < 0.5$ , a status lethal for most cells [69]. Guanylate



Energy Charge (GEC), an analogous to AEC but for guanine nucleotide, is also an indicator for metabolism, that reflects the cell ability to synthesize proteins [70].

Ants have been segregated more than a week before measurements (since any stress can decrease AEC value). They were caught gingerly and directly ground with Dounce homogenizer in an ethanol/Hepes 20 mM (7/3; v/v) solution -precooled at -20°C of. Glassware and solutions were kept on dry-ice. Samples were stored at -80°C a few days before being sent to SAM facility (TBMCore Bordeaux). Ethanol/Hepes extracts were evaporated using a rotavapor (3min, 65°C) and the dried residue was resuspended in 500µl of nuclease/phosphatase-free water. Insoluble particles were removed by centrifugation (21,000 g, 4°C, 1 hour) and the supernatant was ultra-filtrated on nanosep10K Omega (Pall). Metabolites were then separated on an Integriion chromatography station (Thermo Electron) at 0.38 ml/min and 30°C using an AS11-HC-4µm column (250 × 2 mm, Thermo Electron) and the potassium hydroxide discontinuous gradient as described in [71]. Peak area quantification was done by UV absorbance at 260nm for all nucleotides/nucleoside. Metabolite contents were determined using standard curves obtained with pure compounds. ATP content was also measured on 3 other whole ants per group, with ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II by Roche, Mannheim Germany. Since the pH optimum is between 7.6 and 8, we increased tricine concentration as suggested in the protocol (from 0.04 to 0.1M here) to avoid our samples acidification due to formic acid. The pH never dropped off even before dilution preceding luminescence measurement. Here, homogenizations were performed individually into 50 µL buffer for workers, into 200µL for queens, with micropilons. To remove tissues debris, the homogenized samples were centrifuges at 4°C. They were then diluted by 1:200 before reading plate, to stay in the standard range. Results were normalized using sample protein content with Bradford method (BioRad).



### Principal Component Analysis of proteomic mitochondrial content.

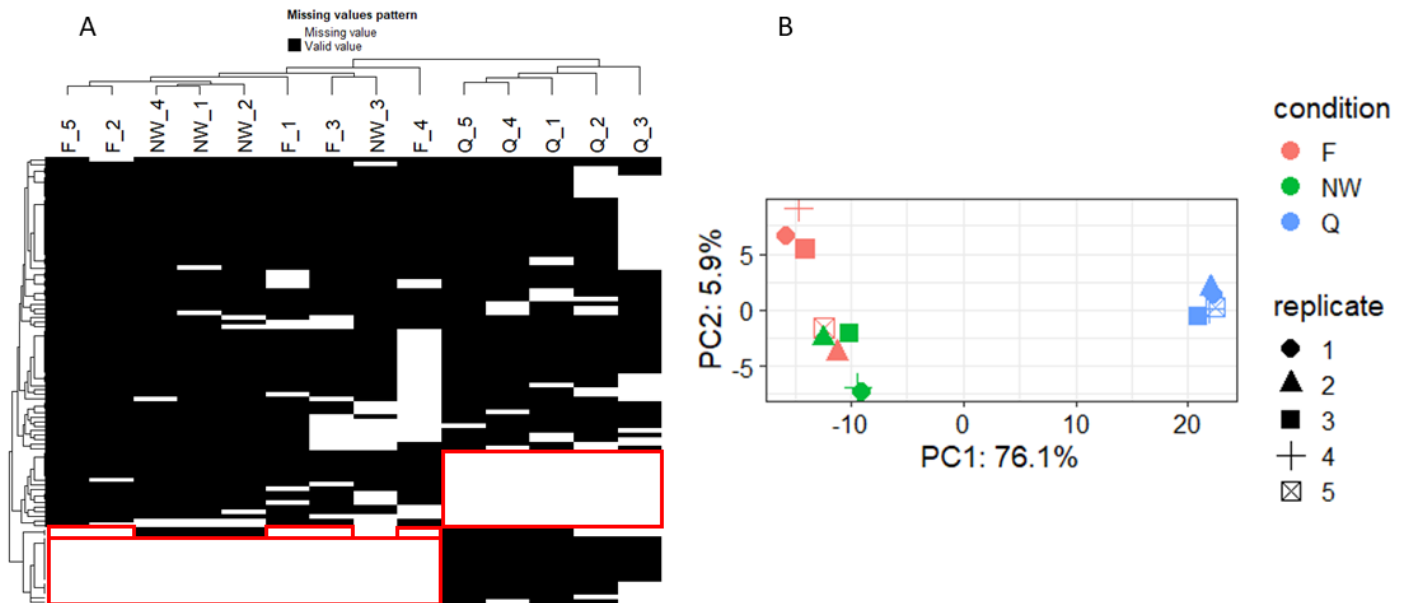
We conducted an *in silico* reanalysis of proteomic data previously acquired by our group on ant colonies of the same origin [56]. On the 1,380 proteins previously quantified, 240 proteins were identified as playing a role in the mitochondrial function. Data analysis with DEP v1.22.0 package was conducted focusing on those mitochondrial proteins' expression among queens, nest-workers and foragers on the basis of fold changes (calculated based on Limma V3.56.2) as developed in [72]. To properly run the analysis, missing values that concerned all individuals in a same group, or even a given caste (see supplementary Figure S3A), were assumed as missing not at random (MNAR) and were attributed the minimal quantitative value in the dataset; other missing data were assumed as missing at random (MAR) and inferred with the *k*NN (k nearest neighbours) algorithm (DEP uses VIM package v6.2.), which imputes missing values based on proteins with similar expression profiles [73]. A PCA was executed on the mitochondrial dataset to visualise the contributions of castes and proteins to the orthogonal independent axes (Figure S3B). Fold changes were illustrated using volcano plots (Figure S4), and statistically significant results are given in Table S1.

### Statistics

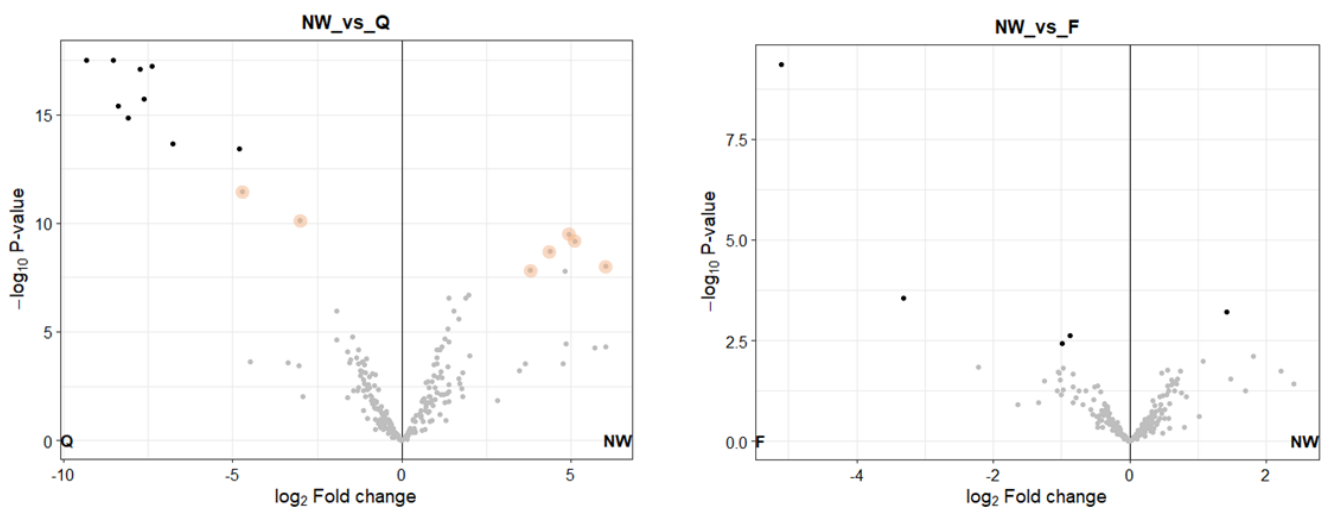
Statistics analysis were conducted using RStudio v4.0.2 (<http://www.R-project.org/>) and prism v9.4.0. Normality of model residuals was verified by Shapiro-Wilk test, homoscedasticity by Bartlett's test. For each random variable, social group (queen, nest-worker or forager) was used as fixed factor. One way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test were conducted when normality and homoscedasticity were verified (O<sub>2</sub> consumption, O<sub>2</sub> consumption reported to the mass, AEC, ATP/ADP, ATP content, GEC and aconitase activity). In case of unequal variances, Welch ANOVA test was employed with Dunnett's T3 to compare all pairs of variables (mass, citrate synthase activity, ATP/AMP ratio, fumarase activity, aconitase/fumarase ratio and catalase activity). In conditions where normality has not been verified, comparison on ranks was done with Kruskal-Wallis test (inosine, inosine reported to the mass and glutathione levels). Similarly, paired comparisons were done when workers were merged or a subcaste absent, with Welch's t test in case of lack of homoscedasticity (for mitochondrial volume and density), otherwise Mann-Whitney tests were used for non-parametric data (qPCR analysis and circular index). Specific post-hoc test P-values are indicated on the figures.







**Figure S3:** Heatmap of proteins (black) with missing values (white). Missing values not at random are framed in red (A). PCA analysis on previous published data by Quque *et al* [56] retaining only mitochondrial proteins: individuals plot (B). Q: queen, NW: nest-worker, F: forager



**Figure S4:** (A) Volcano plots obtained with queen caste as control. Significant protein fold changes compared to the nest-worker group are in bold. Proteins highlighted in orange were significantly over- or under-expressed in the forager group. (B) Volcano plot between the worker groups with foragers as control.

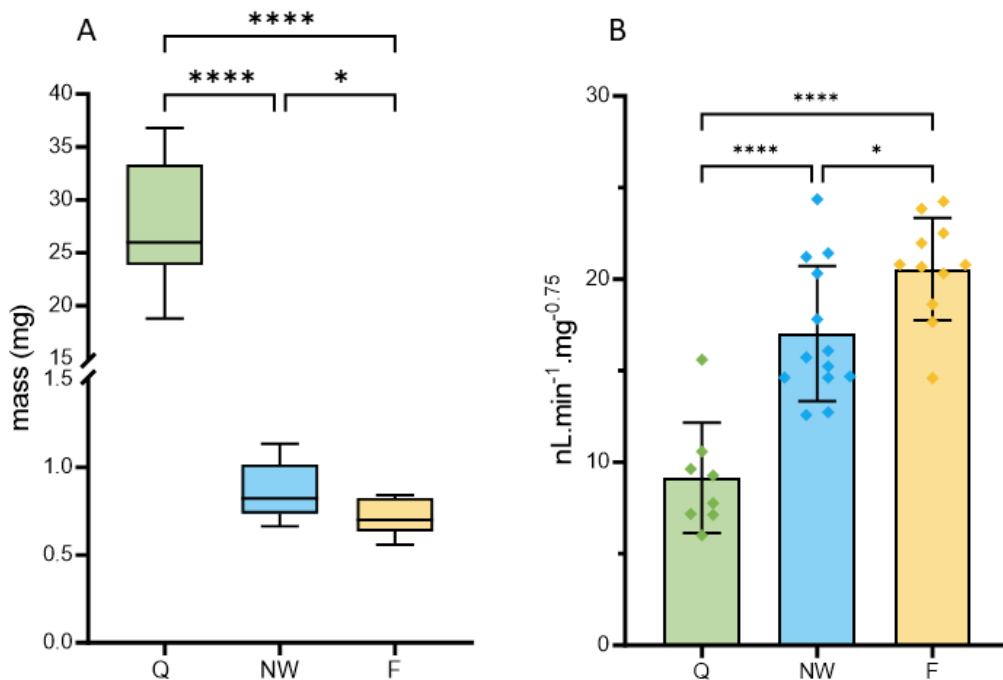


## Results

### Queens have the lowest metabolic rate, old nest-workers the highest

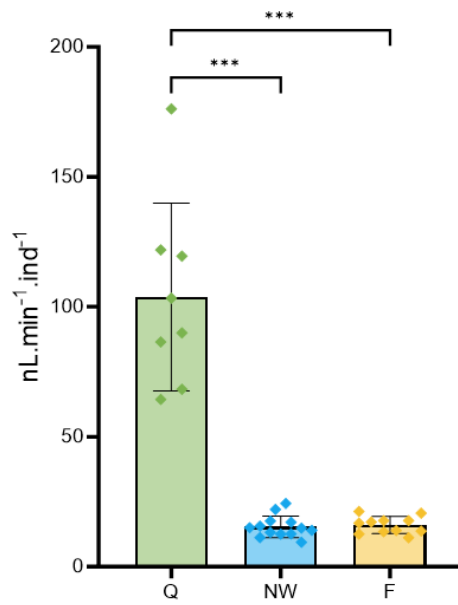
Body mass between the three social castes were significantly different ( $F_{(2, 20.30)} = 165.4$ ,  $P < 0.0001$ ). Queens were 32 times heavier than nest-workers, and 39 times heavier than foragers (Figure 2A;  $P < 0.0001$ ). The weight of nest workers was also significantly 22% higher than that of foragers ( $P < 0.05$ ).

Oxygen consumption was normalized by ant mass (Figure 2B), with an allometric scaling exponent of 0.75. Long-lived queens had half the metabolic rate of workers ( $F_{(2, 29)} = 29.24$ ,  $P < 0.001$ ) and a higher metabolic rate was found in foragers compared to nest-workers (adjusted  $P = 0.0339$ ). Absolute oxygen consumption between the workers is shown in supplementary Figure S5 (no significant differences, adjusted  $P = 0.9584$ ).



**Figure 2:** (A) Ant mass for single queen or worker pool and (B) metabolic rate. Values are mean  $\pm$  SD. Q: queen, NW: nest-worker, F: forager. \*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $P^* < 0.05$



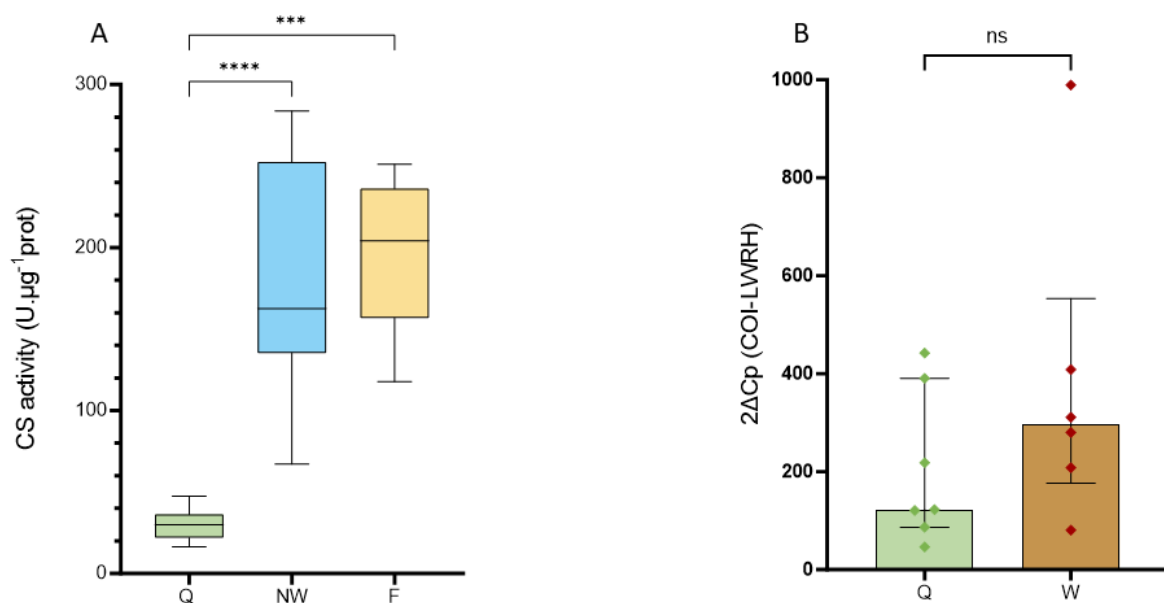


**Figure S5:** Oxygen consumption per individual. Q: queen, NW: nest-worker, F: forager. Values are mean  $\pm$  SD. P\*\*\*<0.0005, P\*\*<0.005, P\*<0.05



### Markers for mitochondrial abundance and ATP production

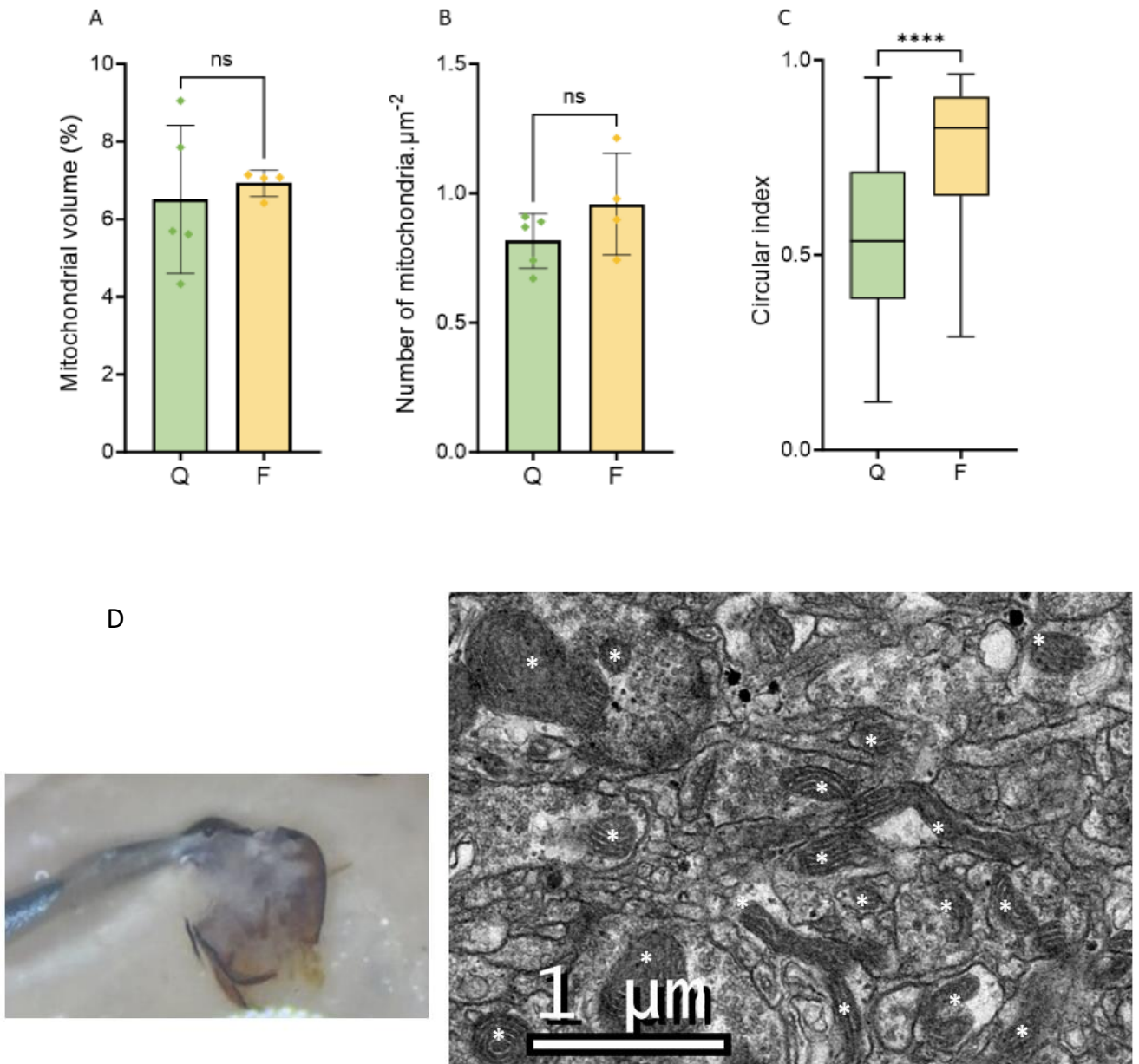
Citrate synthase enzymatic activity (Figure 3A) was more than 6 times higher in workers than in queens ( $F_{(2, 10.49)} = 62.08$ , P-value  $< 0.0001$ ), with no difference between the two groups of workers ( $P = 0.9637$ ). For mitochondrial density estimated by qPCR, a median value of 122.5 was obtained for queens versus 295.5 (twice higher) for workers (Figure 3B). However, queens could not be significantly discriminated from workers (foragers and nest-workers not analysed separately, Mann–Whitney  $U = 14$ ,  $P = 0.3660$  two-tailed).



**Figure 3:** Mitochondrial densities measured by citrate synthase activity (A) relative mtDNA copy number of COI by qPCR (B), on whole body. Values are mean  $\pm$  SD in A, median (IQR) in B. Q: queen, NW: nest-worker, F: forager. \*\*\*\* $P < 0.0001$ , P\*\*\* $< 0.001$ .

Lastly, different mitochondrial parameters such as density and volume in the brain of queens and foragers were assessed using electron microscopy (Figure 4). Unpaired t-tests with Welch's correction showed no difference in mitochondrial volume (which occupy between 6.5 and 7% of the cell volume), nor in mitochondrial density ( $t = 0.4806$ ,  $df = 4.317$  and  $t = 1.305$ ,  $df = 4.364$ , respectively). Interestingly, the assessment of organelle shape after outlining highlighted a significant difference in the circularity index (index median of 0.5355 and 0.8260, in foragers and queens, respectively, Figure 4C,  $P < 0.001$ ), thereby indicating that fission/fusion was more common in queens than in foragers.





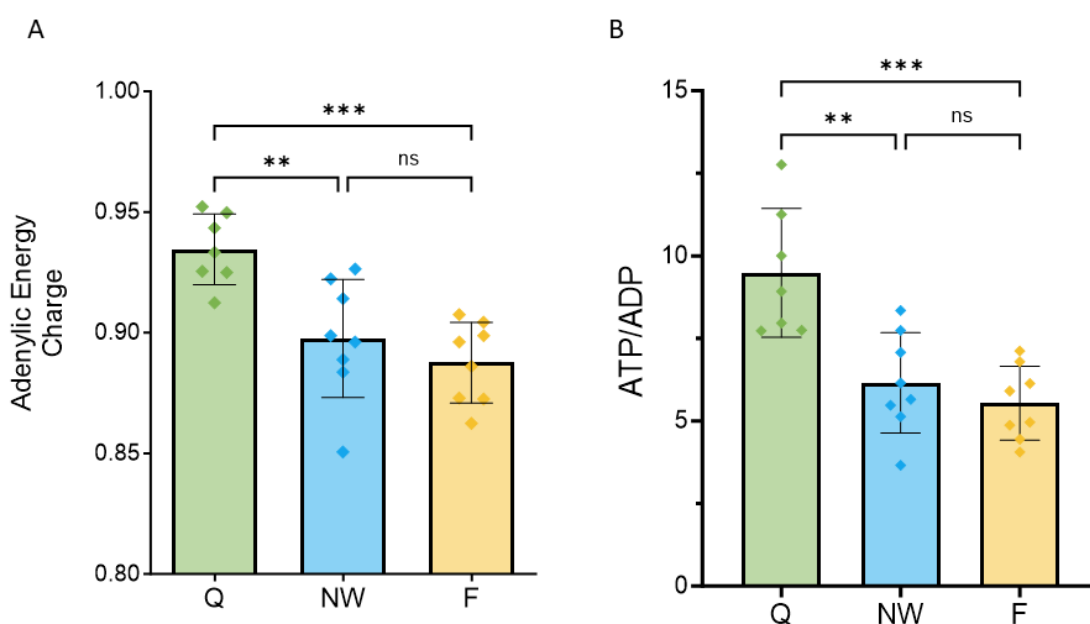
**Figure 4:** Mitochondrial volume measured by electron microscopy in the brain tissues (A), numbers of mitochondria per section were reported in (B), and finally circular index in a boxplot for a relative comparison of fission/fusion events (C). Values are mean  $\pm$  SD for A and B, the boxplot C represents the median, quartiles and the range of values. Q: queen, F: forager. \*\*\*\*P < 0.0001. For analyses, ants were dissected in fixative solution to avoid at maximum mitochondrial oxidation (D). Here the forager brain dissection, whose mitochondria are indicated with the white asterisks (E).

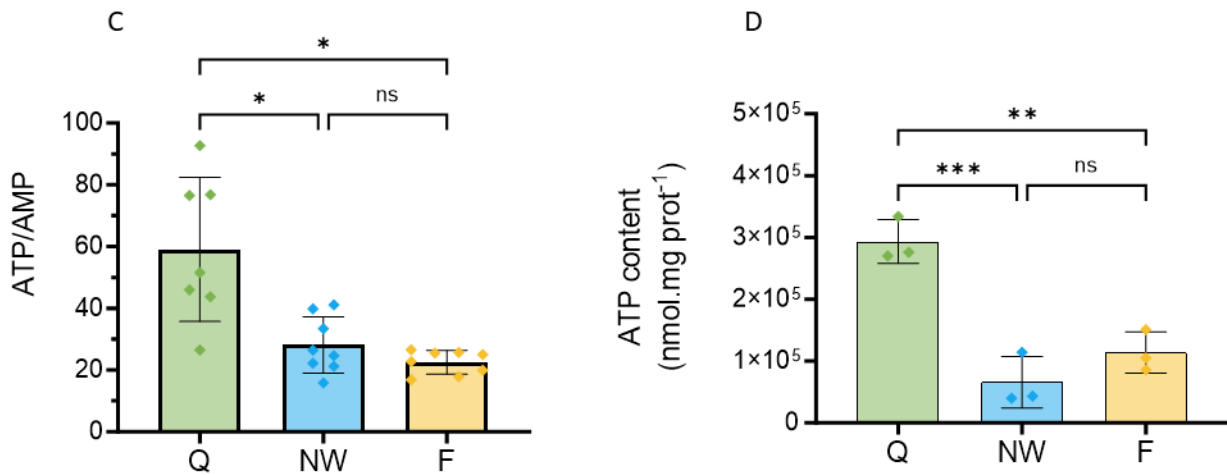


As a complement to mitochondrial density proxies, the PCA analysis on proteomic data on mitochondrial proteins from Quque *et al* [56] was performed (Figure S3). The first two axes explained 86.9% of the variance with the first axis differentiating queens (positive PCA1 values) from workers (negative PCA1 values), while PCA2 less clearly differentiated workers among them. Based on proteins loading on PCA axes, the abundance of only 22 proteins was significantly different among groups for a  $P < 0.05$  (supplementary Table S1): 17 were differentially expressed between queens and both workers castes, 9 between queens and nest-workers, and finally 5 between worker castes (see Table S1 and discussion for details).

The AEC index (Figure 5A) was significantly higher in the queen caste compared to workers: queens mean value was of 0.934, while it was of 0.898 for nest-workers and of 0.888 for foragers ( $F_{(2, 20)} = 13.80$ ,  $P < 0,005$ ). All AEC values recorded here were  $> 0.8$ , indicating that none of the individuals were in a marked energy stress status. Consistent with the AEC from which it is derived, ATP/ADP ratio (Figure 5B) was 55-70% higher in the queen caste compared to both worker castes (ratio of 9.48,  $F_{(2, 20)} = 12.02$ ,  $P < 0.005$ ). Likewise, ATP/AMP Figure 5C ( $F_{(2, 9.95)} = 8.712$ , with  $P < 0.005$ ).

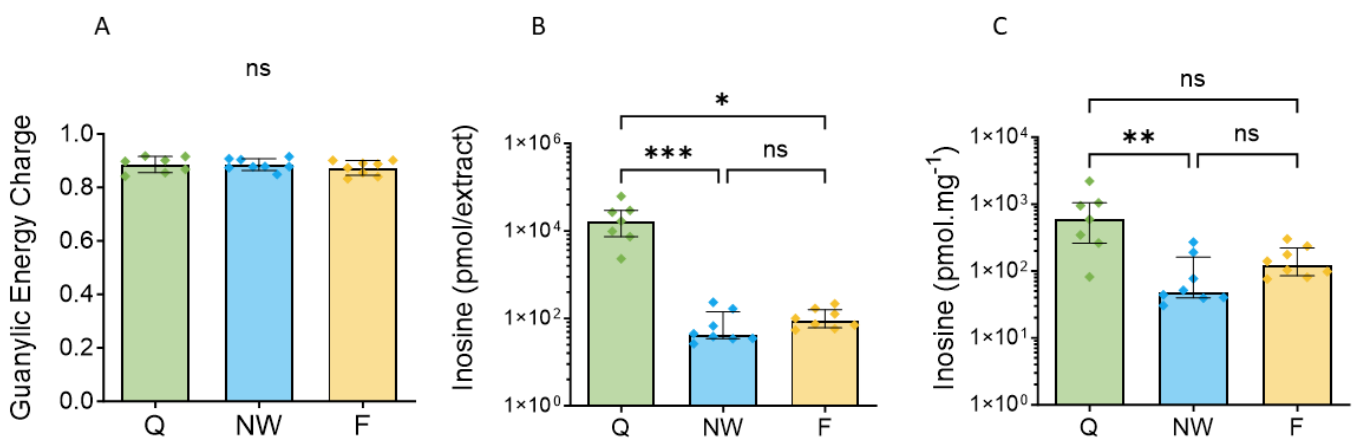
Finally, mitochondrial ATP content was 2.6 to 4.5 times higher in queens than in workers ( $F_{(2, 6)} = 31.32$ ,  $P < 0,001$ , Figure 5D). The value was 73% higher in foragers than in nest workers, but without reaching statistical difference (adjusted  $P = 0.3210$ ).





**Figure 5:** (A) Adenylate Energy Charge (B) ATP/ADP ratio and (C) ATP/AMP ratio, (D) ATP content measured on other individuals via bioluminescence. Values are mean  $\pm$  SD for A and B, median (IQR) in C. Q: queen, NW: nest-worker, F: forager. P\*\*\*<0.0005, P\*\*<0.005, P\*<0.05

There were no significant differences in Guanylic acid Energy Charge (GEC) between castes ( $F_{(2, 20)} = 0.5760$ , Figure 6A). Nonetheless, we observed consistent peaks of IMP (GMP precursor) in the queen caste (Figure 6B). As individuals were not weighed during the experiments to avoid any stress, IMP was expressed in relation to the mean mass obtained from the entire population (Figure 6C). The level of queen IMP was significantly higher in queens than in nest-workers (by a factor of 10, Kruskal-Wallis test  $H = 11.62$ , adjusted P-value < 0.005). IMP level was also five time higher in nest-workers than in the forager group, but statistical significance was not reached (adjusted P = 0.1435, 0.4211 between workers).



**Figure 6:** Guanylic Energy Charge (A), inosine concentration on homogenate (B) and inosine normalized by the mean mass of each caste. Values are mean  $\pm$  SD for A, median (IQR) in B and C. Q: queen, NW: nest-worker, F: forager. P\*\*\*<0.0005, P\*\*<0.005, P\*<0.05

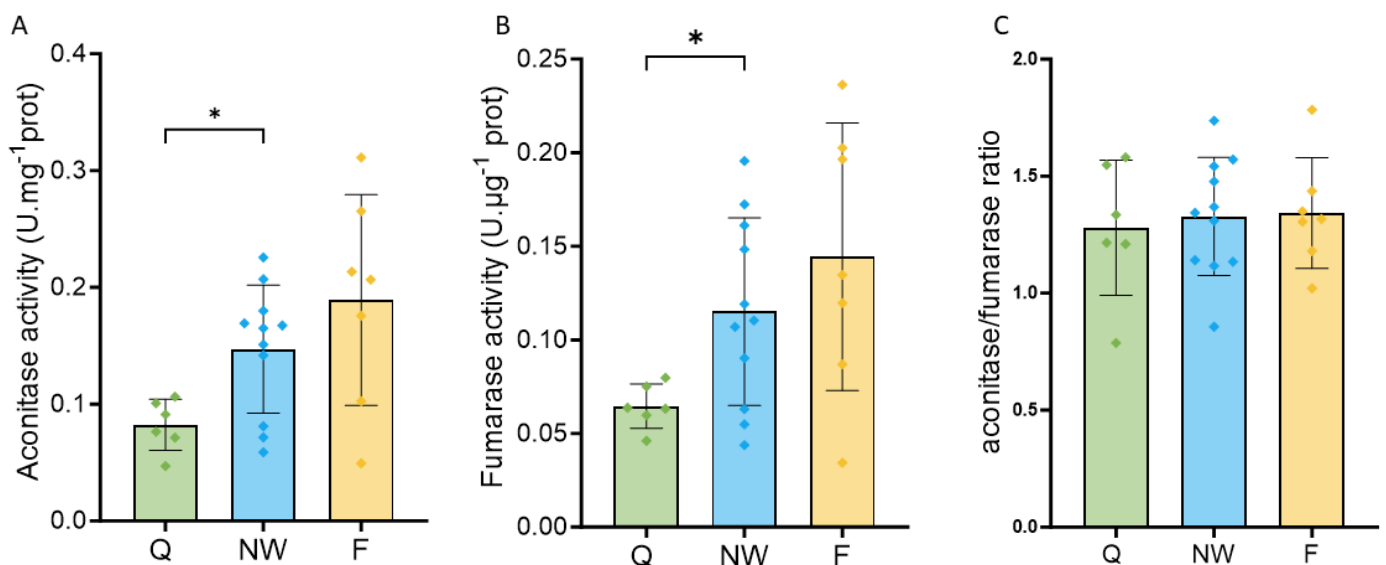


Worker brains show lipofuscin deposits, with higher catalase activity.

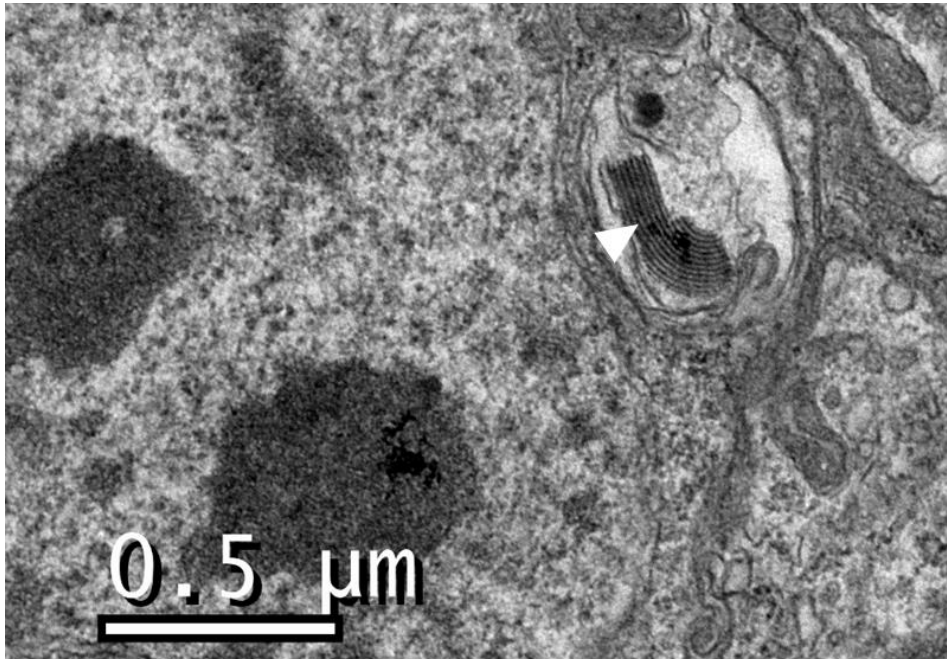
The activities of aconitase and fumarase were found significantly higher only in nest-workers compared to the queens ( $F_{(2, 11.80)} = 8.938$ , p-value  $<0.01$ ;  $F_{(2, 10.98)} = 8.303$ , with  $P < 0.01$ , Figure 7A and B, respectively). The aconitase/fumarase ratio was not different among the three castes ( $F_{(2, 21)} = 0.1037$ , with  $P = 0.9020$ , Figure 7C).

In addition to enzymatic measurements, electron microscopy allowed us to observe lipofuscin deposits highlighting lamellae structures (fingerprint) in ants' brains as shown in Figure 7D. The sample size was too small ( $n=1$ , there was no lipofuscin on all sections) to conduct proper statistical analysis, but many synapses had lipofuscin in the foragers' brain (up to three distinct structures in a same synapsis), and two structures were found in the nest-worker sections while none were characterized in the brains of queens (which were older than the workers).

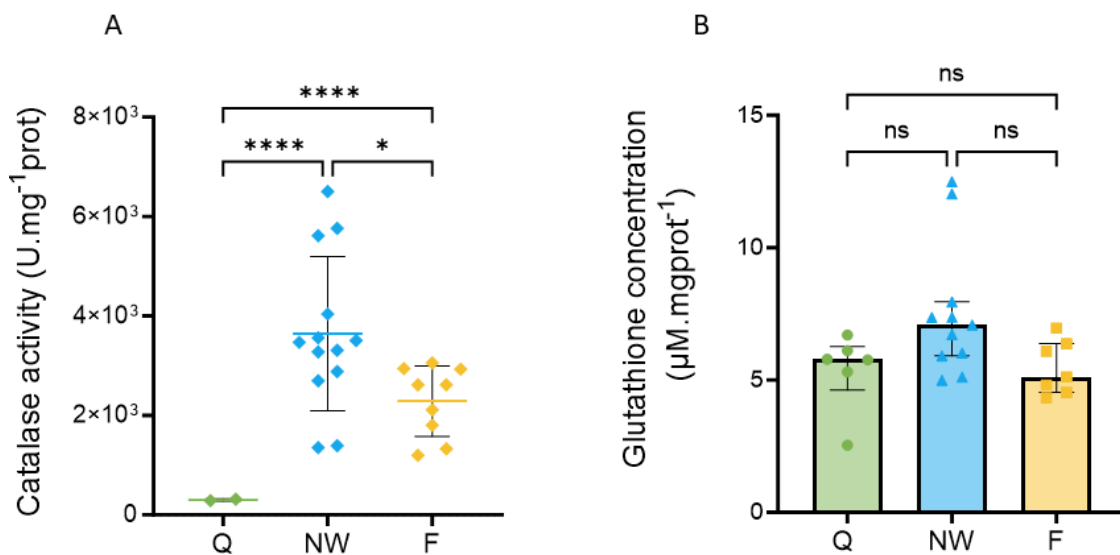
Catalase activity, shown in Figure 8A, was highest in the nest-worker group ( $F_{(2, 12.88)} = 62.09$  all  $P < 0,0001$ ) than in the queen (12 times lower) and the forager castes (6 times lower). No significant difference was found between worker castes,  $P = 0.0370$ ). No statistical differences in glutathione measurements were found between castes in Figure 8B (Kruskal-Wallis test  $H=6.105$ ,  $P < 0.05$ ).







**Figure 7:** Aconitase (A) and fumarase activities (B) measured in a same well. The enzyme ratio is used as indicator of oxidative stress (C). Electron microscopy allowed to observe lipofuscin accumulation in ant's brain (D), indicated with the white arrow. Q: queen, NW: nest-worker, F: forager.  $P^* < 0.05$ .



**Figure 8:** Antioxidant capacities measured via the activity of catalase (A), and glutathione concentration (B). Q: queen, NW: nest-worker, F: forager. \*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $P^* < 0.05$ .



## Discussion

Our comparison of mitochondrial functioning among *Lasius niger* castes underlined several key bioenergetics characteristics. First, measurements of oxygen consumption rate and Krebs cycle enzymatic activities (citrate synthase, aconitase and fumarase) indicate a lower mitochondrial activity in queens compared to workers. Second, the mitochondrial volume and mtDNA/nucDNA ratio suggested that the mitochondrial content is similar in queens and workers. Third, the energy charge of queens' mitochondria was higher. Fourth, oxidative stress appeared to be of lower amplitude in queens with (i) for a comparable level of aconitase/fumarase ratio, (ii) a stable (glutathione) and lower (catalase) antioxidant defence levels, (ii) proteomic profiles suggesting a specific antioxidant protection of key mitochondrial enzymes or enhanced mitochondrial fission/fusion rates (i.e, a proxy of mitochondrial maintenance) and (iii) less (no detection) of lipofuscin. Overall, our data suggest that ant queens may live longer because they combine lower oxygen consumption with higher ability to ensure mitochondria maintenance, but not from increased antioxidant defences.

The measurement of adenine nucleotides highlighted that both the adenine nucleotide content and the AEC were higher in queens. ATP hydrolysis is the primary means of supplying energy to processes that prevent fitness decay in the short term (e.g., preservation of cellular ions gradients, active elimination of waste/incoming poisons) and in the long term (e.g., replacement of altered/aged structures needing protein and lipid synthesis, DNA repair). Adenosine triphosphatases (that convert ATP into ADP, hereafter ATPases) are sensitive to the concentration of their substrate (ATP) and to the ratio between substrate and product (ATP/ADP ratio). Moreover, the higher the ATP/ADP ratio, the greater the energy released by ATP hydrolysis [74]. Consequently, with higher ATP concentrations and higher ATP/ADP ratio, ATP consumption effectors (ATPases) in queens are benefiting from larger energy resources than those of workers. Such a situation would particularly favour ATPases when the cell is short in energy, like those involved in protein recycling including mitochondrial proteins [75], and would guarantee better somatic protection/repair of the queen's organism as a whole. Replacement of non/moderately damaged biological structures is, in the short term, a futile cycle but in the long-term impacts positively fitness by mitigating damage accumulation (ageing). The extreme difference in longevity observed between closely related individuals (queens and worker ants) was expected to reveal previously described biochemical factors



associated to the fitness of the organism (e.g., oxidative stress), not directly under the control of genes (as ants of a same nest are close kins) but rather of lifestyle (determined by castes). Our results suggest that ATP concentration and higher AEC could belong to these factors, as their decrease would mechanically reduce global ATP availability but also the absolute hydrolysis energy gain by molecule of ATP (due to the Gibbs free energy effect) [74,76]. Again, the ultimate consequence of such bioenergetic advantage will be reflected in a higher rate of renewal of biological structures and a reduction of damages: in biochemical terms, queens are therefore permanently younger. Workers' lifestyle induces a higher energy demand, *i.e.*, a higher ATP turnover rate and consequently a higher metabolic rate. As a consequence, for ATP production to match the energy demand, the metabolic rate will rise and/or the AEC will decrease. As a consequence, the high ATP consumption that sustains worker lifestyle may have a long-term deleterious impact on the maintenance of the soma, by reduction of the renewal rate of biochemical structures (including mitochondria themselves). Any unbalanced investment in mitochondrial maintenance will inevitably lead to a higher fraction of damaged components and a faster decay of performance of workers (senescence), ultimately resulting in a shorter lifespan. Whether such an energy ATP-dependent trade-off mechanism is effectively modulating the levels of oxidative damage deserves consideration, as it would explain how ageing is dictated by the social status (worker or queen) in eusocial insects. Studies carried out on isolated mitochondria do not show that ROS are produced as a direct consequence of increased oxygen consumption, but rather the opposite [3]. In contrast, altered enzymatic function of redox proteins (of the electron transport chain) tends to favour the release of mitochondrial ROS thus implying a higher demand in terms of repair, a situation at risk on the long term due to the progressive decline of repair performance with age. In the following discussion, we will highlight that queen ants may actually have coevolved a bioenergetic status compatible with a higher investment in mitochondrial maintenance.

Black garden ant queens were found to have a lower (based on citrate synthase activity), or at least comparable (based on mitochondrial genome copy numbers or on total mitochondrial volume) mitochondrial density to that of workers. In the literature, mitochondrial density is often described to increase with advancing age to compensate for altered mitochondrial function due to oxidative damage accumulation, for instance as stated in the trophocytes and fat cells of worker bees [77]. Previous observations of young and older queen bees (16 months) found no difference in mitochondrial density [78], suggesting that

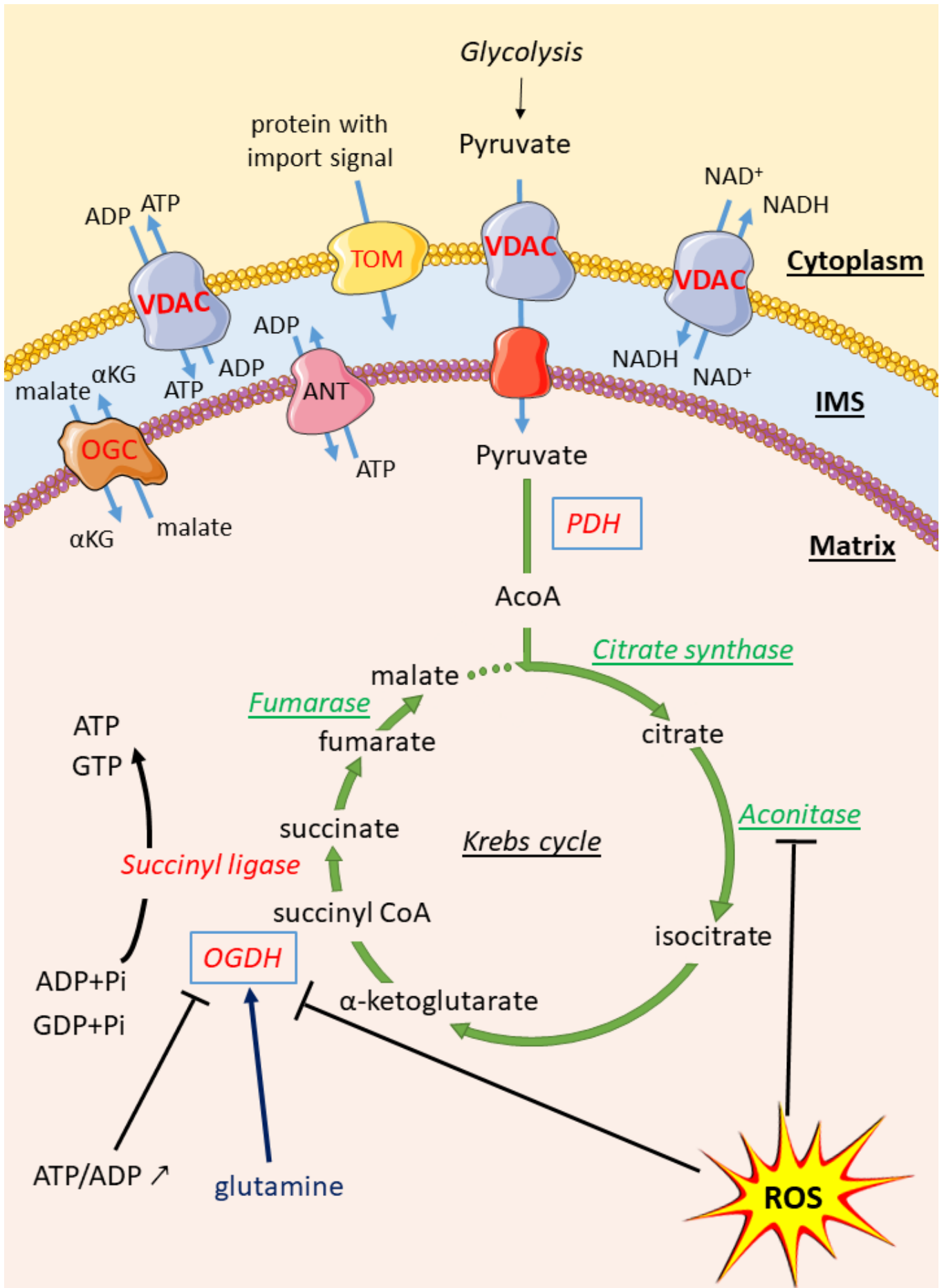


the maintenance of their bioenergetic capacity with age is a particular trait of this long-lived caste. The higher ATP content (and AEC index) in ant queens supports the idea that they have a higher capacity of energy production per mitochondria compared to workers.

Proteomic profiles in ants highlighted higher abundances for a few proteins in queens, notably proteins of the mitochondrial membrane (see Figure 9). Voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) is the most abundant protein in the mitochondrial outer membrane [79], and the two porines we identified were both more abundant (up to 14-fold) in queens. VDAC1 is important for a variety of mitochondrial functions, including diffusion of metabolites (such as ATP, ADP, NADH, pyruvate), nucleotides and ions (such as  $\text{Ca}^{2+}$ ) at the outer mitochondrial membrane [79]. The higher expression of VDAC1 supports the idea that ATP/ADP traffic is a key parameter of queen bioenergetics. The most significant difference between queens and workers concerns oxoglutarate dehydrogenase (OGDH, or 2-oxoglutarate dehydrogenase complex component E1, also referred as KGDH for  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase). A higher content of associated 2-oxoglutarate malate carrier (OGC) that transports the 2-oxoglutarate (or  $\alpha$ -ketoglutarate  $\alpha$ KG) protein across the inner membranes of mitochondria is in line with the idea of a higher mitochondrial maintenance process. OGDH has been shown to maintain mitochondrial fusion and fission events in both *C. elegans* and human cells [80].

**Figure 9:** mitochondrial membrane flux and flux in the Krebs cycle. Proteins with at least one subunit showing a significant fold change in favour of queens in proteomics are highlighted in red. The Krebs cycle enzymes underlined in green were assessed in this paper and exhibit lower activity in queens compared to at least one group of workers. VDAC is a membrane protein that facilitates the exchange of metabolites of various types between cytoplasm and mitochondrial intermembrane space, contributing to the regulation of the Krebs cycle and energy production. The ANT translocase allows the entry of ADP into the mitochondrial matrix in exchange for ATP. PDH and OGDH are key players controlling the large majority of carbon flow into the Krebs cycle, derived from pyruvate and glutamine, respectively. KGDH is particularly sensitive to ROS (especially  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), as is aconitase, whose inactivation serves as a marker of oxidative stress when the aconitase/fumarase ratio decreases. PDH: pyruvate dehydrogenase, OGDH: 2-oxoglutarate dehydrogenase E1, VDAC: voltage-dependent anion channel proteins, OMT: oxoglutarate-malate translocator, TOM: translocase of the outer membrane, AcoA: acetyl coenzyme A, IMS: intermembrane space,  $\alpha$ KG: alpha-ketoglutarate, ROS: reactive oxygen species ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).





These proteomic data support our indication of more frequent mitochondrial fission/fusion events also suggested from electron microscopy and the higher circularity index measured in queens (see Figure 4C). As altered mitochondrial dynamics with senescence can inhibit mitophagy and lead to accumulation of damaged or dysfunctional mitochondria in cells [81], higher rate of fission/fusion events, by regularly rejuvenating the mitochondrial pool, should better protect queens from the deleterious effects of ageing on bioenergetics.

A high metabolic rate and oxygen consumption implies an inevitable associated risk of oxidative damage to biomolecules by ROS. The 'ROS theory of ageing', which complements the rate of living theory, stipulates that the higher the metabolic rate and the associated oxidative cost, the faster the ageing process. Contrary to our initial expectations, the aconitase/fumarase ratio was not found to be higher in the long-lived and less metabolically active queen caste compared to the worker caste. Still, even if this observation needs confirmation, lipofuscin, another proxy of ageing, was found at higher levels in the worker microscopic sections Figure 7. This auto-fluorescent pigment has been observed to accumulate in other insects like social bees with chronological age [85,86]. Since the inhibition of mitochondrial fission leads to increased lipofuscin formation [86], which might hinder autophagy and disrupted mitochondrial degradation, the lower lipofuscin signal in queen reinforces our previous hypothesis that mitochondrial dynamic is more prevalent in queens and/or results in a faster accumulation of dysfunctional mitochondria as worker ants age [77].

The antioxidant barrier was found to be lowered in the long-lived queens, as our measurements of catalase enzyme found it less active in queens (or non-significantly different for glutathione levels). Thus, the antioxidant parameters are not correlated with the long-lived phenotype in the black garden ant, contrary to other social insects such as termites [51,52]. It may be that queens do not need to invest in antioxidant compounds as they may benefit from (i) a lower rate of mitochondrial ROS production, (ii) the social shielding as workers are the only ones on the front line of environmental stress (e.g., [87]). In certain ant species, intense cooperation relies on trophallaxis, the mouth-to-mouth exchange of fluids within the colony, and the division of labour results in a chain of food dissemination in the form of a hierarchical network [88,89]. Proteomic analysis of trophallactic fluid in colonies of the ant *Camponotus floridanus* revealed that nurses, responsible for brood care and closer to the queen in the social network, have higher levels of proteins involved in oxidative stress response (superoxide dismutase and glutathione peroxidase). Trophallaxie might therefore in this case help the



individuals at the end of the food chain to benefit from the costs that others individuals belonging to the same social network actually incur [90].

In conclusion, our work supports a mitochondrial basis for the unexpected longevity of the black-garden ant queen. This process extends beyond the simple ROS/antioxidant equation, as we show that the queen's longevity appears based on (i) a higher ATP/ADP ratio leading to a more efficient energy release for each molecule of ATP hydrolysed, (ii) a lower metabolic rate and (iii) a higher investment of saved energy in the maintenance of mitochondrial functioning as reflected by the regulation of fusion/fission or the expression of mitochondrial enzymes of the Krebs cycle. The enhanced maintenance of mitochondria may be a key component of the queen's particular metabolism and the paradoxical trade-off between the high metabolic demand of reproduction, their relatively lower metabolism and their exceptional longevity. **Conflict of interest declaration.** We declare we have no competing interests.

**Authors' contributions.** MK, FB and FC set up the experiment, MK carried out the measurements and statistical analyses, MK and FC wrote a first version of the manuscript and all co-authors drafted the final manuscript and agreed to publication.

**Acknowledgements.** We acknowledge the Platform facility of Cochin Institute for electron microscopy, and give all thanks to SAM Platform for its prompt service and quick responses to our questions. The Integriion chromatography station was acquired with the financial support of SIRIC BRIO2 (COMMUCAN) and Region Nouvelle-Aquitaine(AAPPF2021-2020-12000110). The authors express gratitude to Mary Lucienne Waller for proofreading the language.

**Funding.** The ETERNEEL project was funded by a grant (2020-2021) from the MITI agency (Mission pour les Initiatives Transverses et Interdisciplinaires) of the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), who also granted M. Kervella with a PhD grant (2020-2023).



**Table S1:** Significant results from the proteomic analyses (P-value < 0.05). In the first analysis, the queens were used as the reference. Subsequently, foragers were used as the reference for comparisons among workers. A negative ratio indicates that proteins are more abundant in the reference group.

ID	ratio F VS Q	ratio NW VS Q	ratio NW VS F
2-oxoglutarate dehydrogenase e1 mitochondrial	-7.73	-7,73	
Pyruvate dehydrogenase e1 component subunit somatic mitochondrial	-7.62	-7,62	
Voltage-dependent anion-selective channel-like protein	-7.38	-7,38	
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	-6.76	-6,76	
Succinyl-ligase	-9.33	-9,33	
Carrier isoform x1	-4.79	-4,79	
2-oxoglutarate dehydrogenase e1 mitochondrial	-8.4	-8,4	
Mitochondrial 2-oxoglutarate malate carrier	-8.54	-8,54	
2-oxoglutarate dehydrogenase e1 mitochondrial	-8.1	-8,1	
Ubiquinone biosynthesis protein mitochondrial	4.09		
Transport and golgi organization protein 11-like protein	6.51		
L-2-hydroxyglutarate mitochondrial	-3.48		
Mitochondrial-like isoform 2 protein	4.6		
Mitochondrial import receptor subunit tom40-like protein	-4.71		
Nadh dehydrogenase	6.08		
Cytochrome c oxidase subunit mitochondrial	5.11		-5.11
Protein ndufaf4-like protein	5.78		
Beta-lactamase-like protein 2 protein			-0.878
Hexokinase			1.42
Succinate dehydrogenase assembly factor mitochondrial-like protein			-3.32
Cytochrome b-c1 complex subunit 8			-0.996





## References

1. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 6 juin 2013;153(6):1194-217.
2. Schmauck-Medina T, Molière A, Lautrup S, Zhang J, Chlopicki S, Madsen HB, et al. New hallmarks of ageing: a 2022 Copenhagen ageing meeting summary. *Aging*. 29 août 2022;14(16):6829-39.
3. Brand MD. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol*. 1 sept 2000;35(6):811-20.
4. Sastre J, Pallardó FV, Viña J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*. mai 2000;49(5):427-35.
5. Lenaz G, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML, et al. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci*. avr 2002;959:199-213.
6. Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc*. avr 1972;20(4):145-7.
7. Theurey P, Pizzo P. The Aging Mitochondria. *Genes*. janv 2018;9(1):22.
8. Zhang J, Khvorostov I, Hong JS, Oktay Y, Vergnes L, Nuebel E, et al. UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells. *EMBO J*. 14 déc 2011;30(24):4860-73.
9. Pearl R. *The rate of living*. University of London Press, LTD. 1928;
10. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol*. 1 juill 1956;11(3):298-300.
11. Lima T, Li TY, Mottis A, Auwerx J. Pleiotropic effects of mitochondria in aging. *Nat Aging*. mars 2022;2(3):199-213.
12. Oxidative Stress in Age-Related Neurodegenerative Diseases: An Overview of Recent Tools and Findings -
13. Koch RE, Buchanan KL, Casagrande S, Crino O, Dowling DK, Hill GE, et al. Integrating Mitochondrial Aerobic Metabolism into Ecology and Evolution. *Trends Ecol Evol*. avr 2021;36(4):321-32.
14. Criscuolo F, Gonzalez-Barroso M del M, Bouillaud F, Ricquier D, Miroux B, Sorci G. Mitochondrial uncoupling proteins: new perspectives for evolutionary ecologists. *Am Nat*. déc 2005;166(6):686-99.



15. Ku HH, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic Biol Med.* déc 1993;15(6):621-7.
16. Barja G, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M. Low mitochondrial free radical production per unit O<sub>2</sub> consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Radic Res.* oct 1994;21(5):317-27.
17. Mélanie B, Caroline R, Yann V, Damien R. Allometry of mitochondrial efficiency is set by metabolic intensity. *Proc R Soc B Biol Sci.* 25 sept 2019;286(1911):20191693.
18. Boël M, Voituron Y, Roussel D. Body mass dependence of oxidative phosphorylation efficiency in liver mitochondria from mammals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* oct 2023;284:111490.
19. Salin K, Villasevil EM, Anderson GJ, Lamarre SG, Melanson CA, McCarthy I, et al. Differences in mitochondrial efficiency explain individual variation in growth performance. *Proc R Soc B Biol Sci.* 28 août 2019;286(1909):20191466.
20. Stier A, Bize P, Roussel D, Schull Q, Massemin S, Criscuolo F. Mitochondrial uncoupling as a regulator of life-history trajectories in birds: an experimental study in the zebra finch. *J Exp Biol.* 1 oct 2014;217(Pt 19):3579-89.
21. Salin K, Villasevil EM, Anderson GJ, Auer SK, Selman C, Hartley RC, et al. Decreased mitochondrial metabolic requirements in fasting animals carry an oxidative cost. *Funct Ecol.* sept 2018;32(9):2149-57.
22. Caldeira da Silva CC, Cerqueira FM, Barbosa LF, Medeiros MHG, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell.* août 2008;7(4):552-60.
23. Roussel D, Salin K, Dumet A, Romestaing C, Rey B, Voituron Y. Oxidative phosphorylation efficiency, proton conductance and reactive oxygen species production of liver mitochondria correlates with body mass in frogs. *J Exp Biol.* oct 2015;218(Pt 20):3222-8.
24. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol.* 15 nov 2000;529(Pt 1):3-10.
25. Salin K, Mathieu-Resuge M, Graziano N, Dubillot E, Le Grand F, Soudant P, et al. The relationship between membrane fatty acid content and mitochondrial efficiency differs within- and between- omega-3 dietary treatments. *Mar Environ Res.* janv 2021;163:105205.



26. Metcalfe NB, Olsson M. How telomere dynamics are influenced by the balance between mitochondrial efficiency, reactive oxygen species production and DNA damage. *Mol Ecol.* déc 2022;31(23):6040-52.
27. Koch RE, Josefson CC, Hill GE. Mitochondrial function, ornamentation, and immunocompetence. *Biol Rev Camb Philos Soc.* août 2017;92(3):1459-74.
28. Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria. *J Biol Chem.* juill 1956;221(1):477-89.
29. Borregaard N, Herlin T. Energy Metabolism of Human Neutrophils during Phagocytosis. *J Clin Invest.* 1 sept 1982;70(3):550-7.
30. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* déc 2010;11(12):872-84.
31. Lucas ER, Keller L. Ageing and somatic maintenance in social insects. *Curr Opin Insect Sci.* 1 nov 2014;5:31-6.
32. Heinze J, Giehr J. The plasticity of lifespan in social insects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 26 avr 2021;376(1823):20190734.
33. Keller L, Genoud M. Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing. *Nature.* oct 1997;389(6654):958-60.
34. Korb J, Thorne B. Sociality in Termites. In: *Comparative Social Evolution.* 2017. p. 124-53.
35. Tasaki E, Matsuura K, Iuchi Y. Hypoxia adaptation in termites: hypoxic conditions enhance survival and reproductive activity in royals. *Insect Mol Biol.* 2018;27(6):808-14.
36. Parker JD. What are social insects telling us about aging?
37. Keller L. Queen lifespan and colony characteristics in ants and termites. *Insectes Sociaux.* 1 août 1998;45(3):235-46.
38. Kramer BH, Schaible R, Scheuerlein A. Worker lifespan is an adaptive trait during colony establishment in the long-lived ant *Lasius niger*. *Exp Gerontol.* 1 déc 2016;85:18-23.
39. Münch D, Kreibich CD, Amdam GV. Aging and its modulation in a long-lived worker caste of the honey bee. *J Exp Biol.* 1 mai 2013;216(9):1638-49.
40. Behrends A, Scheiner R, Baker N, Amdam GV. Cognitive aging is linked to social role in honey bees (*Apis mellifera*). *Exp Gerontol.* déc 2007;42(12):1146-53.



41. Fonseca DB, Sheehy MRJ, Blackman N, Shelton PMJ, Prior AE. Reversal of a hallmark of brain ageing: lipofuscin accumulation. *Neurobiol Aging*. janv 2005;26(1):69-76.
42. Terman A, Brunk UT. Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. févr 1998;106(2):265-76.
43. Schrempf A, Heinze J, Cremer S. Sexual cooperation: mating increases longevity in ant queens. *Curr Biol CB*. 8 févr 2005;15(3):267-70.
44. Rueppell O, Königseder F, Heinze J, Schrempf A. Intrinsic Survival Advantage of Social Insect Queens Depends on Reproductive Activation. *J Evol Biol*. déc 2015;28(12):2349-54.
45. Majoe M, Libbrecht R, Foitzik S, Nehring V. Queen loss increases worker survival in leaf-cutting ants under paraquat-induced oxidative stress. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 26 avr 2021;376(1823):20190735.
46. Dixon L, Kuster R, Rueppell O. Reproduction, social behavior, and aging trajectories in honeybee workers. *Age*. févr 2014;36(1):89-101.
47. Negroni MA, Macit MN, Stoldt M, Feldmeyer B, Foitzik S. Molecular regulation of lifespan extension in fertile ant workers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 26 avr 2021;376(1823):20190736.
48. Tsuji K, Nakata K, Heinze J. Lifespan and reproduction in a queenless ant. *Naturwissenschaften*. 1 déc 1996;83(12):577-8.
49. Annagiri S. Diacamma. In: Starr CK, éditeur. *Encyclopedia of Social Insects* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [cité 26 sept 2023]. p. 325-30.
50. Schneider S, Schrader C, Wagner A, Boesch C, Liebig J, Rimbach G, et al. Stress Resistance and Longevity Are Not Directly Linked to Levels of Enzymatic Antioxidants in the Ponerine Ant *Harpegnathos saltator*. *PloS One*. 27 janv 2011;6:e14601.
51. Tasaki E, Kobayashi K, Matsuura K, Iuchi Y. An Efficient Antioxidant System in a Long-Lived Termite Queen. *PLoS ONE*. 11 janv 2017;12(1):e0167412.
52. Tasaki E, Kobayashi K, Matsuura K, Iuchi Y. Long-Lived Termite Queens Exhibit High Cu/Zn-Superoxide Dismutase Activity. *Oxid Med Cell Longev*. 13 févr 2018;2018:e5127251.
53. Negroni MA, Foitzik S, Feldmeyer B. Long-lived *Temnothorax* ant queens switch from investment in immunity to antioxidant production with age. *Sci Rep*. 13 mai 2019;9:7270.
54. Kramer BH, Nehring V, Buttstedt A, Heinze J, Korb J, Libbrecht R, et al. Oxidative stress and senescence in social insects: a significant but inconsistent link? *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 26 avr 2021;376(1823):20190732.



55. Lenoir A, Ataya H. Polyéthisme et répartition des niveaux d'activité chez la fourmi *Lasius niger* L. [Polyethism and distribution of activity levels in the ant *Lasius niger* L.]. *Z Für Tierpsychol.* 1983;63(2-3):213-32.
56. Quque M, Benhaim-Delarbre M, Deneubourg JL, Sueur C, Criscuolo F, Bertile F. Division of labour in the black garden ant (*Lasius niger*) leads to three distinct proteomes. *J Insect Physiol.* sept 2019;117:103907.
57. Mersch DP, Crespi A, Keller L. Tracking Individuals Shows Spatial Fidelity Is a Key Regulator of Ant Social Organization. *Science.* 31 mai 2013;340(6136):1090-3.
58. Kervella M, Cansell C, Criscuolo F, Bouillaud F. Utilization of a Clark electrode device as a respirometer for small insects: a convincing test on ants allowing to detect discontinuous respiration p. 2023.10.31.564912.
59. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* déc 2006;1(6):3159-65.
60. Henson CP, Cleland WW. Purification and Kinetic Studies of Beef Liver Cytoplasmic Aconitase. *J Biol Chem.* sept 1967;242(17):3833-8.
61. Alberty RA, Massey V, Frieden C, Fuhlbrigge AR. Studies of the Enzyme Fumarase. III.1 The Dependence of the Kinetic Constants at 25° upon the Concentration and pH of Phosphate Buffers. *J Am Chem Soc.* 1 mai 1954;76(9):2485-93.
62. Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, et al. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal Biochem.* 15 janv 2003;312(2):224-7.
63. Quque M. Coevolution of sociality and ageing in animal societies [Internet] [These de doctorat]. Strasbourg; 2020
64. Lam J, Katti P, Biete M, Mungai M, AshShareef S, Neikirk K, et al. A Universal Approach to Analyzing Transmission Electron Microscopy with ImageJ. *Cells.* 24 août 2021;10(9):2177.
65. Atkinson DE, Walton GM. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *J Biol Chem.* 10 juill 1967;242(13):3239-41.
66. Atkinson DE. Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry.* 1 nov 1968;7(11):4030-4.
67. Chapman AG, Fall L, Atkinson DE. Adenylate Energy Charge in *Escherichia coli* During Growth and Starvation. *J Bacteriol.* déc 1971;108(3):1072-86.



68. De la Fuente IM, Cortés JM, Valero E, Desroches M, Rodrigues S, Malaina I, et al. On the Dynamics of the Adenylate Energy System: Homeorhesis vs Homeostasis. *PLoS ONE*. 10 oct 2014;9(10):e108676.
69. Passman FJ, Schmidt J, Lewis RP. The relationship between microbial community vitality and ATP bioburden in bottom waters under fuel microcosms. *Access Microbiol*. 2023;5(4):acmi000411.
70. Karl DM, Haugsness JA, Campbell L, Holm-Hansen O. Adenine nucleotide extraction from multicellular organisms and beach sand: ATP recovery, energy charge ratios and determination of carbon/ATP ratios. *J Exp Mar Biol Ecol*. 1 janv 1978;34(2):163-81.
71. Pinson B, Moenner M, Saint-Marc C, Granger-Farbos A, Daignan-Fornier B. On-demand utilization of phosphoribosyl pyrophosphate by downstream anabolic pathways. *J Biol Chem*. août 2023;299(8):105011.
72. Zhang X, Smits AH, Van Tilburg GB, Ovaa H, Huber W, Vermeulen M. Proteome-wide identification of ubiquitin interactions using UbiA-MS. *Nat Protoc*. mars 2018;13(3):530-50.
73. Kowarik A, Templ M. Imputation with the R Package VIM. *J Stat Softw*. 20 oct 2016;74:1-16.
74. Nicholls DG. *Bioenergetics* [Internet]. 4<sup>e</sup> éd. Academic Press; 2013.
75. Xu S, Peng G, Wang Y, Fang S, Karbowski M. The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover. Glick B, éditeur. *Mol Biol Cell*. févr 2011;22(3):291-300.
76. Alberty RA. Biochemical thermodynamics. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol*. 20 juill 1994;1207(1):1-11.
77. Chuang YL, Hsu CY. Changes in mitochondrial energy utilization in young and old worker honeybees (*Apis mellifera*). *Age*. oct 2013;35(5):1867-79.
78. Mitochondrial energy utilization maintains young status in the trophocytes and oenocytes of old queen honeybees | SpringerLink
79. Camara AKS, Zhou Y, Wen PC, Tajkhorshid E, Kwok WM. Mitochondrial VDAC1: A Key Gatekeeper as Potential Therapeutic Target. *Front Physiol*. 30 juin 2017;8:460.
80. Gallo M, Park D, Luciani DS, Kida K, Palmieri F, Blacque OE, et al. MISC-1/OGC Links Mitochondrial Metabolism, Apoptosis and Insulin Secretion. *PLoS ONE*. 23 mars 2011;6(3):e17827.



81. Srivastava S. The Mitochondrial Basis of Aging and Age-Related Disorders. *Genes*. 19 déc 2017;8(12):398.
82. Stukalyuk S. Mobilization Strategies in Ants (Hymenoptera: Formicidae). *Fragm Entomol*. 15 déc 2022;54(2):321-36.
83. Nyamukondiwa C, Addison P. Food preference and foraging activity of ants: Recommendations for field applications of low-toxicity baits. *J Insect Sci*. 1 janv 2014;14:48.
84. Tretter L, Adam-Vizi V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 29 déc 2005;360(1464):2335-45.
85. Martin N, Hulbert AJ, Bicudo JEPW, Mitchell TW, Else PL. The adult lifespan of the female honey bee (*Apis mellifera*): Metabolic rate, AGE pigment and the effect of dietary fatty acids. *Mech Ageing Dev*. 1 oct 2021;199:111562.
86. König J, Ott C, Hugo M, Jung T, Bulteau AL, Grune T, et al. Mitochondrial contribution to lipofuscin formation. *Redox Biol*. 25 janv 2017;11:673-81.
87. Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P. Social Immunity. *Curr Biol*. 21 août 2007;17(16):R693-702.
88. Negroni MA, LeBoeuf AC. Metabolic division of labor in social insects. *Curr Opin Insect Sci*. 16 juill 2023;101085.
89. Quque M, Bles O, Bénard A, Héraud A, Meunier B, Criscuolo F, et al. Hierarchical networks of food exchange in the black garden ant *Lasius niger*. *Insect Sci*. juin 2021;28(3):825-38.
90. Hakala SM, Meurville MP, Stumpe M, LeBoeuf AC. Biomarkers in a socially exchanged fluid reflect colony maturity, behavior, and distributed metabolism. Wittkopp PJ, éditeur. *eLife*. 2 nov 2021;10:e74005.





Photo : arrivage de fourmis pour les analyses de protéomique mitochondriale





## Chapitre 3: Discussion générale



*Photo : observation de nématodes présents dans les glandes mandibulaires*

*de Lasius niger*



Les fourmis offrent une opportunité scientifique unique pour l'étude des mécanismes du vieillissement, puisque l'on observe, à la fois entre les espèces, mais également au sein d'une même espèce, des longévités très contrastées. En effet, les sociétés myrmécéennes reposent sur une séparation des rôles associée à de multiples variables phénotypiques qui ont été maintes fois pointées comme des co-variables de la longévité. En effet, les castes sociales de fourmis se distinguent par des différences de tailles (e.g., une reine *Lasius niger* ayant en moyenne une masse 32,4 à 39,4 fois supérieure à celle d'une ouvrière), qui sont connues pour être à la base de l'explication des longévités par le taux de vie (« pace of life ») chez les vertébrés. Une plus grande taille a co-évolué avec des taux de croissance plus lents, et l'atteinte d'une maturité sexuelle plus tardive qui conduit à une prolongation de la durée de vie (Dobson 2007) ou une diminution de la sénescence (Jones et al. 2008). Ainsi, dans notre cas, une hypothèse plausible serait que les reines de plus grande taille vivent plus longtemps que les ouvrières car celles-ci sont plus petites dans la plupart des cas (Jemielity et al. 2005). On parle de polyphénisme pour ces différences morphologiques malgré un génome très proche). C'est là un premier paradoxe observable chez la fourmi : la longévité n'est pas expliquée par la taille/masse corporelle (selon les études), ni entre castes (reines et ouvrières) ou au sein d'une même caste (Calabi and Porter 1989). Par exemple, chez l'espèce *Cardiocondyla cf. kagutsuchi*, la masse corporelle des reines n'explique, au mieux que 13% de la longévité de cette caste (Heinze et al. 2013). Cette absence de lien représente en fait un avantage pour l'étude de l'évolution de la longévité et/ou du vieillissement, puisque le modèle biologique « fourmi » rend possible l'étude de la longévité sans l'effet confondant de la masse sur la longévité, effet bien connu chez les vertébrés (Promislow 1991; Partridge and Barton 1997). Si la faible étendue des valeurs de masse peut être à l'origine de cette non-corrélation, il est remarquable d'observer que pour une même masse, les insectes sociaux ont des longévités bien plus grandes que celles des insectes non sociaux (Lucas and Keller 2020). Généralement, le lien explicatif entre masse et longévité est que la dépense énergétique diminue avec la taille/masse corporelle, respectant ainsi les prédictions de la théorie du taux de vie. Il semble que cela soit le cas chez les fourmis, au moins entre castes d'ouvrières (la bibliographie sur le lien existant au sein des reines reste pauvre), puisque chez la fourmi de feu *Solenopsis invicta*, la dépense énergétique des ouvrières (Calabi and Porter 1989) est corrélée de manière inverse à la masse. Voici un second paradoxe myrécéen, car si la masse n'explique pas la longévité, elle semble cependant agir sur la dépense énergétique, et



découpler celle-ci des effets prédits par les attendus de la théorie radicalaire du vieillissement. S'il est vrai que les aspects sociaux viennent compliquer la caractérisation de la nature des mécanismes explicatifs de la longévité chez les fourmis, elles restent un modèle unique pour explorer la bases bioénergétique des différences entre castes. En effet, leurs différences intraspécifiques de durée de vie ne peuvent pas simplement être attribuées à des différences génétiques (à l'exception de l'épigénétique et des mécanismes d'épissage alternatif), car tous les membres d'une colonie partagent au moins la **moitié du même génome**, les ouvrières étant les filles de la reine. Cela a également pour conséquence que toutes les ouvrières partagent la **même mitochondrie**, l'organite cellulaire qui produit 90% de l'énergie de la cellule sous forme d'ATP, mais qui contribue également au vieillissement via la production de **ROS**.

Alors que le lien entre les interactions sociales et le stress individuel n'est pas nouveau en physiologie, son influence sur des mécanismes de vieillissement chez des espèces dont les individus vivent dans un environnement social différent, tout en partageant un même pool génétique et la même lignée mitochondriale reste à décrire. L'objectif de ce travail de thèse consistait donc à enrichir nos connaissances sur l'association entre stress oxydant et vieillissement, en utilisant comme modèle un insecte social, une espèce locale, connue et simple à maintenir en captivité, la fourmi noire des jardins, *Lasius niger*. Il s'agissait d'établir dans un premier temps les profils bioénergétiques les plus complets possibles des différentes castes de fourmis, à travers l'utilisation d'approches complémentaires. En conséquence, bien que les causes du vieillissement soient multifactorielles (López-Otín et al. 2013, 2023; Hernandez-Segura et al. 2018), nous nous sommes particulièrement intéressés au stress oxydant mitochondrial. Nos prédictions reposaient sur les théories classiques du vieillissement proposées par Pearl (rate of living théorie, 1928) et Harman (théorie radicalaire en 1956) traitant du rôle spécifique des mitochondries : le vieillissement des individus serait lié à la capacité de leurs mitochondries à optimiser la production d'ATP tout en réduisant celle des ROS.



## La longévité des reines peut s'expliquer à différents niveaux :

### 1. Un métabolisme plus bas

Après avoir validé l'utilisation de l'électrode de Clark pour mesurer la respiration de nos fourmis dans le premier chapitre, nous avons montré que les reines présentaient un taux métabolique significativement plus bas que celui des ouvrières (chapitre 2), ce qui corrobore les théories classiques du vieillissement. Les ouvrières les plus âgées (les fourrageuses) présentaient quant à elles le métabolisme le plus élevé dans la colonie.

### 2. Un meilleur équilibre entre les systèmes oxydants et antioxydants

#### A. Les reines plus âgées ne montrent pas plus de signes de dommages

L'idée de départ du projet de thèse consistait à discuter de la théorie radicalaire et de la place de la mitochondrie dans les processus de vieillissement chez les fourmis. J'ai dans un premier temps envisagé de coupler des coupes de microscopie en utilisant des sondes spécifiques des ROS (mitochondriales et cytoplasmiques) avec des mesures de l'évolution de l'hétéroplasmie (i.e., coexistence de mitochondries viables et mutées au sein d'une cellule) des fourmis en fonction de leur âge, qui en principe augmente avec l'accumulation de dommages oxydants (Zapico and Ubelaker 2013; Elorza and Soffia 2021). En effet, la théorie des ROS mitochondriales prédit qu'un cycle vicieux intra mitochondrial contribue au processus de vieillissement : les ROS produites dans l'organite causent des dommages aux phospholipides, protéines et acides nucléiques à proximité du site de production, provoquant des mutations de l'ADN mitochondrial (mtDNA). Cela conduit à la synthèse de sous-unités défectueuses de la chaîne respiratoire, qui vont produire à leur tour plus de ROS, et ainsi de suite (Thompson 2006). A cela s'ajoutait l'enthousiasme lié à la publication d'informations sur des génomes proches : l'ADN mitochondrial de *Lasius spathopus*, premier génome mitochondrial de *Lasius* entièrement séquencé, a été publié en tout début d'année 2021 (Park and Park 2021). Ce dernier fait 18 951 bp (6<sup>e</sup> génome mitochondrial de fourmi le plus long connu), et code, comme pour la plupart des métazoaires, 13 protéines, 2 ARN ribosomiques, 22 ARN de transfert, ainsi qu'une région contrôle de 2 147 bp, la plus longue de toutes les fourmis (Park and Park 2021). En ce qui concerne l'espèce modèle *Lasius niger*, la plus longue séquence que j'ai trouvée (non annoté « incomplète ») sur NCBI faisait quant à elle 16947bp



(non vérifiée, ACCESSION : OQ749828). L'idée consistait donc à isoler les mitochondries à deux/trois âges clés de la vie d'une reine et d'ouvrières d'une même colonie, et de faire du « *whole genome sequencing* » (Duan et al. 2018), ou de la PCR « *long-range* », c'est-à-dire en n'utilisant qu'un couple d'amorces pour le génome mitochondrial entier (Zhang et al. 2012). Malheureusement, après un échange avec la plateforme de séquençage de l'institut Cochin, la mesure paraissait compliquée à mettre en place, et je l'ai vite laissée de côté.

Les ROS étant très instables, il est difficile d'obtenir des résultats reproductibles sur des observations microscopiques. Nous avons alors décidé de déduire indirectement leur production par des mesures de dommages liés au stress oxydant, notamment le ratio aconitase/fumarase, mesuré dans le chapitre 2, qui s'est avéré être le même pour tous les groupes : les reines d'âge chronologique plus important (3 ans, ce qui reste jeune relativement à leur espérance de vie) ne montraient pas plus de dommages ; les fourrageuses, en principe plus âgées que les nourrices (mais dont l'âge chronologique n'était malheureusement pas contrôlé), non plus.

## B. La barrière antioxydante, indicateur très inégal de la longévité

Le stress oxydant est communément décrit comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes. La théorie radicalaire place au premier plan ce déséquilibre.

Dans la littérature, il a été montré que les ROS induits expérimentalement chez abeilles et fourmis augmentent la sénescence (Corona et al. 2007; Majoe et al. 2021). Une étude de Kramer et collaborateurs a visé à identifier des patterns communs de réponse au stress chez différentes espèces d'insectes sociaux, incluant des reproducteurs/ ouvrières (quantification des niveaux d'oxydation des protéines et analyse transcriptomique en réponse au stress). Leurs résultats suggèrent que les profils de réponses sont en fait propres à une espèce et non pas à un rôle social dans la colonie (Kramer et al. 2021a) ; la barrière antioxydante est un indicateur inégal de la longévité.

Ici, reines et ouvrières ont montré des concentrations similaires de glutathion, l'antioxydant le plus abondant dans la cellule. En revanche, l'activité catalase était très inférieure chez les reines. Cela suggère un investissement moindre de leur part, peut être en



relation avec moins de stress oxydant subit, l'énergie produite par la cellule pouvant alors être allouée à d'autres processus vitaux (Monaghan et al. 2009).

### C. L'immunité comportementale chez les insectes sociaux

La fitness d'un organisme dépend en partie de sa capacité à lutter contre les parasites et les agents pathogènes. La réponse immunitaire apparaît comme un facteur potentiel important pouvant moduler la sénescence (et la subir). Aussi, son dérèglement fait partie des « *hallmarks* » du vieillissement.

L'immunité des insectes peut être décomposée en trois composantes principales : l'immunité cuticulaire, l'immunité hémocœlique, et enfin l'immunité comportementale et sociale (Stroeymeyt et al. 2014; Vigneron et al. 2019). Cette dernière forme d'immunité correspond à tous les changements de comportements, ou à une organisation sociale complexe (Cremer et al. 2007; Stroeymeyt et al. 2014) permettant à certains individus (i.e., la reine (Alciatoire et al. 2021)) d'éviter son exposition à des pathogènes ou de limiter leur croissance (Aanen 2018; Vigneron et al. 2019). Les ouvrières d'une colonie de fourmis peuvent tuer le couvain infecté par des champignons, afin de protéger le reste de la colonie, et notamment la reine, de l'infection fongique. Cette forme d'immunité sociale est analogue au système immunitaire des organismes multicellulaires, où les cellules immunitaires tuent les cellules infectées (Aanen 2018).

Si l'on peut s'attendre à ce que le coût métabolique de l'immunité soit moins important sur le long terme chez les insectes que chez les vertébrés, en raison de l'absence de système immunitaire adaptatif, une réponse immune induite provoque une augmentation du métabolisme au repos chez les individus concernés (Freitak et al. 2003), jusqu'à près de 30% (Ardia et al. 2012). Peut-être la bioénergétique de la reine, notamment sa capacité à maintenir une AEC élevé, est-elle en partie due à un investissement de ressources minimal dans l'immunité ?

### 3. [Un âge biologique visiblement plus bas](#)

#### A. De premières observations microscopiques de marqueurs de sénescence

L'accumulation de lipofuscine est un marqueur cellulaire de la sénescence, qui témoigne d'une mauvaise élimination des mitochondries défectueuses. Nos observations n'ont



concerné qu'un individu de chaque groupe (reine, nourrices et fourrageuses), mais les ouvrières présentaient nettement plus de pigments de lipofuscine. Ce pigment étant autofluorescent (et mesuré de cette manière chez d'autres insectes), des mesures en spectrofluorométrie pourraient être envisageables à l'avenir. D'ailleurs, chez une autre espèce de fourmis, *Polyrhachis sexspinosa* (modèle plus gros tout de même, 25mg), la mesure est discutée en tant que marqueur de l'âge chronologique des individus (corrélation positive présentant un  $r^2$  de 0.78) (Robson and Crozier 2009).

Un autre marqueur de sénescence dont la mesure avait été envisagée est l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, biomarqueur le plus couramment utilisé de la sénescence répllicative des cellules (sert de manifestation de l'activité lysosomale résiduelle, or le contenu lysosomal augmente dans les cellules sénescents (Kurz et al. 2000)). Son augmentation avec l'âge a notamment été montrée chez le modèle arthropode *A. vulgare* (Depeux et al., 2020a). Les mesures sur le cloporte étant faites sur la chaîne nerveuse, il aurait fallu rassembler beaucoup d'individus fourmis pour une seule mesure, et je ne suis pas allée plus loin.

## B. Une dynamique mitochondriale et une régulation énergétique optimisées

Enfin, nous avons mesuré des différences de charge énergétique mitochondriale (AEC). De la Fuente et al. ont proposé de définir sous le terme d'homéorhèse la capacité du système bioénergétique à maintenir des concentrations en nucléotides de l'adénine en des proportions constantes, c'est-à-dire la capacité de réguler les flux du métabolisme en fonction des besoins résultant de l'état physiologique (De la Fuente et al. 2014). Les reines, dont les besoins énergétiques sont moins importants que chez les ouvrières en raison d'un métabolisme plus faible, semblent avoir une homéorhèse plus importante, une meilleure régulation du métabolisme sur le long terme qui se traduit par une dynamique mitochondriale plus importante (i.e., élimination des mitochondries mutantes, mesurée par l'indice circulaire en microscopie), et un meilleur taux de production d'énergie par hydrolyse d'ATP par les ATPases (Rapports ATP/ADP plus importants). Les cellules peuvent alors se permettre un renouvellement plus important de leurs protéines (qui, avec le maintien des gradients de protons, est l'activité la plus énergivore de la cellule, (De la Fuente et al. 2014)).

La *Global Ant Genomics Alliance* (GAGA) est un projet de production d'une banque ouverte de génomes des fourmis du monde. J'ai contacté les chercheurs travaillant sur le projet, et ils m'ont gentiment envoyé la dernière version annotée du génome de *Lasius niger*



en octobre 2022. J'ai pu trouver dans les fichiers des CDS (pour *Complete coding sequence*, les séquences codantes correspondant à l'ADN messager) pour des gènes qui ont été associés à la longévité : FOXO, PKB (=AKT), Rheb, CHICO (voie insuline, (Yan et al. 2022)). En revanche, je n'ai pas trouvé de séquences pour les gènes de fission/fusion mitochondriale que j'aurais aimées mesurer en qPCR, pour compléter les données de microscopie. J'avais lancé en mot clé OPA-1 et tous ses dérivés, ainsi que DRp1 par exemple. Ces données permettraient notamment de confirmer la dynamique des mitochondries des reines par rapport aux ouvrières observée en microscopie. Des western blots sont également envisageables, à condition de rassembler les individus, et d'avoir les anticorps appropriés (Il existe déjà de nombreux articles sur le modèle insectes qui utilisent des anticorps d'autres modèles. Le principal problème ici est le rendement : de mémoire, il faut déposer sur un gel d'électrophorèse au moins 25mg de matériel par puits).

## D'autres mécanismes méritent intérêt

### 1. L'attrition des télomères et l'activité télomérase:

Un autre indicateur de l'âge biologique et de la maintenance somatique qui a un intérêt particulier pour la communauté scientifique est la longueur des télomères (Sanders and Newman 2013). Les télomères sont des régions conservées de l'ADN non codant qui protègent les extrémités des chromosomes (linéaires, pas de télomères chez les bactéries dont l'ADN est circulaire) chez la plupart des animaux (Greider 1991), y compris les insectes (Gomes et al. 2010). A mesure que les cellules se divisent avec l'âge, des séquences des télomères s'érodent progressivement, en raison de la répllication incomplète de l'ADN (Harley et al. 1990) ou du stress oxydant. Ainsi, une attrition rapide des télomères peut coïncider avec une accélération du processus de vieillissement dans de nombreuses espèces, y compris les humains (Harley et al. 1990; Cawthon 2002) et d'autres mammifères, oiseaux et reptiles, où des taux de raccourcissement plus élevés sont corrélés à une durée de vie plus courte (Monaghan and Hausmann 2006; Hausmann and Marchetto 2010; Tricola et al. 2018). Jemielity et al. ont mené l'une des premières études sur la dynamique des télomères chez les insectes, et l'ont faite dans le contexte de la division du travail chez la fourmi *Lasius niger*. Ils ont constaté que les télomères dans les tissus somatiques (tête et thorax) étaient significativement plus longs chez les reines et les ouvrières que chez les mâles, mais aussi que les longueurs des télomères ne différaient pas entre les ouvrières et les reines (Jemielity et al. 2007). Il faut noter par





ailleurs que les reines utilisées ici étaient des reines vierges âgées de 1 à 3 jours, ce qui donne peu d'indications sur l'érosion des télomères en fonction de l'âge chronologique dans cette caste sociale longévive.

La télomérase est une enzyme qui assure le maintien de la longueur des télomères en allongeant les séquences des télomères (Blackburn 1991). Chez la fourmi *Harpegnathos saltator*, une activité télomérase plus importante a été constatée chez les gamergates (Bonasio et al. 2010). Chez les mammifères qui hibernent, on observe un mécanisme de rallongement des télomères après hibernation (Turbill et al. 2013; Giroud et al. 2023). Il a en revanche été montré que l'activité de la télomérase est notamment régulée à la hausse dans les **corps gras** des reines de bourdons en pré-diapause (Koubová et al. 2019) et dans les castes à longue durée de vie des termites, même s'il n'y a pas de différence de longueur des télomères (Koubová et al. 2021). S'il n'y a pas de différence de longueur des télomères entre les castes (Quque 2020; Koubová et al. 2021), une longueur deux fois supérieure à la longueur moyenne chez d'autres insectes a été mesurée : il a alors été suggéré que les télomères longs pouvaient être une pré-adaptation à la vie relativement longue des insectes eusociaux (Koubová et al. 2021). L'un des rôles non canoniques fréquemment rapporté de la télomérase est la réduction du stress oxydant. Cette dernière hypothèse est particulièrement intéressante, car des études ont montré un investissement important dans la compensation du stress oxydant chez les reines termites et les termites en général (Tasaki et al. 2017, 2018), ce qui n'est pas forcément le cas chez d'autres insectes sociaux comme abordé juste avant (Kramer et al. 2021b). Il est intéressant de noter que la télomérase a été colocalisée dans la matrice mitochondriale en réponse à un stress, et que cette colocalisation conduit à une amélioration de la protection antioxydante (Ahmed et al. 2008) et du fonctionnement mitochondrial en termes de production de ROS (Singhapol 2013). Il reste à déterminer si les mitochondries des reines bénéficient spécifiquement de ce type d'association

## 2. [La diapause](#)

La diapause représente une phase de dormance physiologique cruciale développée par de nombreux insectes pour survivre dans des conditions environnementales défavorables, telle que la froidure de l'hiver (Tatar and Yin 2001). Elle peut survenir à n'importe quelle étape de la vie de l'insecte : œuf, larve, pupa ou adulte, et la suppression métabolique varie d'une

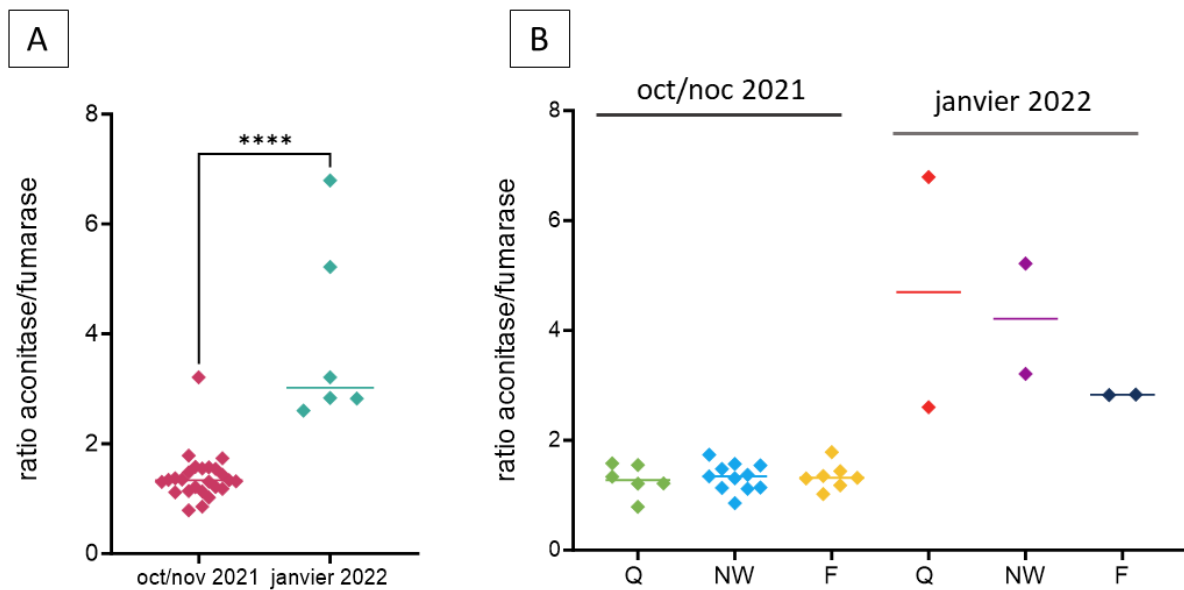


diminution de l'activité (adulte) à un arrêt complet du développement (diapause pendant le développement, (Kipyatkov and Lopatina 2009; Ferreira Santos et al. 2019)).

De par leur incroyable longévité, les reines fourmis connaissent plusieurs diapauses au cours de leur vie, et l'on peut se demander si certains mécanismes de maintenance somatique se mettent en place durant cette période. Il a notamment été montré sur une autre espèce eusociale, le bourdon *Bombus terrestris*, que l'activité de la télomérase était augmentée dans le corps gras des reines en pré-diapause, et que cette hausse était associée à une synthèse accrue de l'ADN, dans le but de constituer des réserves énergétiques avant diapause (Koubová et al. 2019). Des mesures des télomères et de la télomérase ont été réalisées sur *Lasius niger*, mais sur de jeunes fourmis, ouvrières et reines (Jemielity et al. 2007). La dynamique des télomères sur l'année n'a pas été étudiée.

Au laboratoire, les mesures de respiration ont été effectuées fin d'année 2021. Quelques colonies ont été sorties de diapause en début d'année suivante pour faire de nouvelles mesures. A cette occasion, le dosage des ratios aconitase/fumarase a été effectué (Figure 1), et ces derniers étaient significativement plus importants sur les nouvelles mesures (Mann–Whitney  $U = 3,500$ ,  $P < 0,05$  two-tailed).





**Figure 1** : mesures du ratio aconitase/fumarase effectuées avant et en sortie prématurée de diapause (A). Ces mêmes mesures sont présentées selon la caste correspondant (B).

Seuls les ratios des activités mesurées (rapportées au volume d'un même puits de plaque) ont été effectués, la quantification/normalisation par les protéines de l'extrait n'ayant pas été faite. Cette première mesure (sur deux points uniquement par groupe) tend vers une augmentation pour chaque caste, mais de manière moins importante dans le cas des fourrageuses, ce qui pourrait suggérer une maintenance somatique moins importante dans cette classe d'ouvrières. Seulement, un ralentissement du métabolisme intermédiaire peut s'accompagner de modification de fonctionnement des enzymes du cycle de Krebs (Lubawy et al. 2022). Il serait intéressant de compléter les résultats sur le stress et la maintenance cellulaire par des mesures en cours/sortie de diapause. Peut-être les reprogrammations métaboliques sont-elles moins efficaces chez les ouvrières vieillissantes ?

### 3. Epigénétique, épissage alternatif et éléments transposables

L'épissage alternatif forme également un élément explicatif de la longévité des reines et de leur fonctionnement mitochondrial particulier. Nos données de protéomique ont notamment montré que certaines isoformes protéiques étaient spécifiquement retrouvées



dans une caste donnée, suggérant que certaines formes sont donc associées à un phénotype longévif, peut être via une stabilité des protéines accrue. Il a d'ailleurs été montré chez *Apis* et chez deux espèces de *Lasius* que le traitement des ouvrières par les phéromones de la reine provoquait des changements statistiquement significatifs dans l'épissage alternatif de multiples loci, augmentant l'expression de certaines isoformes tout en inhibant d'autres (Holman et al. 2019). Une analyse en détails des séquences en acides aminés des isoformes chez les reines serait également extrêmement informative, étant donné que cette composition semble être différente entre les protéines impliquées dans la régulation du vieillissement, et celles qui ne le sont pas (Szatmári et al. 2023).

Toutes ces analyses visant à compléter notre étude initiale de bioénergétique demandent notamment le développement d'une approche interspécifique, afin de comparer des espèces non seulement en fonction de leurs différentes longévités, mais aussi en tenant compte des longévités de leurs castes reproductrices (reines ou gamergates) et non-reproductrices (ouvrières).

#### [4. Un premier test de mesures de la ventilation chez deux espèces de fourmis](#)

De nombreux insectes peuvent moduler leur ventilation en ouvrant et fermant leurs spiracles, ce qui leur permet de pratiquer une respiration discontinue (DGC). Comme mentionné dans l'introduction, plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène, dont celle suggérant que le DGC contribuerait à limiter les dommages oxydants (Contreras and Bradley 2009). Cette hypothèse est particulièrement intéressante car elle s'inscrit dans le cadre de la théorie radicalaire.

J'ai eu l'occasion de réaliser des tests de respiration sur quelques fourmis (*Lasius niger* et *Formica rufibarbis*) au laboratoire Ecobio à Rennes, en utilisant un système de mesure multiplexé permettant de mesurer le métabolisme et l'activité locomotrice de plusieurs fourmis simultanément (Figure 2). Le système, placé dans une salle régulée à  $20^{\circ}\text{C} \pm 1$ , était composé d'un analyseur différentiel de  $\text{CO}_2$  (Li-Cor7000), d'un système de gestion de flux à 16 canaux, et d'un système de traitement de signal (MAVEN™, Sable Systems, International, North Las Vegas, NV, USA).



Après quelques essais sur l'appareillage, une série de mesures a été réalisée avec un flux de  $40 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 500s d'enregistrement pour les ouvrières, 40 minutes pour les reines. Deux extrémités connectées de capillaires dans lesquelles passaient le flux de gaz ont servi de ligne de base. Les valeurs mesurées sont données dans les tableaux 1 et 2. Les valeurs obtenues ont été ajustées en utilisant les coefficients allométriques calculés dans le chapitre 1, soit 0,6492 pour les ouvrières, 1,039 pour les reines.



**Figure 2** : système de chambres multiplexées de  $2,4 \text{ cm}^3$  (MAVEN™). Une reine *Lasius niger* est indiquée par la flèche orange.



**Tableau 1 :** mesures du métabolisme d'ouvrières *L niger* (2 runs de 500s par individu). La couleur verte indique une respiration cyclique pendant l'enregistrement, la couleur bleue une respiration discontinue et la grise une respiration continue. Les cellules en rose n'ont pas été retenues car aucun ou un seul pic de CO<sub>2</sub> a été enregistré sur les 500s d'enregistrement.

chambre	espèce	caste	colonie	masse (mg)	μL.ind.h-1.m-0,65 n°1	μL.ind.h-1.m-0,65 n°2
1	L niger	fourageuse	C	0,666	2,558669087	2,908572236
2	L niger	fourageuse	D	0,653	0,951517418	0,790971393
3	L niger	fourageuse	D	0,627	1,083399293	2,116837858
4	L niger	fourageuse	D	0,726	1,423831391	2,292534278
5	L niger	nest-worker	D	0,928	0,825885063	
6	L niger	callow	D	0,647	0,210123577	3,5796715
7	L niger	nest-worker	D	1,0006	1,957999764	3,332888119
8	chambre vide pour normaliser les mesures d'activité					
9	L niger	fourageuse	A	0,405	1,436488719	4,411554161
10	L niger	fourageuse	A	0,71	1,841494095	4,90961367
11	L niger	nest-worker	A	0,617	2,735897135	4,169554927
12	L niger	nest-worker	D	0,871	0,492149514	5,411532667
13	L niger	nest-worker	D	0,749	-0,046539001	#NOMBRE!

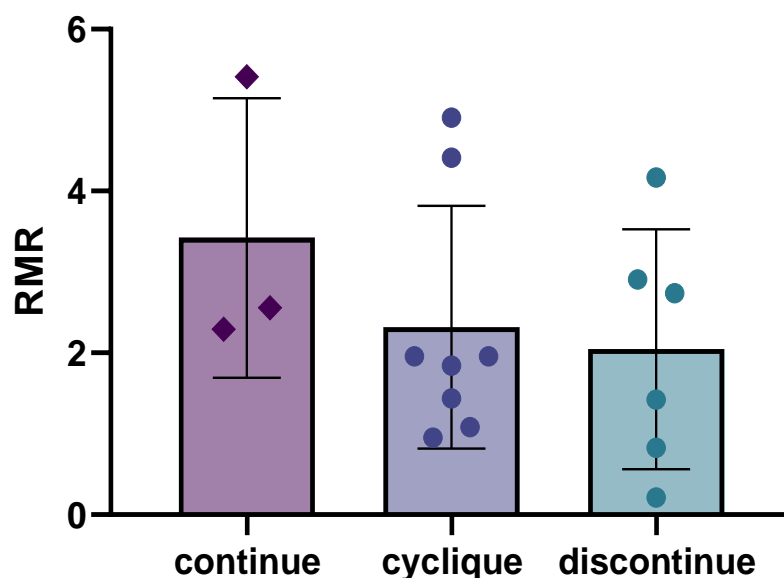
**Tableau 2 :** mesures du métabolisme des reines *L niger* (sur 40 min)

	masse (mg)	μL.h-1.mg-1,039	nombre bursts
Q1	20,93	0,357972523	10
Q2	24,706	0,874349888	16
Q3	16,555	0,986823007	28
Q4	31,472	0,699455198	5
Q5	22,24	1,074669736	6
Q6	25,768	0,510331617	36



Les mesures de respiration sur ce système ont été faites dans le but de faire (i) des premiers enregistrements de respiration discontinue sur les ouvrières *Lasius niger*, (ii) des premières corrélations entre l'activité locomotrice et les profils respiratoires, sachant que les DGC sont plus susceptibles de se produire pendant des périodes de faible taux métabolique : inactivité, basses températures ou diapause (Gibbs and Johnson 2004; Bradley 2007; Contreras and Bradley 2009). A cela se serait ajoutée la comparaison interspécifique présentée juste après, en émettant l'hypothèse que les reines les plus longévives ventilent davantage de manière discontinue que les reines les moins longévives, et ont un métabolisme plus faible ; résultats à associer avec les ratios aconitase/fumarase plus faibles également (stress oxydant).

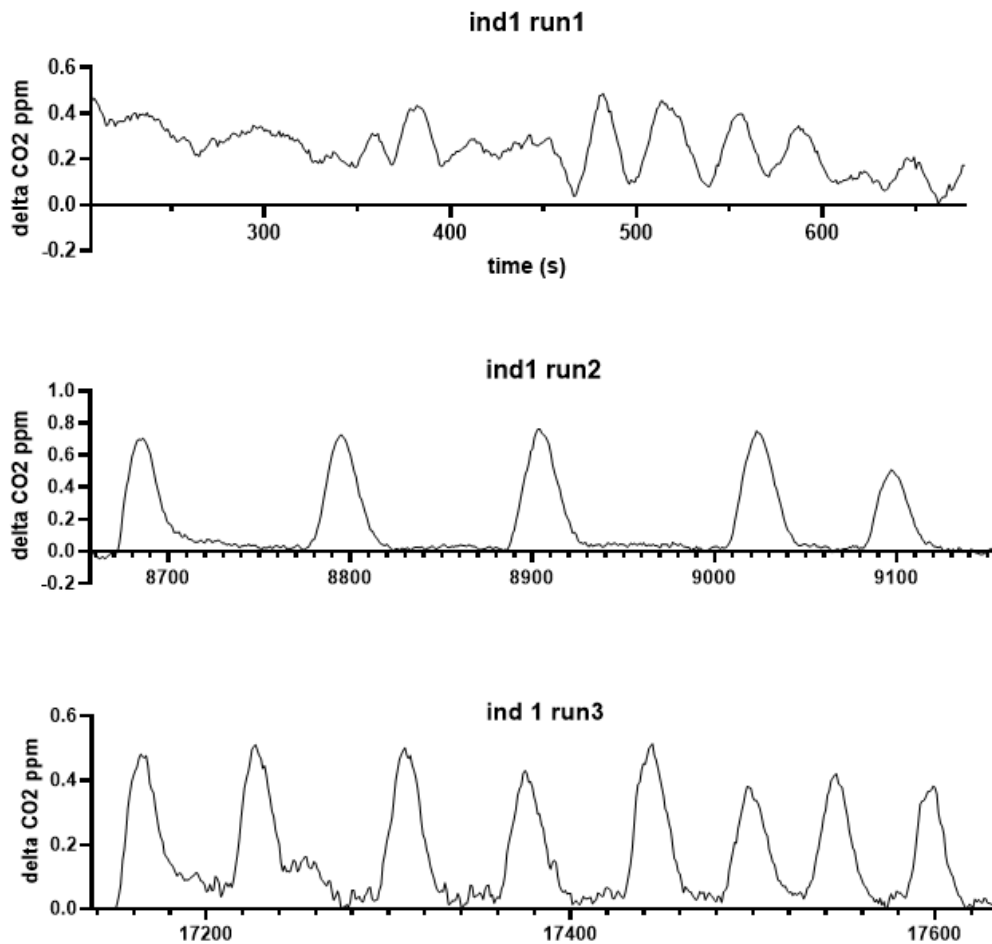
Malheureusement, le dispositif de mesure des déplacements (capteurs infrarouges) n'a pas fonctionné, la moitié des valeurs obtenues étant négatives. Pour des questions d'emploi du temps, les mesures ne se sont pas poursuivies sur l'appareil. Néanmoins, les enregistrements effectués sur les ouvrières permettent de comparer les taux métaboliques au repos (RMR pour resting metabolic rate) obtenus selon les profils ventilatoires (Figure 3).



**Figure 3 :** comparaison des taux métaboliques au repos (RMR) obtenus chez les ouvrières *Lasius niger* selon le type de ventilation observé.



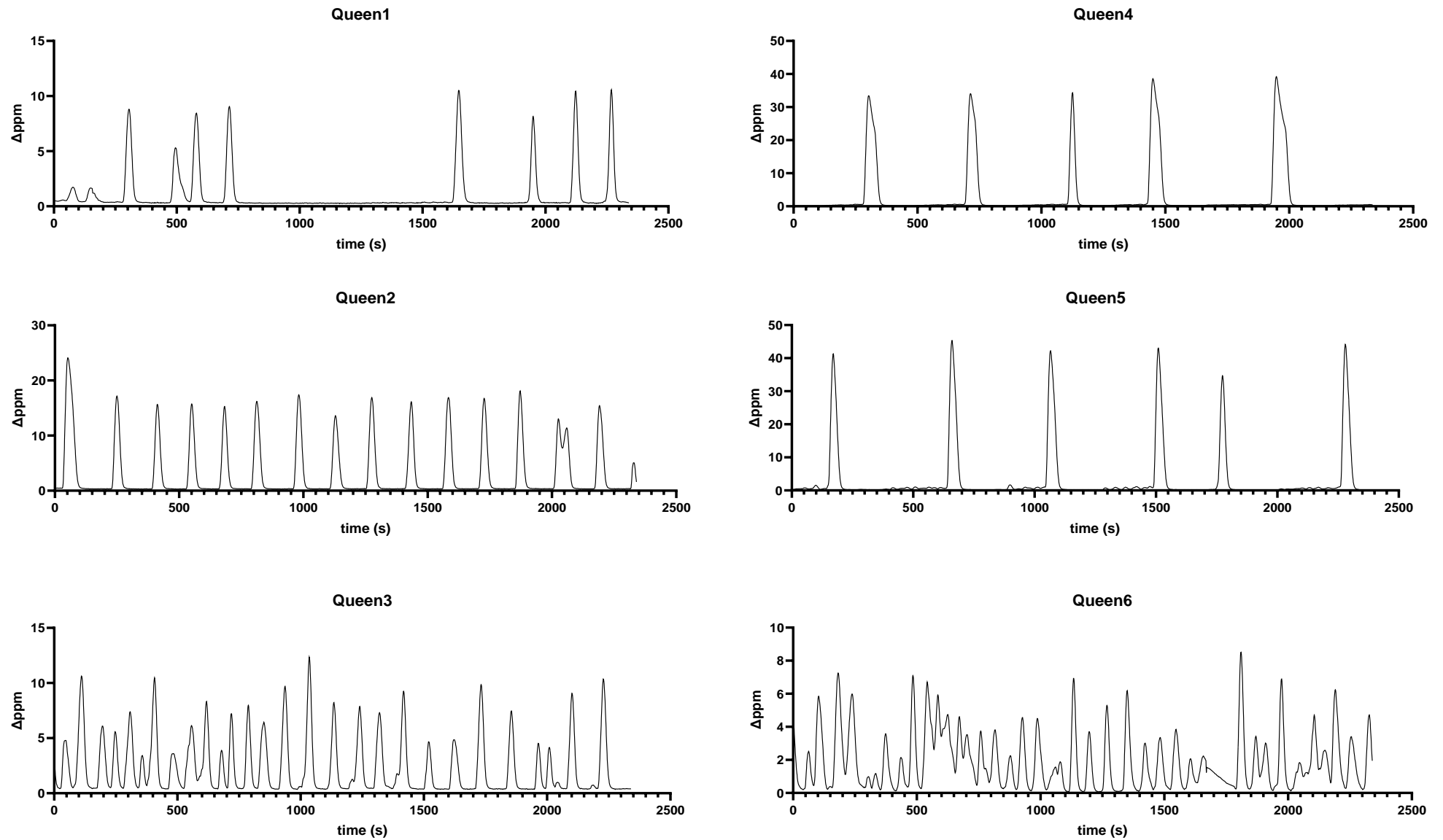
Il n'y a pas de différence entre les trois types de ventilation (test de Kruskal-Wallis, test  $H=1,983$ ,  $P < 0.05$ ), même si l'on devine une tendance plus importante de la ventilation continue. NB : des enregistrements sont présentés à titre d'exemples Figures 4 et 5.



**Figure 4 :** mesures de respirométrie ( $\text{CO}_2$ ) sur ouvrières *Lasius niger*. Le  $\Delta\text{CO}_2$  ppm correspond à la différence mesurée entre la ligne de base et la chambre occupée. Les 3 types de ventilation ont été observés sur un même individu (de haut en bas) : continue, discontinue et cyclique.







**Figure 5 :** mesures de respirométrie (CO<sub>2</sub>) sur des reines, runs de 40 minutes. Les reines (queen) 1 à 3 appartiennent à l'espèce *Lasius niger*, les reines 4 à 6 sont des *Formica rufibarbis*. Le  $\Delta\text{ppm}$  correspond à la différence mesurée entre la ligne de base et la chambre occupée.



## Une comparaison interspécifique de fonctionnements mitochondriaux sur deux espèces de fourmis

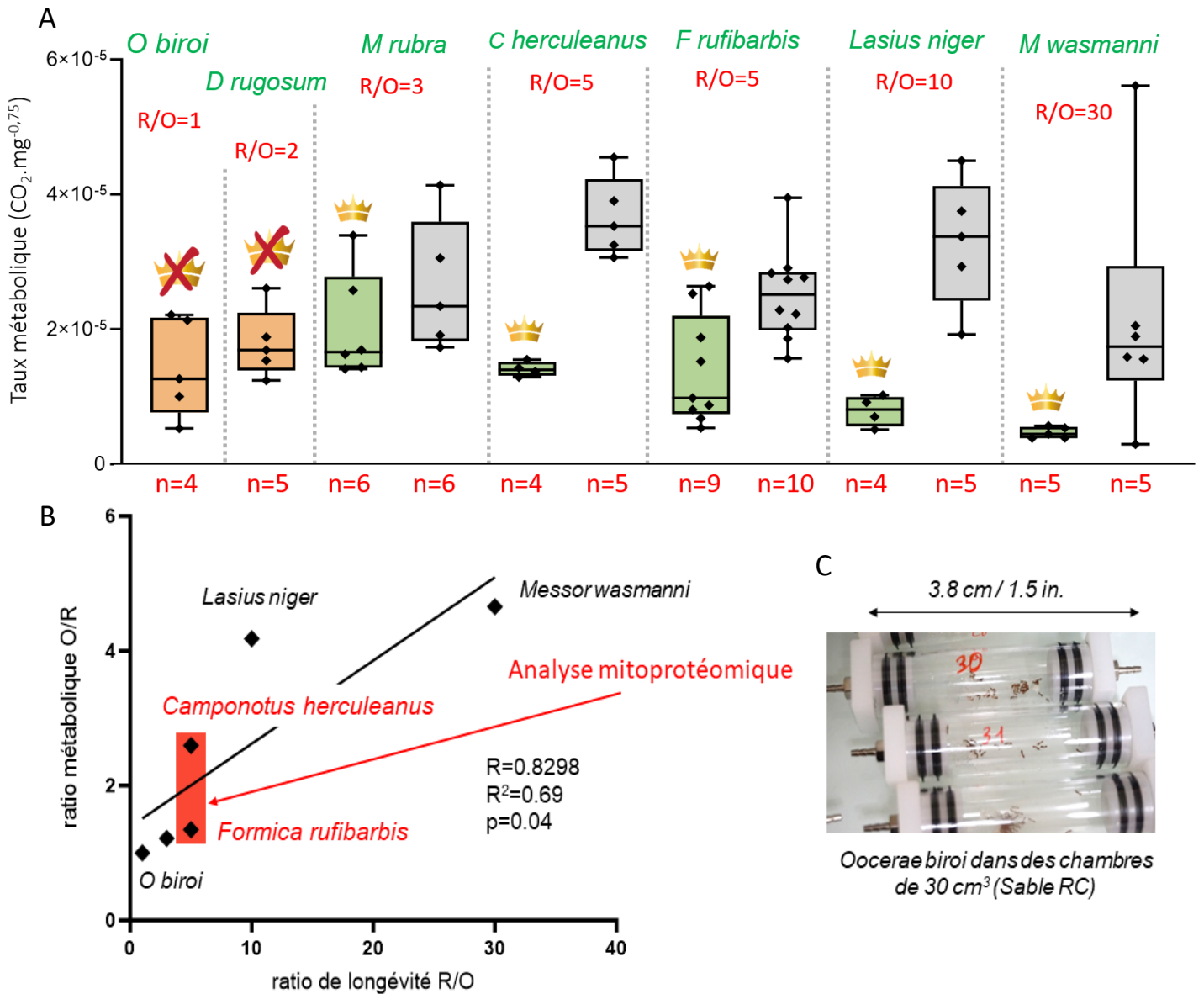
Comme nous l'avons déjà vu, les sociétés eusociales de fourmis ont co-évolué avec les extraordinaires longévités des reines, dans les espèces où la division du travail a largement séparé les individus en castes, aux rôles sociaux différents (la caste des reines étant spécialisée dans la reproduction). Cependant, les insectes sociaux ont développé une grande diversité d'organisations sociales, et les espèces se répartissent sur un continuum de socialités (Sherman et al. 1995; Libbrecht et al. 2013), allant des véritables sociétés eusociales (comme *Lasius niger*) aux systèmes coloniaux moins organisés (avec plusieurs reines ou des ouvrières reproductrices, jusqu'à des individus indifférenciables entre eux se reproduisant par division clonale comme par exemple *Oocera biroï*).

En nous basant sur les résultats obtenus sur *Lasius niger*, nous avons émis l'hypothèse que le fonctionnement mitochondrial serait moins différent entre les castes dans les espèces où l'organisation sociale est moins développée que dans les espèces eusociales. Dans cette partie, nous avons donc décidé de mener une première étude exploratoire sur la bioénergétique des mitochondries des espèces suivantes (avec R/O le ratio de longévité reine/ouvrières) : *Camponotus herculeanus* (R/O=5) ; *Linepithema humile* (R/O=3) ; *Myrmica rubra* (R/O=3) ; *Messor wasmanni* (R/O=30) ; *Diacamma rugosum* (R/O=2) ; *Ooceraea biroï* (R/O=1, reproduction clonale), *Lasius niger* (R/O=10) et *Formica rufibarbis* (R/O=10). Bien que les données aient été toutes collectées, l'analyse de celles-ci est encore en cours.

### 5. Mesures de respirométrie

Le protocole de mesure des taux métaboliques des fourmis est le même que celui suivi sur la même machine dans le chapitre 1. Les mesures se sont étalées sur 3 jours. Les fourmis ont été placées dans les chambre pendant 24h, et, ici, le système de détection des mouvements n'a pas été exploité (Figure 6). Notons que le coefficient allométrique utilisé est de 0,75 (loi des  $\frac{3}{4}$  de l'allométrie utilisée pour un premier traitement rapide des données). Les valeurs seront ajustées avec les coefficients calculés depuis dans le chapitre 1 (0,6492 pour les ouvrières, 1,039 pour les reines).





**Figure 6** : mesure du taux métabolique de repos (sur 24h) de différentes espèces de fourmis (nom en vert), ayant des différences de longévité reines/ouvrières contrastées (ratio R/O en rouge). Les espèces sans reine sont en orange avec une couronne barrée, les reines sont en vert avec une couronne, les ouvrières en gris (A). Les ratios métaboliques calculés ont été exprimés en fonctions des ratios de longévité. Deux espèces ont été sélectionnées pour les analyses de protéomique mitochondriale (B).



NB : Les ratios utilisés par défaut pour *Oocera biroï* sont de 1, car chez cette eusociale primitive, toutes se reproduisent par division clonale.

Nos premiers résultats montrent une corrélation entre le ratio métabolique reine/ouvrière, et le ratio de longévité (corrélation de Pearson  $R=0,8298$ ) sur six premiers points (*Diacamma rugosom* n'a pas été gardée pour les statistiques car l'espèce eusociale primitive ne compte qu'une dominante se reproduisant, une gamergate. Or, sur trois colonies commandées en Europe et en Thaïlande, aucune gamergate n'est arrivée vivante au laboratoire). *Myrmica rubra* (Myrmicinae, espèce avec une caste de soldats) et *Lasius niger* (Formicinae), présentent le plus de différences de longévité et de métabolisme entre les caste reine/ouvrières.

## 6. Isolation des mitochondries de deux espèces

En complément de ces données basées sur des mesures de respiration, nous avons également ciblé les différences de compositions protéiques mitochondriales (comme effectuée pour *Lasius niger* dans le chapitre 2). Parmi les espèces sélectionnées pour les mesures, deux ont été choisies pour des analyses de mitoprotéomique : *Camponotus herculeanus* et *Formica rufibarbis*. Il s'agissait du meilleur compromis en termes de quantités de matériel et de disponibilité de séquences chez des espèces très proches : des banques de séquences *Formica excseta*, *Camponotus floridanus* et *Lasius niger* ont été compilées pour l'identification des protéines.

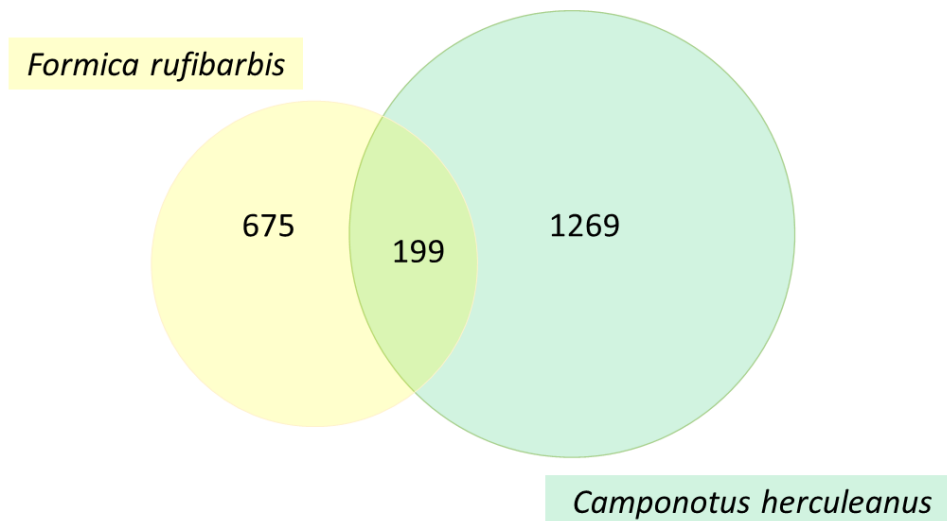
L'isolation des mitochondries a été effectuée comme suit :

- Broyage de 2 reines/pool d'ouvrières dans un Potter Elvehjem contenant 900 $\mu$ L de tampon d'isolation (300 mM sucrose, 5 mM Tris, 1 mM EGTA), + Nagarse 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> (3 allers-retours).
- Ajout de 900  $\mu$ L supplémentaires de tampon au Potter pour une seconde homogénéisation, plus délicate.
- Centrifugation à 4°C, 10 000 g 10 min, avant élimination du surnageant.
- Resuspension du culot et centrifugation 1000 g, 4°C avant récupération du surnageant (X2)
- Centrifugation 10 000 g et élimination du surnageant
- Rinçage du culot dans 500  $\mu$ L de tampon, puis centrifugation 10 000 g
- Resuspension du culot dans 60  $\mu$ L de tampon d'isolation (tube placé au -80°C)



Les pré-résultats sont présentés dans la box 1. 1269 protéines ont été identifiées, au total, chez *Camponotus herculeanus*, 675 chez *Formica rufibarbis*. Sur 199 protéines identifiées en commun aux deux espèces, aucune n'est une protéine mitochondriale. En revanche, d'autres protéines sont différenciellement retrouvées selon la caste (cellules rouges sur les heatmap de la box), 9 et 21 protéines spécifiquement. Les listes de ces protéines ne sont pas encore triées, mais là encore, aucune de ces protéines n'est en commun aux deux espèces.

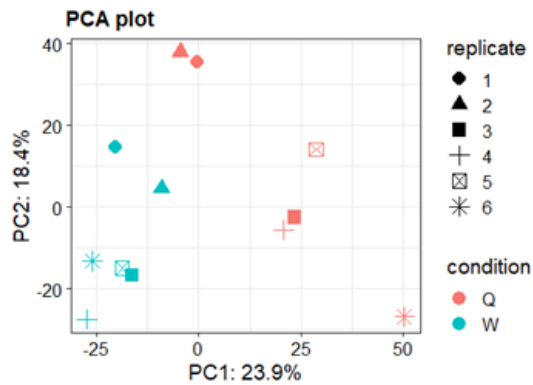
A partir de ces premiers résultats, nous ne parvenons pas à expliquer via les protéines mitochondriales les différences de taux métaboliques entre reines et ouvrières.



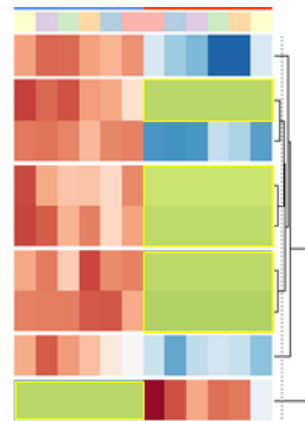
**Figure 7:** diagramme de Venn montrant les protéines identifiées dans les enrichissements mitochondriaux de *Formica rufibarbis* et *Camponotus herculeanus*



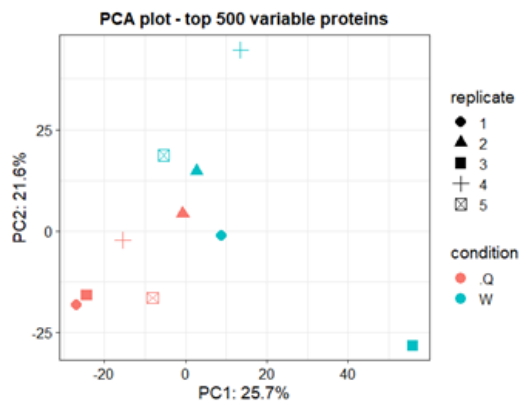
### *Camponotus herculeanus*



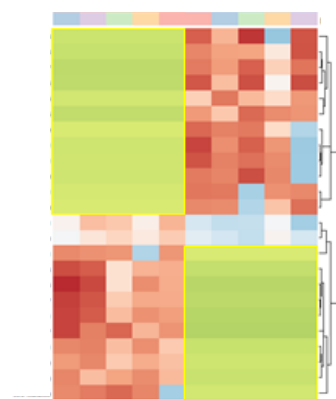
ouvrières reines



### *Formica rufibarbis*



ouvrières reines



Box 1 : Résultats des analyses de protéomique, sur mitochondries de *Camponotus herculeanus* et *Formica rufibarbis*. ACP obtenues sur l'ensemble des protéines identifiées (mitochondriales comme non mitochondriales, rappelons qu'une isolation de mitochondries est en réalité un enrichissement en protéines mitochondriales), sur la droite : protéines dont le Fold Change est sorti significatif à 5%. Chaque colonne correspond à un échantillon. Plus la couleur d'une case est rouge, plus la protéine est présente relativement à l'autre caste. Les protéines, lorsqu'absentes d'une caste, sont indiquées en jaune (MNAR). L'imputation des MNAR, ou missing values not at random, s'est faite par la plus petite valeur d'intensité mesurée dans chaque jeu de données.



## Conclusion sur les mesures de bioénergétique

Les histoires de vie des animaux sont façonnées par la manière dont leur métabolisme énergétique distribue l'énergie, influençant ainsi les traits qui définissent leur forme physique, leur rythme de vie et leur adaptation à l'environnement. Traditionnellement, le taux métabolique est estimé par la mesure de la consommation en oxygène à l'échelle de l'organisme entier (Burton et al. 2011; Glazier 2015), fournissant une base puissante pour comprendre la variation de la performance individuelle, du taux de croissance des populations et de la structure des communautés.

Cependant, la respiration au niveau de l'organisme entier dérive finalement de l'écoulement d'énergie au niveau subcellulaire. En ce sens, **les mitochondries** jouent un rôle central dans la respiration aérobie, étant donné qu'elles représentent 90% de la consommation en oxygène d'un organisme, et que les oxydations phosphorylantes ayant lieu au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale sont responsables de 90% de la synthèse d'ATP (Rolfe and Brand 1997; Rich 2003).

La variabilité dans l'efficacité de la production d'ATP par l'organite, la production de ROS et de chaleur associées peuvent avoir des conséquences significatives sur la performance et la condition physique des organismes (Koch et al. 2021). En effet, bien que la production d'ATP dépende du taux d'oxydation, le nombre de molécules d'ATP produites pour chaque atome d'oxygène consommé par les mitochondries, appelé rapport P/O, peut varier (Brand 2005), en fonction notamment des substrats utilisés dans les oxydations phosphorylantes, ou encore de l'efficacité de l'ATP synthase, qui va dépendre (Salin et al. 2015).

Chez les insectes sociaux, les traits d'histoire de vie montrent des différences marquées entre les castes, notamment entre les reines et les ouvrières, malgré leurs génomes très proches (Lopez-Vaamonde et al. 2009; Negróni et al. 2021). Ces différences peuvent être directement liées à la variabilité mitochondriale et à la manière dont les compromis énergétiques sont gérés à différents niveaux de l'organisation biologique.

Le modèle choisi dans cette thèse pour explorer ces différences fut *Lasius niger*. Malheureusement, l'isolation de mitochondries sur cet insecte social s'est révélée hasardeuse. Difficile alors de comparer des valeurs de P/O ou de RCR (rapport de la respiration mitochondriale soutenant la synthèse d'ATP à celle nécessaire pour compenser la fuite de



protons), ou de faire des mesures de production de ROS. Les quelques tentatives de mesures sur tissus spécifiques ne se sont pas révélées plus efficaces.

La bioénergétique de la fourmi a donc été explorée par des mesures (i) de consommation en O<sub>2</sub> ou de production de CO<sub>2</sub> (sans pouvoir faire les deux mesures conjointement et calculer les quotients respiratoires), (ii) de molécules énergétiques (ATP/ADP/AMP), (iii) d'activités enzymatiques témoins du stress oxydant ou de l'investissement dans la neutralisation des ROS.

La charge énergétique en adénylate (AEC), l'énergie métabolique potentielle stockée par l'organisme, s'est révélée supérieure dans la caste royale, ce qui veut dire que les reines sont dans un état métabolique plus favorable. De cette valeur est extrait le ratio ATP/ADP, qui témoigne d'une plus grande libération d'énergie associée à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (énergie de Gibbs). Enfin, nous avons constaté chez les reines une plus grande concentration en inosine. Or, l'inosine fait partie de la voie de recyclage des purines, qui permet à la cellule de recycler les bases puriques et les nucléosides, économisant ainsi l'énergie et les ressources nécessaires pour la synthèse *de novo* des nucléotides (Srinivasan et al. 2021). Elle ne nécessite que 2 ATP pour un nucléotide formé, contre 6 pour la voie *de novo*, et est prédominante dans les tissus à forte demande énergétique, comme le cœur et le cerveau (Ipata et al. 2011).

Actuellement, la majorité des études en biologie évolutive utilisent des mesures comme le ratio ATP/O pour évaluer la fonction mitochondriale. Plusieurs autres pistes mériteraient d'être explorées. Par exemple, nous pourrions examiner si des mitochondries mieux chargées en ATP sont également associées à des niveaux plus élevés d'inosine et, dans ce cas, si elles possèdent aussi une plus grande quantité de coenzymes réduits comme le NADH. Cela ouvrirait des perspectives sur le rôle multifonctionnel de la mitochondrie, qui ne se limite pas à la production d'ATP mais implique également un investissement accru dans la production de biomolécules synthétisées à partir des coenzymes réduits ou de l'inosine, influençant ainsi le vieillissement.

L'hypothèse sous-jacente est que les individus ayant une meilleure condition physique (fitness) sont ceux qui produisent plus d'ATP avec moins d'oxygène et moins de ROS, comme observé chez les reines de fourmis. Cela soulève deux questions importantes :

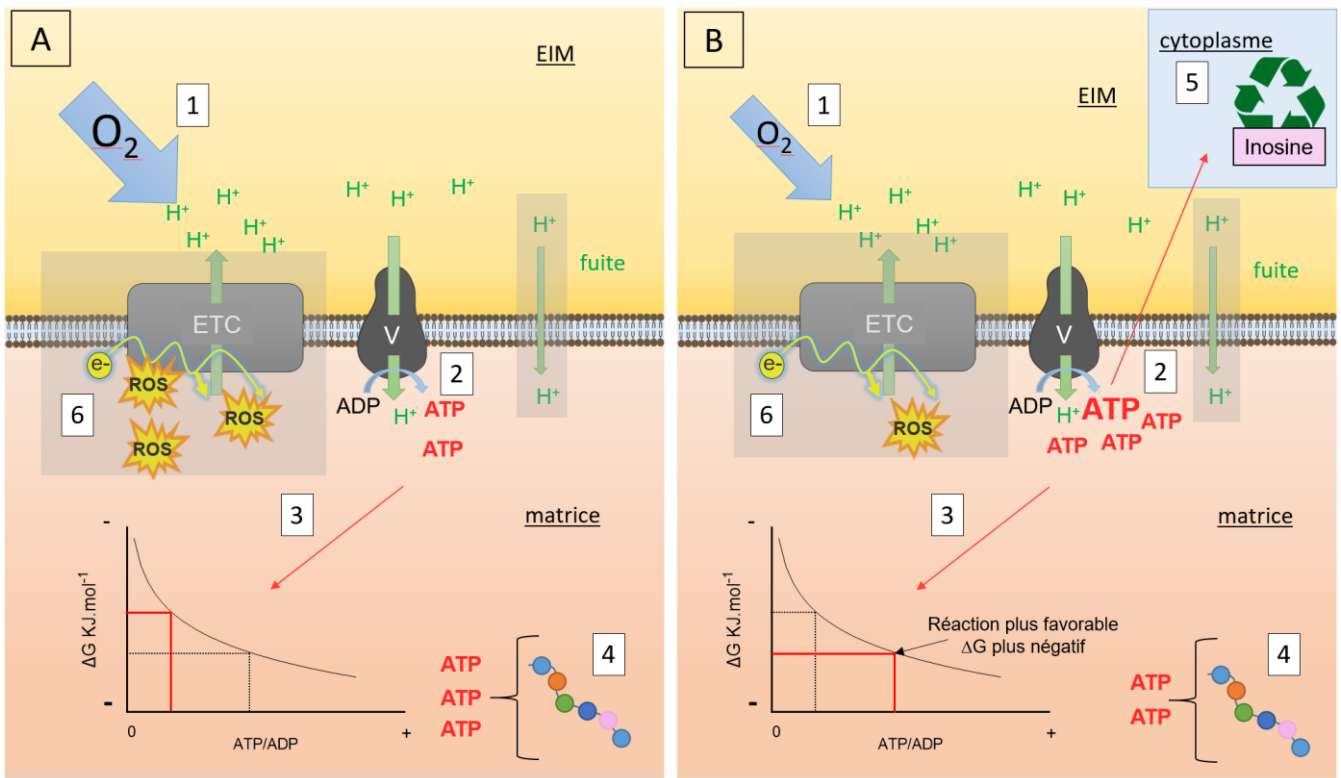




1. Les reines des fourmis sont-elles vraiment plus efficaces et représentent-elles des « super individus » en termes de production d'ATP par quantité d'O<sub>2</sub> consommée ou de ROS produits ?
2. Si nous répétons nos mesures sur d'autres modèles, pourrions-nous démontrer que certaines voies métaboliques anti-vieillessement sont mieux alimentées par les coenzymes réduits ou l'inosine, et cela expliquerait-il les différences interindividuelles?

En conclusion, explorer ces nouvelles avenues pourrait non seulement enrichir notre compréhension de la bioénergétique mitochondriale, mais aussi révéler des mécanismes métaboliques cruciaux pour la longévité et la santé.





**Figure 7:** Bilan de l'état de charge - comparaison d'une ouvrière (A) et d'une reine (B).

Les mesures de respiration ont montré que les reines avaient un métabolisme plus faibles que les ouvrières, elles consomment moins d'O<sub>2</sub> par unité de masse corporelle **1**. Les mesures d'AEC et ATP/ADP ont montré que les reines sont mieux chargées d'un point de vue énergétique (sans pour autant que les ouvrières soient dans un état de stress métabolique) **2**. L'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP est donc plus importante ( $\Delta G$  plus négative) **3**, ce qui permet, pour la synthèse d'une même biomolécule, de consommer *in fine* moins d'ATP **4**. La voie de recyclage des purines (avec ici la mesure de l'inosine) permet également d'économiser 4 ATP par nucléotide produit par rapport à la voie *de novo* **5**. Le point **6**, grisé, n'a pas fait l'objet de mesures, l'isolation de mitochondries de fourmis n'ayant pas fonctionné. Les reines produisent-elles plus d'ATP, et produisent-elles moins de ROS par unité d'oxygène consommée ?

EIM : espace intermembranaire.

## Le stress oxydant occupe-t-il réellement une place centrale ?

Tout au long de cette thèse, nous avons considéré, en accord avec la théorie radicalire du vieillissement, que la mitochondrie était la source principale des ROS, en lien avec le taux de dépense énergétique. Nos résultats montrent que d'autres aspects bioénergétiques sont d'importance pour la définition de la longévité (e.g. AEC). Dans le même contexte de remise en question du rôle mitochondrial dans le vieillissement, nous ne devons pas considérer que la mitochondrie n'est pas nécessairement la première productrice de ROS dans la cellule. La multiplicité des producteurs de ROS à l'intérieur d'une cellule et l'équipement important des mitochondries en enzymes antioxydantes soulèvent une vision alternative du rôle joué par l'organite dans les compromis évolutifs. Néanmoins, notre compréhension de l'implication des mitochondries en tant qu'organites tamponnant les ROS et des producteurs de ROS non mitochondriaux en tant que modulateurs des compromis n'en est qu'à ses balbutiements. Nous proposons pour conclure ce manuscrit une discussion sur le rôle jusqu'à présent négligé des ROS mitochondriales en tant que molécules de signalisation cellulaire plus que sources de dommages aux biomolécules, des mitochondries en tant qu'organelles protectrices face aux ROS produits sur d'autres sites cellulaires, et enfin dans l'utilisation de cette hypothèse pour l'étude des traits d'histoire de vie et de leur évolution.

## Références

Aanen DK (2018) Social Immunity: The Disposable Individual. *Curr Biol* 28:R322–R324.

Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, et al (2008) Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J Cell Sci* 121:1046–1053.

Alciato G, Ugelvig LV, Frank E, et al (2021) Immune challenges increase network centrality in a queenless ant. *Proc Biol Sci* 288:20211456.

Ardia DR, Gantz JE, Brent C., et al (2012) Costs of immunity in insects: an induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity. *Funct Ecol* 26:732–739.

Blackburn EH (1991) Structure and function of telomeres. *Nature* 350:569–573.

Bonasio R, Zhang G, Ye C, et al (2010) Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Science* 329:1068–1071.



Bradley TJ (2007) Control of the respiratory pattern in insects. *Adv Exp Med Biol* 618:211–220.

Brand MD (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem Soc Trans* 33:897–904.

Brown GC, Borutaite V (2012) There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion* 12:1–4.

Burton T, Killen SS, Armstrong JD, Metcalfe NB (2011) What causes intraspecific variation in resting metabolic rate and what are its ecological consequences? *Proc R Soc B Biol Sci* 278:3465–3473.

Calabi P, Porter SD (1989) Worker longevity in the fire ant *Solenopsis invicta*: Ergonomic considerations of correlations between temperature, size and metabolic rates. *J Insect Physiol* 35:643–649.

Cawthon RM (2002) Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e47–e47.

Contreras H, Bradley TJ (2009) Metabolic rate controls respiratory pattern in insects. *J Exp Biol* 212:424–8.

Corona M, Velarde RA, Remolina S, et al (2007) Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7128–7133.

Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P (2007) Social Immunity. *Curr Biol* 17:R693–R702.

De la Fuente IM, Cortés JM, Valero E, et al (2014) On the Dynamics of the Adenylate Energy System: Homeorhesis vs Homeostasis. *PLoS ONE* 9:e108676.

Dobson FS (2007) A lifestyle view of life-history evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17565–17566.

Duan M, Tu J, Lu Z (2018) Recent Advances in Detecting Mitochondrial DNA Heteroplasmic Variations. *Molecules* 23:323.

Elorza AA, Soffia JP (2021) mtDNA Heteroplasmy at the Core of Aging-Associated Heart Failure. An Integrative View of OXPHOS and Mitochondrial Life Cycle in Cardiac Mitochondrial Physiology. *Front Cell Dev Biol* 9:625020.

Ferreira Santos P, Arias M, Kapheim K (2019) Loss of Developmental Diapause as Prerequisite for Social Evolution in Bees. *Biol Lett* 15:1–7.

Freitak D, Ots I, Vanatoa A, Hörak P (2003) Immune Response Is Energetically Costly in White Cabbage Butterfly Pupae. *Proc Biol Sci* 270:S220–S222

Gibbs AG, Johnson RA (2004) The role of discontinuous gas exchange in insects: the chthonic hypothesis does not hold water. *J Exp Biol* 207:3477–3482.



Giroud S, Ragger M-T, Baille A, et al (2023) Food availability positively affects the survival and somatic maintenance of hibernating garden dormice (*Eliomys quercinus*). *Front Zool* 20:19.

Glazier DS (2015) Is metabolic rate a universal “pacemaker” for biological processes? *Biol Rev Camb Philos Soc* 90:377–407.

Gomes NMV, Shay JW, Wright WE (2010) Telomere biology in Metazoa. *FEBS Lett* 584:3741–3751.

Greider CW (1991) Telomeres. *Curr Opin Cell Biol* 3:444–451.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458–460.

Hausmann MF, Marchetto NM (2010) Telomeres: Linking stress and survival, ecology and evolution. *Curr Zool* 56:714–727.

Heinze J, Frohschammer S, Bernadou A (2013) Queen life-span and total reproductive success are positively associated in the ant *Cardiocondyla cf. kagutsuchi*. *Behav Ecol Sociobiol* 67:1555–1562.

Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M (2018) Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* 28:436–453.

Holman L, Helanterä H, Trontti K, Mikheyev AS (2019) Comparative transcriptomics of social insect queen pheromones. *Nat Commun* 10:1593.

Ipata PL, Camici M, Micheli V, Tozz MG (2011) Metabolic network of nucleosides in the brain. *Curr Top Med Chem* 11:909–922.

Jemielity S, Chapuisat M, Parker JD, Keller L (2005) Long live the queen: studying aging in social insects. *Age* 27:241–248.

Jemielity S, Kimura M, Parker KM, et al (2007) Short telomeres in short-lived males: what are the molecular and evolutionary causes? *Aging Cell* 6:225–233.

Jones OR, Gaillard J-M, Tuljapurkar S, et al (2008) Senescence rates are determined by ranking on the fast-slow life-history continuum. *Ecol Lett* 11:664–673.

Kipyatkov V, Lopatina E (2009) Temperature and photoperiodic control of diapause induction in the ant *Lepisiota semenovi* (Hymenoptera, Formicidae) from Turkmenistan. *J Evol Biochem Physiol* 45:238–245.

Koch RE, Buchanan KL, Casagrande S, et al (2021) Integrating Mitochondrial Aerobic Metabolism into Ecology and Evolution. *Trends Ecol Evol* 36:321–332.

Koubová J, Jehlík T, Kodrík D, et al (2019) Telomerase activity is upregulated in the fat bodies of pre-diapause bumblebee queens (*Bombus terrestris*). *Insect Biochem Mol Biol* 115:103241.



Koubová J, Pangráčová M, Jankásek M, et al (2021) Long-lived termite kings and queens activate telomerase in somatic organs. *Proc R Soc B Biol Sci* 288:20210511.

Kramer BH, Nehring V, Buttstedt A, et al (2021a) Oxidative stress and senescence in social insects: a significant but inconsistent link? *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 376:20190732.

Kramer BH, Nehring V, Buttstedt A, et al (2021b) Oxidative stress and senescence in social insects: a significant but inconsistent link? *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 376:20190732.

Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113 ( Pt 20):3613–3622.

Libbrecht R, Oxley PR, Kronauer DJ, Keller L (2013) Ant genomics sheds light on the molecular regulation of social organization. *Genome Biol* 14:212.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al (2013) The Hallmarks of Aging. *Cell* 153:1194–1217.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al (2023) Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 186:243–278.

Lopez-Vaamonde C, Raine NE, Koning JW, et al (2009) Lifetime reproductive success and longevity of queens in an annual social insect. *J Evol Biol* 22:983–996.

Lubawy J, Chowański S, Adamski Z, Słocińska M (2022) Mitochondria as a target and central hub of energy division during cold stress in insects. *Front Zool* 19:1.

Lucas ER, Keller L (2020) The co-evolution of longevity and social life. *Funct Ecol* 34:76–87.

Majoe M, Libbrecht R, Foitzik S, Nehring V (2021) Queen loss increases worker survival in leaf-cutting ants under paraquat-induced oxidative stress. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 376:20190735.

Monaghan P, Haussmann MF (2006) Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan? *Trends Ecol Evol* 21:47–53.

Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett* 12:75–92.

Negróni MA, Stoldt M, Oster M, et al (2021) Social organization and the evolution of life-history traits in two queen morphs of the ant *Temnothorax rugatulus*. *J Exp Biol* 224:jeb232793.

Park J, Park J (2021) Complete mitochondrial genome of the jet ant *Lasius spathepus* Wheeler, W.M., 1910 (Formicidae; Hymenoptera). *Mitochondrial DNA Part B Resour* 6:505–507.

Partridge L, Barton NH (1997) On measuring the rate of ageing. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 263:1365–1371.



Promislow DEL (1991) SENESCENCE IN NATURAL POPULATIONS OF MAMMALS: A COMPARATIVE STUDY. *Evol Int J Org Evol* 45:1869–1887.

Quque M (2020) Coevolution of sociality and ageing in animal societies. These de doctorat, Strasbourg

Rich P (2003) Chemiosmotic coupling: The cost of living. *Nature* 421:583.

Robson S, Crozier R (2009) An evaluation of two biochemical methods of age determination in insects (pteridines and lipofuscins) using the ant *Polyrhachis sexpinosa* Latrielle (Hymenoptera: Formicidae). *Aust J Entomol* 48:102–106.

Rolfe DF, Brand MD (1997) The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. *Biosci Rep* 17:9–16.

Sanders JL, Newman AB (2013) Telomere length in epidemiology: a biomarker of aging, age-related disease, both, or neither? *Epidemiol Rev* 35:112–131.

Sherman PW, Lacey EA, Reeve HK, Keller L (1995) Forum: The eusociality continuum. *Behav Ecol* 6:102–108.

Singhapol C (2013) Mitochondrial localisation of hTERT protects against nuclear DNA damage and mitochondrial ROS production after endogenous and exogenous stress. Thesis, Newcastle University

Srinivasan S, Torres AG, Ribas de Pouplana L (2021) Inosine in Biology and Disease. *Genes* 12:600.

Stroeymeyt N, Casillas-Pérez B, Cremer S (2014) Organisational immunity in social insects. *Curr Opin Insect Sci* 5:1–15.

Szatmári EZ, Csordás A, Kerepesi C (2023) Unique Patterns in Amino Acid Sequences of Aging-Related Proteins. *Adv Biol* e2300436.

Tasaki E, Kobayashi K, Matsuura K, Iuchi Y (2018) Long-Lived Termite Queens Exhibit High Cu/Zn-Superoxide Dismutase Activity. *Oxid Med Cell Longev* 2018:e5127251.

Tasaki E, Sakurai H, Nitao M, et al (2017) Uric acid, an important antioxidant contributing to survival in termites. *PLoS ONE* 12:e0179426.

Tatar M, Yin C (2001) Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Exp Gerontol* 36:723–738.

Thompson LV (2006) Oxidative stress, mitochondria and mtDNA-mutator mice. *Exp Gerontol* 41:1220–1222.

Tricola GM, Simons MJP, Atema E, et al (2018) The rate of telomere loss is related to maximum lifespan in birds. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 373:20160445.



Turbill C, Ruf T, Smith S, Bieber C (2013) Seasonal variation in telomere length of a hibernating rodent. *Biol Lett* 9:20121095.

Vigneron A, Jehan C, Rigaud T, Moret Y (2019) Immune Defenses of a Beneficial Pest: The Mealworm Beetle, *Tenebrio molitor*. *Front Physiol* 10:138.

Yan H, Opachaloemphan C, Carmona-Aldana F, et al (2022) Insulin signaling in the long-lived reproductive caste of ants. *Science* 377:1092–1099.

Zapico SC, Ubelaker DH (2013) mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences. *Aging Dis* 4:364–380.

Zhang W, Cui H, Wong L-JC (2012) Comprehensive one-step molecular analyses of mitochondrial genome by massively parallel sequencing. *Clin Chem* 58:1322–1331.



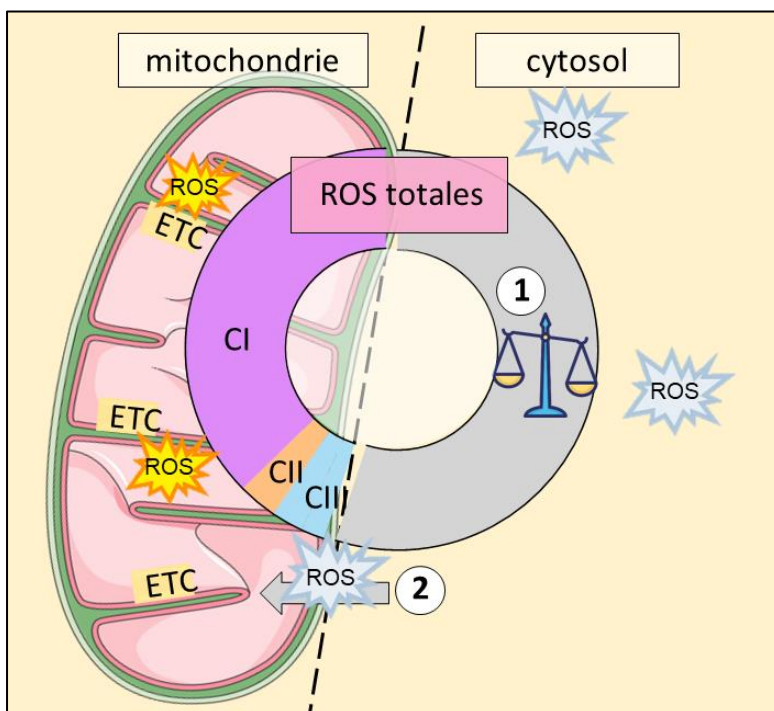


## Résumé de la revue

L'implication de l'efficacité mitochondriale dans la production d'ATP et de ROS suscite un intérêt croissant au sein des laboratoires de biologie évolutive. Les principales raisons sont à la fois l'universalité de la fonction mitochondriale au sein du vivant, et la production de ROS associée. Les mitochondries se situent à la croisée des chemins des compromis évolutifs, notamment ceux liés à la reproduction.

Les progrès techniques de ces dernières années ont permis de révéler que la bioénergétique mitochondriale module en réalité de nombreux autres aspects de l'homéostasie cellulaire et de la physiologie de l'organisme. De plus, contrairement à ce que l'on pensait, la mitochondrie n'est pas nécessairement la première productrice de ROS dans la cellule. La multiplicité des producteurs de ROS à l'intérieur d'une cellule et l'équipement important des mitochondries en enzymes antioxydantes soulèvent une vision alternative du rôle joué par l'organite dans les compromis évolutifs. Néanmoins, notre compréhension de l'implication des mitochondries en tant qu'organites tamponnant les ROS et des producteurs de ROS non mitochondriaux en tant que modulateurs des compromis n'en est qu'à ses balbutiements.

Nous proposons dans cette partie une discussion sur le rôle jusqu'à présent négligé des ROS mitochondriales en tant que molécules de signalisation cellulaire, et des mitochondries en tant que quencher de ROS, dans l'étude des compromis liés à l'histoire de vie.



La mitochondrie n'est pas le principal producteur de ROS dans la cellule ; elle peut de plus tamponner les molécules délétères.

Les ROS sont produites dans l'organite au niveau de 3 des complexes de la chaîne respiratoire ; leur portée varie selon leur lieu de production.



# To be or not to be mitochondrial: the origin of reactive oxygen species and its implication for evolutionary trade-offs.

Maily Kervella<sup>1,2</sup>, Frederic Bouillaud<sup>2</sup>, Fabrice Bertile<sup>1,3</sup> & François Criscuolo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France – 23 rue du Loess, 67037 Strasbourg Cedex 2, France

<sup>2</sup> Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Université Paris-Descartes-Paris 5, Paris, France

<sup>3</sup> Infrastructure Nationale de Protéomique ProFI – FR2048, Strasbourg, France

Key words: bioenergetics, oxidative stress, oxidative metabolism, longevity, ageing theory

\*Corresponding author: [maily.kervella@iphc.cnrs.fr](mailto:maily.kervella@iphc.cnrs.fr)



## Abstract

Animals are dependent on the food they collect from the environment to insure their energy homeostasis. A part is burned to provide energy, another feeds biosynthetic pathways to increase biomass. This allocation of resources involves trade-offs that shape their adaptive strategies. Energy metabolism is therefore a central issue as it implies the use of oxygen and the inevitable associated risk of oxidative damage to biomolecules by reactive oxygen species (ROS). The "ROS theory of ageing", formulated by evolutionary biologists, investigates the links between oxidative metabolism and evolutionary trade-offs, with particular emphasis on the relationship between lifespan, metabolic rate and ROS generation.

Mitochondrion, responsible for energy conversion and oxygen handling, is the key to understanding oxidative stress. However, the issue of oxidative stress is more complex than it first appears, because i) mitochondrial ROS are useful for important cellular functions, ii) the mitochondrion is well-equipped with antioxidant systems, and iii) ROS are also produced by extra-mitochondrial cellular sources.

Here we discuss how considering mitochondrion as a regulator of cell oxidative homeostasis, and not just as major ROS producer, may add new insights to explain of the role of oxidative stress in the reproduction-survival trade-off. We suggest several avenues for future work to test how an oxidative buffering capacity of mitochondrion might complement current bioenergetic and evolutionary studies.



## 1. Introduction: Fitness and the ROS theory of ageing

Animals encounter various challenges at different time scales: i) they must guarantee short-term survival by maintaining internal homeostasis and evading predators, ii) in the mid-term survival, they must focus on immune defence and building reserves, iii) finally in the long-term, they must deal with the optimal investment of energy in growth and reproduction. If immediate survival is of highest priority, the allocations of resources extracted from the environment for long term goals is subject to trade-offs. These trade-offs reflect the adaptive strategy of a species in response to environmental selection pressures. Furthermore, as time goes on, animals face ageing that affect the number of possible reproductive cycles. The ability to successfully overcome these challenges determines fitness.

Food is used either to provide energy or to increase individual/population/species biomass (expressed in Joules, and depending on reserves, growth, and reproduction). The flux of energy is higher than what would be observed if only immediate organism maintenance considerations were taken into account because all cellular processes require energy, including biomass-increase. Energy metabolism is roughly identified to oxidative metabolism “respiration” in its broadest sense, *i.e.*  $O_2$  consumption and  $CO_2$  release. Later on, we will use the term respiration in a more restrictive sense. The faster animals grow, the more they reproduce, the higher their metabolic rate and associated oxidative cost, and the shorter their lifespan will be, thus defining the pace of life continuum [1–3]. A mechanistic explanation would be based on the proportionality between the metabolic rate, hence intensity of respiration, and the release of reactive oxygen species (ROS). Within this (still disputable [4]) free radical theoretical context, cellular respiration and mitochondria appear as the ideal target to study the oxidative basis of life-history trade-offs. This is supported by the idea that mitochondrial production of ROS is one of the determinants of ageing, since ROS are inevitable byproducts of aerobic metabolism, leading to deleterious effects across all biological scales (from molecular, cellular and tissue levels to individual and population levels [2]). Note that mitochondria possess their own genome, and interactions with nuclear genes drive mitochondrial functions, including oxidative stress response. This relationship can therefore result in different phenotypes and life history traits. The hypothesis that the rate of ROS production is related to the rate of  $O_2$  consumption provide a *prima facie* explanation for why fast-living animals are short-lived: because they chronically suffer from higher levels of



oxidative stress [5]. This has led to the famous “Live fast, die young” assertion, even if some limitations were rapidly put forward [6]. Evidences started to accumulate over subsequent years against the simple explanatory diptych “high metabolism/ high ROS” for different ageing rates or longevities [7,8]. The observation that individuals with a high metabolism may still live longer [9] triggered a deeper interest in specific mitochondrial adaptations [10].

### ***Energy metabolism, mitochondria and ROS formation***

Hydrolysis of the third phosphate bond of adenosine triphosphate (ATP) powers most energy-demanding cellular processes, leading to the formation of adenosine diphosphate (ADP). The phosphorylation of ADP into ATP involves gas exchange as written below. Firstly, **oxidation of carbon-containing molecules** (such as sugars, lipids, proteins) releases electron ( $e^-$ ) and  $CO_2$  (during reduction of pyruvate into acetyl-coA and Krebs cycle steps. This carbon oxidation is accompanied by substrate-level phosphorylation in enzymatic steps of glycolysis and the Krebs cycle, generating some ATP (4 per glucose). However, the largest part of energy released from this carbon oxidation resides in the electrons extracted and loaded onto redox shuttles (coenzymes) such as  $NAD^+/NADP^+$ , which are reduced to  $NADH/NADPH$ , or  $FAD/FMN$  reduced to  $FADH_2/FMNH_2$ . This process implies the transfer of two electrons and one or two protons.

$O_2$  is then involved subsequently for **oxidative phosphorylation** (Oxphos). Oxphos is the oxidation of the reduced coenzymes by the mitochondrial respiratory chain also named electron transport chain (ETC). ETC transfers electrons to the final acceptor  $O_2$  and releases water (this is respiration *stricto sensu*) while extruding protons in the intermembrane space of the mitochondria thereby creating a protonmotive force used by the ATP synthase (complex V of Oxphos). Both processes are coupled meaning that electron transfer in ETC is controlled /limited by the ATP formation rate through the ATP synthase. Oxphos is by far the largest consumer of  $O_2$  in a cell and results in the formation of ATP at high yield, with approximately 30 molecules of ATP produced from the oxidation of one glucose molecule and 40 from the oxidation of 6 carbon fatty acid. The complete oxidation of glucose reaches to a maximum P/O of 2.79 moles of ADP phosphorylated to ATP per  $2e^-$  flowing through the electron transfer chain to reduce one oxygen, according to Mookerjee and colleagues [11]. The yield is indeed



never maximal because of the variability of the coupling between substrate oxidation and ATP formation. Current values of the coupling (yield of Oxphos) range from 80% to 50-40% [12,13] and entail a range of uncertainty for the proportionality between ATP turnover and O<sub>2</sub> consumption. The molecular explanation is a percentage of protons that escape the Oxphos circuit essentially through leaks that enable proton return via other pathways than the ATP synthase.

Oxygen reduction in biological systems for energy production and associated ROS production are resumed in figure 1. Accordingly to literature, 0.2–2% of the electrons in the ETC are considered to leak out the chain (to superoxide (O<sub>2</sub>-•) formation) before complex IV reaction [14,15]. However, as shown in the figure 1A, production of ROS like O<sub>2</sub>-• and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is not restricted to mitochondrial ETC and could be generated by other cellular compounds (and not only mitochondrial) such as NAD(P)H oxidases. Importantly, radicals (and not necessarily oxygen radicals) are obligatory intermediates in some enzymatic reactions. Therefore, cellular ROS formation could result from reactions with a given purpose (defence against pathogens, reaction intermediates, ...) or from unexpected leakage of electrons forming somehow “orphan ROS” with increased risk of oxidative damage to cellular components. Cells defend themselves by scavenging radicals or repairing damaged molecules. To date, 11 sites are known to produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and/or O<sub>2</sub>-• *in vitro*, in isolated mammalian mitochondria [16]. However, the intensity of mitochondrial fluxes involved in energy metabolism leads (perhaps abusively) to consider it as the most relevant cellular ROS generator. For this, several studies measured the involvement of each ETC complex into ROS production. It may vary according to the species, tissues studied, and experimental conditions such as substrate provided or O<sub>2</sub> tension, however ROS seem to be produced mainly by the ETC complexes CI, then CIII, and finally CII [17,18]. As an order of magnitude, Quinlan *et al* measures H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in skeletal muscles from rats, in which CI was responsible for 83% of ROS generation, CIII 10% and CII 7% [19]. Complex I deficiency has been identified as the most frequently defective ETC enzyme in patients suffering from mitochondrial disorders, and studies revealed elevated mitochondrial ROS production, negatively correlated to residual activity of the defective complex [20,21]. In terms of topology, complexes I and II produce ROS only in the mitochondria matrix, contrary to complex III that produces ROS in both the matrix and intermembrane spaces (see figure 1B) [22,23].



The mitochondrial ROS produced in intermembrane space theoretically have easier access to the cytosol than those produced into the matrix, as they only need to cross the outer mitochondrial membrane. ***Mitochondria-life histories: nuclear and mitochondrial epistasis enter the dance of ageing***

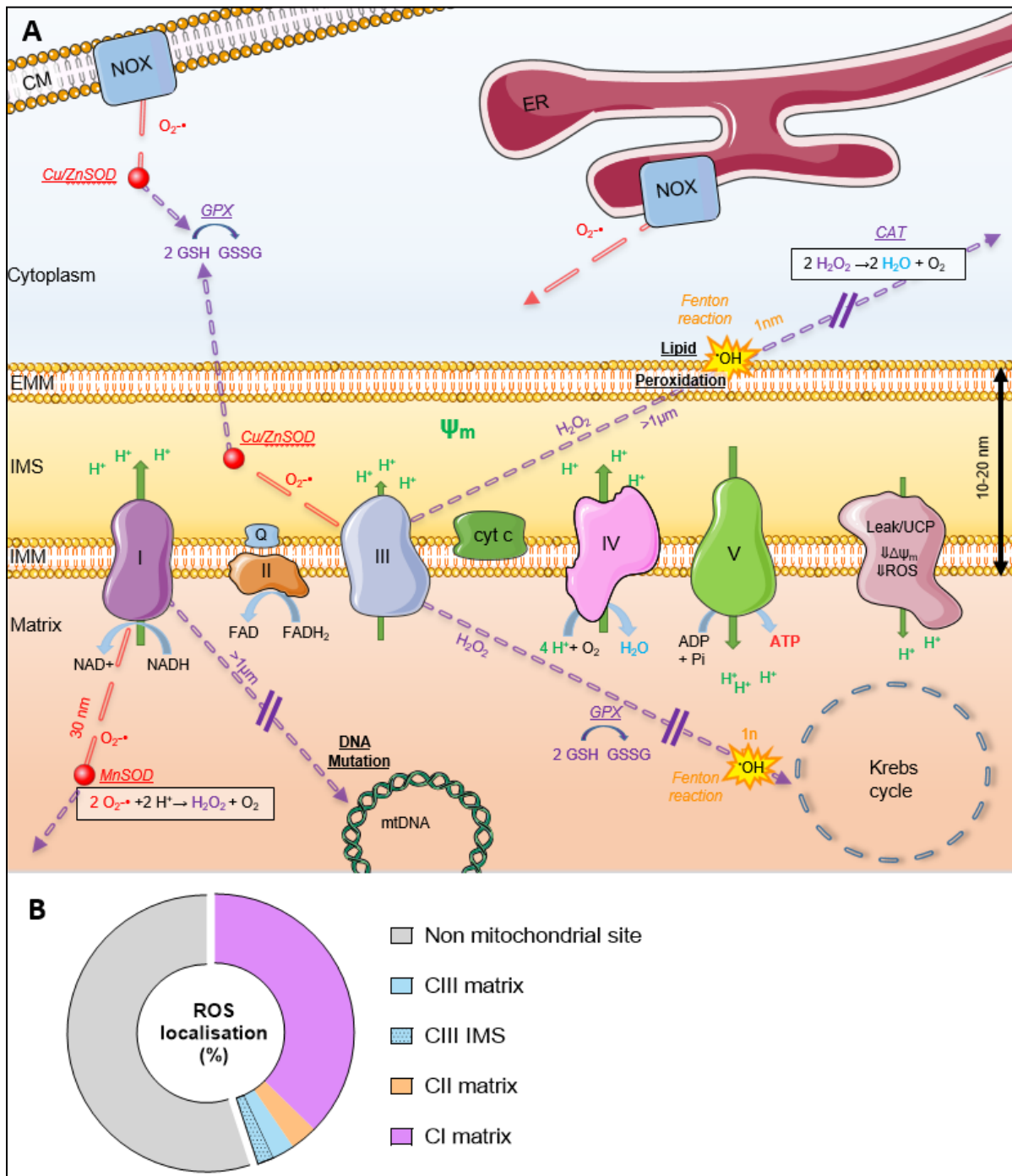
Mitochondria, along with the production of reactive oxygen species (ROS), influence life history traits and impact various aspects of an organism's development and survival. They play in particular an important role in fertility and reproduction, both in terms of mitochondrial quality and quantity. For example transgenic mice with induced mitochondrial DNA (mtDNA) mutations experience premature ageing and severely reduced fertility in both sexes [25]. In humans, mtDNA content also correlates with the ability of oocytes to be fertilized, as oocytes with defective maturation have a lower mtDNA copy number [26].

The mitochondrion is the result of a long-term evolution between the nuclear genome and an ancestral bacterium absorbed 1-2 billion years ago [27], which provided an energetic advantage to the host (envisaged as an anaerobic fermenter). The bacterial genome was reduced over time due to loss of selection pressure, redundancies with nuclear genes, and horizontal gene transfers from bacteria to the nucleus [28]. One of the consequences of almost all mtDNA integration into the nucleus is the existence of chimeric mitochondrial enzyme complexes in the ETC, encoded by both reduced mitochondrial genome and the nuclear-encoded mitochondrial genome. Today, in almost all metazoans, nearly exclusively maternally-inherited mitochondria code 37 genes (excluding small open reading frames coding sRNA and mitochondrial-derived peptides [29]), among which 13 proteins (all are ETC subunits). This actually represents a negligible part of all the mitochondrial proteins, but they are of key importance for mitochondrial function.

The circular mitochondrial DNA is known to accumulate more mutations than the nuclear genome, because of ROS production proximity and a less-effective DNA repair system. Its circular conformation makes replication of deleted forms faster. When these mutant proteins forms are not eliminated, they can accumulate over time among intact mitochondria. For example a 65 year old human has half of his mitochondrial DNA molecules damaged [30]. This lead to a progressive erosion of the overall quality of mitochondrial content, and thus to a loss in mitochondrial respiratory capacity [30]. The ROS-driven mtDNA insertions of



pseudogenes into the nucleus are not detailed in the present paper, and their involvement in diseases and ageing are discussed elsewhere [31].



**Figure 1 Oxygen reduction in biological systems and ROS production:** A) ETC is the main consumer of electrons. During their transport through the ETC, protons are pumped from the matrix into the intermembrane space by complexes I, III, and IV. Electron transport ends with the reduction of an oxygen molecule ( $O_2$ ) into two molecules of water by complex IV (cytochrome oxidase). In the process, the couple NAD/NADH is the main electron donor associated to carbon oxidative metabolism (at complex I).  $H^+$  active pumping creates an





electrochemical gradient,  $\psi_m$ , that is used to convert ADP into ATP by complex V (ATP synthase). Note that the proton return to the mitochondrial matrix can be also made through basal proton leak or inducible proton leak (UCPs/ANT). These mechanisms decrease the membrane potential, that decreases mROS production. mROS are mainly produced by CI and CIII (some ROS are produced in CII, not shown). Both complexes produce mROS in the mitochondrial matrix, but CIII produces ROS into the IMS too. Mitochondria are not the only ROS producers in cells: they are for instance also produced in the cytoplasm by NOX at the ER, and the CM. Electron leak leads to  $O_2\cdot^-$  when there is the reduction of a single electron,  $H_2O_2$  is formed when a pair is reduced.  $O_2\cdot^-$  is very reactive and damages within short time neighbouring biological molecules (migration distance can reach 30nm). While  $H_2O_2$  is less reactive (that is why the distance migration is higher  $>1\mu m$ ), it is thought to release  $OH^\bullet$  (Fenton reaction) a strongly reactive radical which attacks every close biomolecule type (DNA, RNA, proteins and lipids, distance migration 1nm). Cells are equipped against these deleterious molecules: superoxide dismutase (MnSOD in mitochondria, Cu/ZnSOD in intermembrane space and cytoplasm) dismutate  $O_2\cdot^-$  into oxygen and  $H_2O_2$  which can diffuse into the cytoplasm; catalase reduces  $H_2O_2$  into water and oxygen, glutathione peroxidase into water and glutathione disulfide. Non enzymatic scavenging systems, such as glutathione (GSH/GSSG), are also involved. B) On a cellular level, mitochondria produce less than half ROS, with values that may vary by an order of magnitude depending on the cell type [60,146]. Here, we schematically represent the sites where ROS are located, based on various literature data, whether focused only on mitochondria or not, to provide a general idea at the same cellular scale. The mtROS percentage is derived from data on rat liver [146], but can be halved or doubled based on other values [60]. The mROS values shown here are from Quinlan's work [19], which concerns isolated mitochondria from skeletal muscle. The results are here reported as a percentage of the total amount of ROS. Muller's values from mouse skeletal muscle complete the ROS location in the organelle [22]. Additional examples of the mROS/total ROS ratio can be found in Zhang and Wong, 2021 [60]. *CM: cell membrane, ER: endoplasmic reticulum, EMM: external mitochondrial membrane, IMS: intermembrane space, IMM: external mitochondrial membrane, ETC: electron transport chain, CAT: catalase, GPX: glutathione peroxidase, GSSG: oxidized glutathione, GSH: reduced glutathione, UCP: uncoupling protein.*

This explains how sites of ROS production could have different roles in redox signalling and oxidative stress. Bleier *et al* analyzed for example the proteome of isolated mitochondria from rat heart and shown that redox-sensitive protein targets were different when complex I or complex III were employed as source of ROS, even in the matrix [23]. Still, at the level of the cell, only half of the total ROS amount has been related to mitochondria in those studies, NADPH oxidases (NOX) having being recognized as main source of ROS in numerous cell types as skeletal muscle [24].



Mitochondria can play a selfish role and increase the transmission of their own genome at the expense of the organism's function: uniparental transmission favours the spread of mutations in the mitochondrial genome that can increase female survival and fertility, but may jeopardize the fitness of male (Mother's curse hypothesis, [35]). Since mitochondrial genes evolve faster than nuclear genes, maintenance of the ETC integrity and functionality (that compensate male-damaging mutations in the context of the Mother's curse hypothesis [32]) implies nuclear ETC genes evolving jointly with mitochondrial genes [33], to ensure mitochondrial-nuclear epistasis (dialogue). Thus, there are more mutations in nuclear-encoded mitochondrial genes than in other nuclear material [33].

Many experimental analyses on cybrids (transmitochondrial models) show how manipulations on co-evolved mitochondrial and nuclear loci impacts mitochondrial function, and *in fine* organisms' fitness. A few years ago, in a review dealing with mito-nuclear epistasis and possible issues for *Mitochondrial Replacement Therapy* (3 DNA babies), Adam Eyre-Walker compiled the results of 231 analysis on five species (three insects, one mammal and one copepod). He showed a slight advantage for native mitochondrial DNA in terms of fitness at the organismal level (i.e., reproduction, lifespan), but with an average effect close to 0 [34]. However, results on copepod *Tigriopus californicus* showed that native strains had unilaterally a better fitness. The species had indeed a high divergences in mitotype (or mitochondrial haplotype) that can exceed 20% [35], following a high level of population differentiation (with hybrids remaining fertile [36]). Analyses focusing on physiology showed the consequences of the mismatch between genomes during oxidative stress response: hybrids have lower fecundity [37,38], increased lipid content and finally enhanced ROS production [37,39,40]. They also presented intermediate or lower respiration rate, and lower ATP production rates [41,39]. Finally, genes upregulated in natural hybrid populations encoded proteins with known roles in responses to oxidative stress [42].

As mentioned above, mito-nuclear interaction is a legitimate concern in human health: human cybrid cultured-cells with mitotype found in centenarians are characterized by less mtROS production [43]. By contrast, sequencing of admixed American population has shown that as mtDNA and the nuclear-encoded proteins involved in mtDNA replication become more dissimilar in ancestry among humans, mtDNA copy number decreases [44]. This should be consistent with suboptimal regulation of mtDNA replication. The authors opened the



discussion on susceptibility to diseases such as type 2 diabetes, Parkinson's disease, infertility or cardiomyopathy, and also ageing, hence underlying the importance of future researches in the in context of Mitochondrial Replacement Therapy. In conjunction with it, mitotypes identified as conferring higher chances of achieving longevity in populations has not been correlated with longevity in others, suggesting population-specific associations [45].

Organisms can show very different phenotypes, with *a priori* the same mitochondrial genetic content, and very similar nuclear-encoded mitochondrial DNA. How life history traits can influence anterograde and retrograde signalling and *vice versa* is thus not a trivial matter from evolutionary perspective: as a striking example, social insects share mitochondria inherited from the queen, but development conditions preparing for division of labour and task specialization lead to castes fitness-relevant traits, in that way they have distinct caste proteomes [46]. Ants present dissimilarities in terms of body size and fecundity (only queens mate), and significant discrepancies in lifespan, since queens can live up two or three decades, whereas workers reach only one year or two. Also, social colonies are likened to superorganisms, with queens being germ cell lines, and workers being somatic cells [47], implying differences in energy demand, metabolism, ROS production and ageing that are tissue-specific.

### ***Mitochondrial implications in the diversity of ageing***

Mitochondrial defects are one of the hallmarks of ageing and deteriorated health [48,49]. Consequently, mitochondria attracted the interest of researchers from many biological fields, from bioenergetics and biochemistry to medical research. Evolutionary biology, which focuses on the understating of the life-history trade-offs that conducted life forms to evolve as they are presently, is not an exception. Since ca. 20 years, the way ATP is produced and its concomitant oxidative cost appeared as a key functional element modulating growth, reproduction and lifespan (e.g. [50]). The mitochondrial production function must have been optimized under limited energy availability while life-history traits continuously compete for it to promote individual fitness [51,52].

Investigation of the role of mitochondria in the intertwining of life history traits has focused on the functional links between ATP turnover, ROS production, and the physiological and



fitness consequences of the coupling level of oxidative phosphorylation (*i.e.* thermic loss, [53]). In that context, researchers rapidly proposed a re-evaluation of mitochondrial uncoupling as a basis of the “live fast – die young” hypothesis, to explain why some fast O<sub>2</sub> consumers were not always species or individuals showing shortened lifespans (See uncoupling section). However, even under the so-called *Uncoupling to survive hypothesis* [54], mitochondrial ROS production remains a key variable sustaining animal life history.

### ***The alternative view of the mitochondrial role in the regulation of oxidative stress***

Several reasons have led to reconsider mitochondrial ROS production as a main issue for organisms. First, mitochondrial ROS are not only harmful molecules but also fulfil a signaling role in many intracellular pathways [55,56], suggesting that their production is necessary. In that sense, researchers have begun to question the role of mitochondria as a main source of ROS production within the cell. This is based on several arguments, like the observation that ROS production by mitochondria is not high *in vivo* [57] or when measured under physiological conditions *in vitro* [58]. A critical issue is the O<sub>2</sub> concentration as a large majority of studies about ROS production mechanisms *in vitro* were made with 100% O<sub>2</sub> saturation (roughly 200 μM at 37°C), while in mammals physiological concentration in the extracellular fluid is at least ten times lower (<20μM) [59] and presumably much lower at the sub-level of mitochondria. In addition, mitochondria share the ability to produce ROS with many other cell sites such as the peroxisome, endoplasmic reticulum, and plasma membrane [60]: Indeed, non-mitochondrial ROS may account for over 50% of the cell’s total ROS production (Figure 1B). Several enzymes, including those of the NADPH oxidase family, catalyze the production of O<sub>2</sub>• and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> while oxidizing of NADPH to NADP [61]. The importance of such enzymes producing more ROS than the mitochondria do has been suggested previously [60,62]. Moreover, additional non-mitochondrial enzymatic sites producing ROS have been reported [63,64]. Interestingly, the cross-talk that exists between all cellular ROS producers, including mitochondrial ones [65,66], result in synergic or antagonistic interactions that add complexity to our understanding of how the oxidative cell status is regulated [62], and as a consequence of the oxidative basis of trait evolution [51]. Finally, mitochondria are well-equipped with antioxidant systems, from superoxide dismutase, thyoredoxins, enzymes of glutathione system to catalase, which collectively provide a theoretical high efficiency for buffering ROS



by mitochondria [67]. There are multiple examples showing that the mitochondrial antioxidant activity can rapidly quench oxidative threats [68–70] and that mitochondrial ROS consumption may often outperform mitochondrial ROS production [67], ROS scavenging capacity of brain mitochondria reaching for instance 100 times the rate of ROS generation [71].

The present opinion paper will not go further in describing the rationales of the Free radical theory of ageing [3], the challenges faced by this theory [4,72,73] or non-mitochondrial ROS cell systems [74] and their interconnection with the mitochondria [66,75]. We aim to add a complementary perspective to the general idea that how mitochondria produce ATP and ROS primarily defines the level of individual performances in terms of reproduction or longevity [76,77]. We shortly present ideas for future studies to test how the alternative view of mitochondria as component of cellular homeostasis in terms of energy and antioxidant activity adds to our understanding of trait evolution. We present how these metabolic regulatory properties of mitochondria may counter-balance the non-mitochondrial ROS production and modulate the reproductive trade-offs.

## 2. Alternative Mitochondrial roles in the context of cost of reproduction

Building on the physiological and energy basis of life history traits combination [78,79], studies addressing how oxidative stress influences trade-offs between growth, reproduction and lifespan of animals started to flourish twenty years ago (e.g. [80–82]). They added a non-classical energy based explanation, the imbalance between ROS production and antioxidant barriers, as a plausible mediator of the negative impact of current reproduction on subsequent adult fitness [83] due to the positive association with adult energy expenditure [84]. However, the hypothesis of an increased accumulation of oxidative damages due to reproductive effort (“oxidative cost” hypothesis) rapidly faced inconsistencies (e.g. [85]), the most important being that breeders often suffer from less oxidative stress than non-reproducers [86,87]. This led to another hypothesis presented in figure 2. The “**oxidative shielding hypothesis**” (OSH [88]), replaced the oxidative **cost of reproduction** in an evolutionary perspective (*i.e.* based on individual fitness considerations). To avoid transmitting damaged molecules to their offspring, adult breeders pre-emptively buffer as much as possible the negative impact of the ROS



derived from their high metabolism. This intergenerational explanation highlights why the comparison between the redox status of breeders and non-breeders did not always follow the prediction of enhanced oxidative damage as a payoff of reproduction [89]. Alternatively, the oxidative status of breeders before entering reproduction may also limit their investment in producing offspring (*i.e.* **constrain hypothesis**, [90]). This may also contribute to lower oxidative stress in breeders if oxidative status serves as an endogenous signal to optimize the current reproduction slider [90,91]. Meniri and al (2021) In the context of OSH, the antioxidant role of mitochondria may be central, limiting ROS-induced damage, but also by freeing up energy for general body maintenance (e.g., protein turnover), with long-term benefits for breeders. In fact, the distinction between oxidative damage that impacts the functionality of biomolecules and ROS generation may deserve attention. The extent of oxidative damage is the result of the imbalance between generation of the damage (ROS action) and repair. Repair implies the use of energy, especially if replacement of damaged proteins is required (four ATP per amino acid added to a polypeptide chain). Protein synthesis is under strict control according to energy availability and is more severely repressed under conditions of energy challenge than mechanisms ensuring ionic balance [92–94]. An application has been that the protein synthesis rate is proposed as a proxy for cellular metabolic status (SCENITH approach, [95]). Any increase in oxidative damage may lead to (i) a reduction in the antioxidant capacity of mitochondria and (ii) a redirection of energy allocation towards repairing damage to biomolecules. As a result, oxidative damage reflects a compromised energy status of the individual. This compromise entails a range of mid- to long-term deleterious consequences broader than the oxidative damage *per se*. Alternatively, investment in somatic repair of individuals may be of lower selective value than reproduction in the species of fast pace-of-life [96].



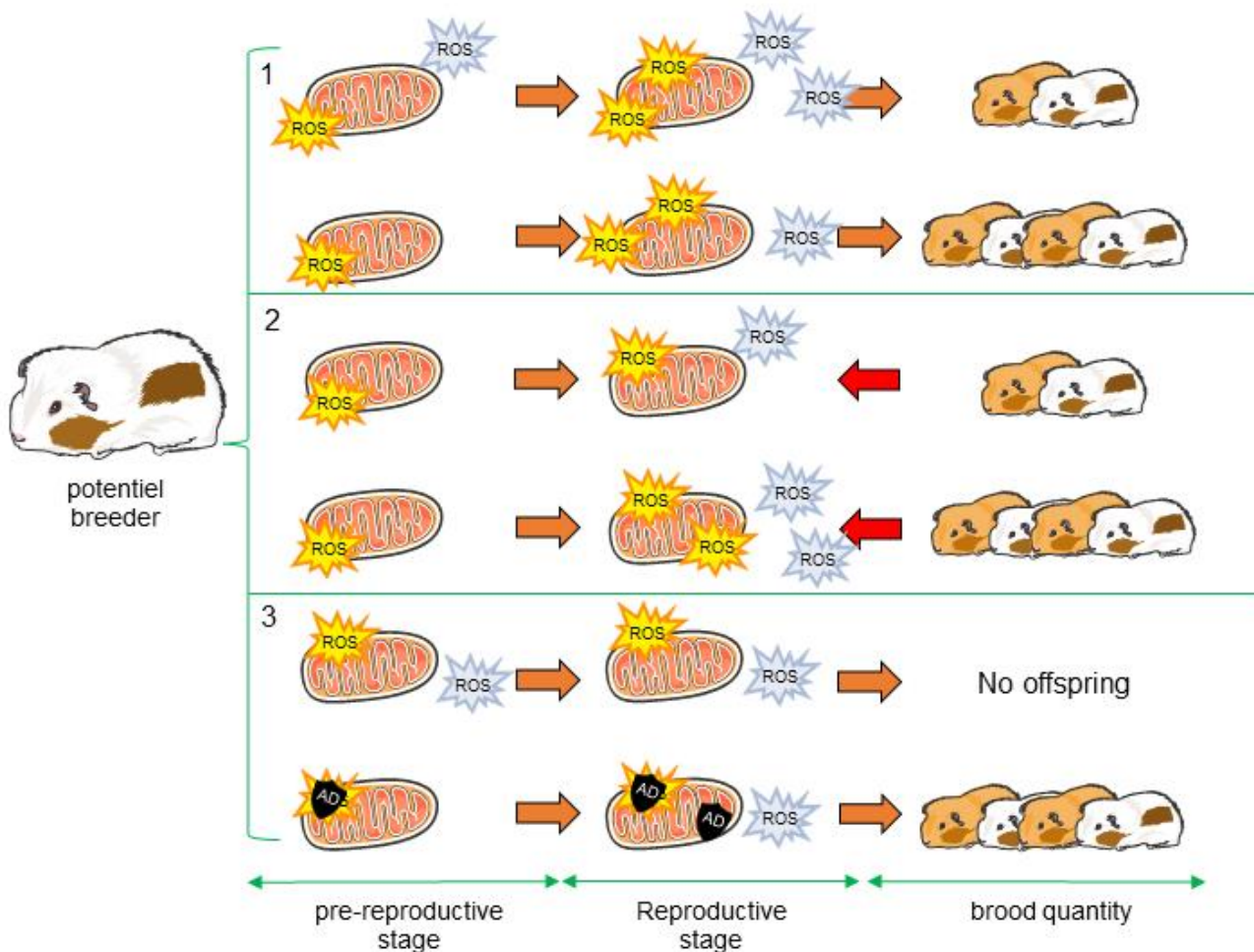


Figure 2: Mitochondrial involvement in reproductive effort

1) **Oxidative stress constrains** reproduction, and limits parental investment, according to the constraint hypothesis. Thus, females with lower levels of oxidative stress during pre-reproductive stage can invest more into reproduction, the hypothesis assuming an increased in ROS production due to the reproductive investment, and a lack of antioxidant defenses production due to the choice in energy allocation. ROS are produced by mitochondria, but also elsewhere 2) Following the **cost hypothesis**, oxidative stress increases with maternal reproductive investment/metabolism, antioxidant capacities being not sufficient. 3) A pre-reproductive increase in antioxidant protection and/or decrease in ROS production leads to **oxidative shield hypothesis**, in which we propose a key role of mitochondria as a ROS quencher. By this, mothers preserve offspring from maternal oxidative stress in utero and during lactation stages. Here explosion icons portrait ROS production, with yellow for mitochondrial ROS, blue for others production sites such as NOX. Black shields are for mitochondrial antioxidant capacities (AD for Antioxidant Defenses). NB: During pre-reproductive stage, all mitochondria produce antioxidants. With a view for simplification, we only showed them for the oxidative shield hypothesis, where they are more produced.



We have already suggested that the beneficial effects of antioxidant mitochondria on fitness may rather apply in the long-term (i.e., turnover of biomolecules on a regular basis). Consequently, along the pace of life continuum (from fast to slow living species), the antioxidant impact of mitochondria may be of increasing importance as mitochondrial ROS production rate decreases.

In summary to date, studies consider that the fine-tuning of mitochondrial ATP vs. ROS production and the mobilization of cellular antioxidants, primarily explain the (non) cost of reproduction [82]. However, there are several additional arguments to propose a more integrated mitochondrial involvement.

### ***Mitochondrial oxidative metabolism controls cellular energy and redox state.***

The primary role of mitochondria is to **produce ATP**, and we propose as a working hypothesis that the ROS release that accompanies reproduction in most cases is not of mitochondrial origin. This is based on the observation that a peak in metabolic activity such as sustained endurance is not necessarily followed by an immediate rise in oxidative damage (e.g. [97]), suggesting that oxidative cost may not be an obligatory issue of high mitochondrial respiration. Following our idea, mitochondrial ATP production should match the enhanced demand triggered by breeding, and this is far more important for the breeding success than any transient mitochondrial oxidative stress. Mitochondria are indeed well-equipped to face ROS attacks and mitochondrial respiratory function should be resilient to any increase in intracellular/mitochondrial ROS. This was observed in house mice (*Mus musculus*) in which comparison of mitochondrial efficiency (measured as the respiratory control ratio, see [98]) was performed in breeders and non-breeders, highlighting no differences between the two groups after the breeding period despite a slight increase in cell membrane oxidative damage [99] (see below for an alternative explanation of this oxidative effect). The maintenance of an adequate level of mitochondrial respiration rate and/or of coupling of respiration with ADP phosphorylation have previously been proposed as essential factors modulating trade-offs [100]. As such, their maintenance should be the priority target of natural selection rather than any ROS issue in breeders.





A second, and key regulatory property of mitochondrial oxidative phosphorylation lies in its ability to **oxidize reduced cofactors** like NADH/NADPH and others (FADH<sub>2</sub>, FMNH<sub>2</sub>). In doing so, the rate of mitochondrial respiration regulates the redox state of the cell and indirectly controls a large panel of intracellular pathways of key importance to the fitness of individuals [55,56]. Coupling as defined above has the disadvantage of linking redox balance and ATP turnover. This prevents any fine adjustment of the redox status of the cell independently of ATP demand. To increase flexibility, pathways exist to re-oxidize reduced coenzymes independently from ATP generation such as non-proton pumping respiratory enzymes (essentially in plants and not presented further here) or uncoupling proteins [10,101]. The flexibility to adjust mitochondrial functioning has provided benefits in terms of mitigating oxidative stress in specific cases (*e.g.* immune oxidative costs) and has allowed the exaptation of UCP1 as a promotor of non-shivering thermogenesis [102–105], particularly in small mammals [101,106]. In these species, heat stress has been proposed as a physiological constraint limiting the increase in metabolism and breeding success (Heat Dissipation Limit theory, [107,108]). Therefore, being able to transiently downregulate mitochondrial uncoupling status and its induced-thermogenesis effect, as well as the consequent waste of energy into heat may help to finely adjust ATP production to reproductive demands while reducing overheating constraints [109,110]. Hence, brown adipose tissue atrophies, mitochondrial content and gene expression of UCP1 are lowered at the same temperature in breeding females compared to non-breeding to avoid overheating risks, with lactation mechanisms already inducing an increased in body temperature *per se* [109]. This has been attributed to a decrease in the sympathetic nervous system activity to mediate suppression of thermogenesis BAT. However, losing these “wasting proton pathways” (i.e., UCPs) may compromise the ability of mitochondria to re-oxidize respiratory chain cofactors independently of the ATP demand (i.e., flexibility). NADH and other cofactors are indeed involved in processes such as cellular antioxidant capacity, cellular stress response and healthy ageing of the body [55,56,111,112], which are all of importance for the future fitness prospect of breeders. Such an inflexibility in mitochondrial functioning may lead to the progressive development of metabolic inflexibility, which is one of the hallmark of ageing [113].



### ***One putatively important additional role for mitochondria: antioxidant capacity***

Mowry et al. [99] showed that breeding mice present an increased level of mitochondrial enzymatic antioxidants (see also [85] for a similar effect on constitutive antioxidants in reproductive birds). In addition, oxidative damages of cell membranes were marginally increased in breeders. The preservation of mitochondrial integrity and efficiency, the higher mitochondrial antioxidant capacity while other intracellular sites are damaged after reproduction (up to nuclear protected material such as telomere length) support the idea that the increased levels of ROS that may characterize the breeding state are not attributable only to the mitochondrial respiratory chain, but also to other cellular sources of ROS (*e.g.* intramembrane NOX enzymes). In addition, if ROS production increases following high expenditure activities, this should be primarily attributed to non-mitochondrial cellular production sites [67,114], and not directly related to mitochondrial O<sub>2</sub> consumption. In that context, mitochondrial antioxidant capacity is of prime importance to regulate the oxidative status of the whole cell. Still, we do not deny that mitochondria are producing ROS, but we propose that mitochondrial and non-mitochondrial ROS may trigger distinct mitochondrial responses. Mitochondrial hormesis (or mitohormesis, reviewed in [115]) describes how mitochondrial performance follows an inverted U-curve in response to increased levels of ROS. If the rate of mitochondrial ROS production is low in comparison to other intracellular sources [60,62,114], a slight increase triggered by the metabolic switch into reproduction may serve as an adjustment variable for mitochondrial and cellular functions: at low levels, mitochondrial ROS may act as modulators of cell signaling of adaptive responses (*i.e.*, interaction with NF- $\kappa$ B, MAPK, Ca<sup>2+</sup> pathways also important in organism ageing [116]), given the long adaptive history that took place between mitochondrial and cellular genomes (see above). If cellular ROS levels are high, mitochondria then fulfill plentifully a role of ROS quencher for the whole cell [60]. In fact, superoxide produced by non-mitochondrial sites may enter the ETC and oxidize cytochrome C and complex IV, thereby participating to ATP production [117,118]. If mitochondrial ROS levels are high, then there is likely to reflect a suboptimal mitochondrial status not compatible with cell survival in the short-term. Mitochondrial ROS may then fulfil adaptive roles in two different situations, both consistent with the observation that oxidative stress is not necessarily enhanced when O<sub>2</sub> consumption increases, like in breeders [88,119,120].



### ***Antioxidant capacity and non-mitochondrial ROS: variance, heritability and fitness effects***

Still, those putative adaptive responses at the cell level need to fulfil evolutionary prerequisites to be of importance in sustaining trade-offs among life-history traits. First, inter-individual variability in antioxidant mitochondrial capacity and in the rate of production of non-mitochondrial enzymes is required for selection to occur. Polymorphisms in genes coding for glutathione-S transferase, catalase or mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) have been previously characterized [62,75,121]. Incidentally, the MnSOD is the only superoxide scavenger present in the organelle. Similarly, non-mitochondrial ROS producers like the enzymes of the NOX family present characteristics compatible with being a target of selection. They are present in a large number of cell types and located at different cellular sites [75], among which include maybe the mitochondria [62]. This systemic expression give them the ability to regulate many physiological processes, either *via* direct damages induced by the ROS they produce (*e.g.* immunity, [122]) or indirectly *via* the impact of ROS on cell signaling ([74],see below). Importantly, inter-individual variations in NOX activity have been recorded in humans, due to polymorphism in particular subunits or regulator gene sequences (reviewed in [62]). Hypothetically, this may underline inherited biological characteristics within families, adding to the evolutionary value of NOX. How mitochondrial (of main maternal inheritance in sexual reproducers, but see [123]) and nuclear genomes as seen in the first part, interact to define heritability of our processes of interest is a key question already tackled elsewhere [45,52,124]. In addition to the existing variance in the ETC functioning, additional mitochondrial regulatory processes may explain individual variance in mitochondrial efficiency (*e.g.* hydrogen sulfide regulation, [125]).

To be under selection, the above-mentioned mitochondrial and non-mitochondrial mechanisms must modulate fitness *via* the promotion of higher reproductive success or longer lifespan in individuals. One of the *Oxidative stress theory* expectations is that lower rate of mitochondrial ROS production is associated to longer longevities (*e.g.* like in birds, [126–128]). However, several studies questioned this affirmation, by showing that the rate of ROS consumption (*i.e.* *via* antioxidant buffering) may rapidly respond to oxidative challenges [68] and may surpass the rate of ROS production within mitochondria [129–131]. Such a powerful anti-oxidant mitochondrial capacity matches with the sustained ROS buffering capacity of mitochondria of remarkable long-lived species like the mole rat, where neither low



mitochondrial ROS production nor high non-mitochondrial antioxidant protections were described [132]. In addition, in birds, sexual selection is often based on quality of colored sexual signals due to a class of antioxidants, the carotenoids [133,134]. Carotenoids yellow/red coloration of feathers or skin is indicating a high quality sexual partner, maybe *via* their antioxidant systemic effects [135]. Carotenoids derived coloration has been positively related to the bird liver's mitochondrial coupling status [77]. Still, the functional explanation for the positive effect of carotenoids on bioenergetics seems to be more related to an intimate structural interaction with the respiratory complexes [77] rather than to supposed antioxidant effects [136]. Similar complexity in the mechanisms linking coloration, mitochondrial functioning and immunity has been described previously [137]. However, one must keep in mind that considering the mitochondrial antioxidant buffering capacity as a mediator of life history trade-offs is not incompatible with the overall negative impact of cell ROS production on fitness, as proposed by the formal *Oxidative stress theory*. The reduction of non-mitochondrial ROS production, like the experimental inhibition of the xanthine-oxidase which reduces ageing rate (reviewed in [66], see [63]) is in line with such an idea. We just propose that the ROS impact needs to be replaced in the mitohormesis context (*i.e.* low levels of ROS production and adaptive effects, [138]). In addition, under stressful conditions, mitochondria may be unable to adapt to the new cell redox conditions, and then tip in a pro-oxidant role [139].

### ***The specific case of NOX and its interaction with mitochondria***

The ability of non-mitochondrial ROS producers (we will mainly focus on NOX) to modulate the cell redox status is likely not to be without consequences for the organism's fitness. First, NOX 4 has been shown to exert deleterious effects on respiratory chain function through an interaction with the electron transport complex I [140]. In addition, NOX enzymes actually oxidize the same reduced coenzymes used by the respiratory chain [141], and thus participate in the regulation of the redox status of the cell and in the flexibility of oxidative phosphorylation. For instance, *via* its interaction with the nuclear factor E2-related factor 2 signaling (nrf2), the NOX and mitochondrial ROS productions are both actors of the adaptive homeostatic response of cells [142], which, once impaired, favors ageing (see below).



Second, the involvement of NOX in the immune response or human pathologies like chronic inflammation and cardiovascular diseases is likely to be of great importance for fitness [122,143]. In addition, NOX 1 has been identified as a down-regulated gene expression in king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) when those marine birds acclimate to cold water at fledgling [144]. Together with other ROS producers that are jointly modulated by cold acclimation, this study suggests an implication of NOX-ROS mediated signaling in physiological adaptations to environmental conditions. Another example lies in the involvement of NOX in insulin secretion [74], which opens the way for further interesting studies on animal adaptations to energy stress.

The known cross-talk between NOX and the mitochondria [65,66] is also an interesting study subject for evolutionary biologists. Mitochondrial morphology and fusion-fission phenomena are mechanisms for regulating the efficiency of ATP production by mitochondria (reviewed in [51]). For example, the progressive increase in mitochondrial volume in red blood cells with age has been suggested as part of the process that mitigates the deleterious effect of age on ATP synthesis in zebra finches (*Taenopygia guttata*) [145]. ROS production by NOX is likely to be among the regulatory processes capable of altering mitochondrial morphology and function, providing an additional pathway for non-mitochondrial ROS modulation of mitochondrial bioenergetics [51].

## General Conclusion

The involvement of mitochondrial efficiency in ATP and ROS production is of increasing interest to the evolutionary biology community. The main reasons are both the universality of mitochondrial function among species and the mitochondrial by-production of ROS together with ATP. As such, mitochondria stand at the cross-roads of evolutionary trade-offs between life history traits along energy and non-energy bases. The rapid advances in various animal models have nonetheless unraveled that mitochondrial bioenergetics actually modulate many more aspects of cell and organism homeostasis and physiology. In addition, the multiplicity of ROS producers within a cell and the heavy equipment of mitochondria with antioxidant enzymes raise an alternative view of the role played by mitochondria in trade-offs. However, our understanding of the involvement of mitochondria as a ROS buffering organelle and of



non-mitochondrial ROS producers as modulators of trade-offs is in its infancy. We urgently need more descriptive studies on the relative importance of mitochondrial vs. non-mitochondrial ROS production, and of its variability among species of different longevities or paces of life. Phylogenetic studies looking at the variability in DNA and protein sequences for enzymes involved in ROS production or fighting against them are likely to inform us about the specific evolution of given proteins that may have coevolved with particular adaptations or combinations of traits. Because natural selection operates at the individual level, variation in the activity of these enzymes among individuals in a given population, and within individuals over time will also be highly informative in defining their fitness correlates. In addition, current topics of study, such as those dealing with animal responses to anthropogenic stressors and global change, would benefit from a better understanding of how mitochondrial antioxidant activity or extra-cellular ROS production (also implicated in detoxification) are modulated. Finally, a better general investigation of the so far neglected role of mitochondrial / extra-mitochondrial ROS as cell signaling molecules in different animal models would be of great interest to extend the concept of mitohormesis in the study of life history trade-offs.

**Data accessibility.** No data were produced for this paper.

**Authors' contributions.** MK and FC wrote a first version of the text and all co-authors drafted the final manuscript and gave their approval for publication.

**Acknowledgments.** The authors express gratitude to Mary Lucienne Waller for proofreading the language.

**Conflict of interest declaration.** We declare we have no competing interests. Parts of the figures in this review were drawn by using pictures from Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>).

**Funding.** The ETERNEEL project was funded by a grant (2020-2021) from the MITI agency (Mission pour les Initiatives Transverses et Interdisciplinaires) of the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), which also granted M. Kervella with a PhD grant (2020-2023).



## References

1. Pearl R. The rate of living. University of London Press, LTD. 1928;
2. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol.* 1 juill 1956;11(3):298-300.
3. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* avr 1998;78(2):547-81.
4. Speakman JR, Blount JD, Bronikowski AM, Buffenstein R, Isaksson C, Kirkwood TBL, et al. Oxidative stress and life histories: unresolved issues and current needs. *Ecol Evol.* 2015;5(24):5745-57.
5. Sohal RS. Oxidative stress hypothesis of aging 1, 2 1Guest Editor: Rajindar S. Sohal 2This article is part of a series of reviews on "Oxidative Stress and Aging." The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radic Biol Med.* 1 sept 2002;33(5):573-4.
6. Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med.* 1 sept 2002;33(5):575-86.
7. Montgomery MK, Hulbert AJ, Buttemer WA. Does the oxidative stress theory of aging explain longevity differences in birds? I. Mitochondrial ROS production. *Exp Gerontol.* mars 2012;47(3):203-10.
8. Speakman JR, Selman C. The free-radical damage theory: Accumulating evidence against a simple link of oxidative stress to ageing and lifespan. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* avr 2011;33(4):255-9.
9. Speakman JR, Talbot DA, Selman C, Snart S, McLaren JS, Redman P, et al. Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *Aging Cell.* 2004;3(3):87-95.
10. Criscuolo F, Gonzalez-Barroso M del M, Bouillaud F, Ricquier D, Miroux B, Sorci G. Mitochondrial uncoupling proteins: new perspectives for evolutionary ecologists. *Am Nat.* déc 2005;166(6):686-99.
11. Mookerjee SA, Gerencser AA, Nicholls DG, Brand MD. Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements. *J Biol Chem.* 28 avr 2017;292(17):7189-207.
12. Brand MD. The contribution of the leak of protons across the mitochondrial inner membrane to standard metabolic rate. *J Theor Biol.* 24 juill 1990;145(2):267-86.
13. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 2010;47:53-67.



14. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* juill 1979;59(3):527-605.
15. Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Formation by Rat Heart Mitochondria on Substrate Availability and Donor Age. *J Bioenerg Biomembr.* 1 févr 1997;29(1):89-95.
16. Brand MD. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 1 nov 2016;100:14-31.
17. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol.* août 2010;45(7-8):466-72.
18. Duong QV, Levitsky Y, Dessinger MJ, Strubbe-Rivera JO, Bazil JN. Identifying Site-Specific Superoxide and Hydrogen Peroxide Production Rates From the Mitochondrial Electron Transport System Using a Computational Strategy. *Funct Oxf Engl.* 2021;2(6):zqab050.
19. Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol.* 2013;1(1):304-12.
20. Verkaart S, Koopman WJH, van Emst-de Vries SE, Nijtmans LGJ, van den Heuvel LWPJ, Smeitink JAM, et al. Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency. *Biochim Biophys Acta.* mars 2007;1772(3):373-81.
21. Rodenburg RJ. Mitochondrial complex I-linked disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 1 juill 2016;1857(7):938-45.
22. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 19 nov 2004;279(47):49064-73.
23. Bleier L, Wittig I, Heide H, Steger M, Brandt U, Dröse S. Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 1 janv 2015;78:1-10.
24. Sakellariou GK, Vasilaki A, Palomero J, Kayani A, Zibrik L, McArdle A, et al. Studies of mitochondrial and nonmitochondrial sources implicate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase(s) in the increased skeletal muscle superoxide generation that occurs during contractile activity. *Antioxid Redox Signal.* 20 févr 2013;18(6):603-21.
25. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature.* 27 mai 2004;429(6990):417-23.
26. Babayev E, Seli E. Oocyte mitochondrial function and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* juin 2015;27(3):175-81.
27. Sagan L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol.* 1 mars 1967;14(3):225-IN6.





28. Sloan DB, Warren JM, Williams AM, Wu Z, Abdel-Ghany SE, Chicco AJ, et al. Cytonuclear integration and co-evolution. *Nat Rev Genet.* oct 2018;19(10):635-48.
29. Wan W, Zhang L, Lin Y, Rao X, Wang X, Hua F, et al. Mitochondria-derived peptide MOTS-c: effects and mechanisms related to stress, metabolism and aging. *J Transl Med.* 20 janv 2023;21(1):36.
30. Searcy DG. Metabolic integration during the evolutionary origin of mitochondria. *Cell Res.* août 2003;13(4):229-38.
31. Puertas MJ, González-Sánchez M. Insertions of mitochondrial DNA into the nucleus-effects and role in cell evolution. *Genome.* août 2020;63(8):365-74.
32. Connallon T, Camus MF, Morrow EH, Dowling DK. Coadaptation of mitochondrial and nuclear genes, and the cost of mother's curse. *Proc R Soc B Biol Sci.* 17 janv 2018;285(1871):20172257.
33. Zhang F, Broughton RE. Mitochondrial-nuclear interactions: compensatory evolution or variable functional constraint among vertebrate oxidative phosphorylation genes? *Genome Biol Evol.* 2013;5(10):1781-91.
34. Eyre-Walker A. Mitochondrial Replacement Therapy: Are Mito-nuclear Interactions Likely To Be a Problem? *Genetics.* avr 2017;205(4):1365-72.
35. Flanagan BA, Li N, Edmands S. Mitonuclear interactions alter sex-specific longevity in a species without sex chromosomes. *Proc Biol Sci.* 10 nov 2021;288(1962):20211813.
36. Tuda M, Kagoshima K, Toquenaga Y, Arnqvist G. Global genetic differentiation in a cosmopolitan pest of stored beans: effects of geography, host-plant usage and anthropogenic factors. *PloS One.* 2014;9(9):e106268.
37. Chang CC, Rodriguez J, Ross J. Mitochondrial–Nuclear Epistasis Impacts Fitness and Mitochondrial Physiology of Interpopulation *Caenorhabditis briggsae* Hybrids. *G3 GenesGenomesGenetics.* 1 janv 2016;6(1):209-19.
38. St. John JC, Tsai TS. The association of mitochondrial DNA haplotypes and phenotypic traits in pigs. *BMC Genet.* 6 juill 2018;19(1):41.
39. Pichaud N, Bérubé R, Côté G, Belzile C, Dufresne F, Morrow G, et al. Age Dependent Dysfunction of Mitochondrial and ROS Metabolism Induced by Mitonuclear Mismatch. *Front Genet.* 2019;10:130.
40. Du SNN, Khajali F, Dawson NJ, Scott GR. Hybridization increases mitochondrial production of reactive oxygen species in sunfish. *Evol Int J Org Evol.* juin 2017;71(6):1643-52.
41. Yu G, Xiang H, Tian J, Yin J, Pinkert CA, Li Q, et al. Mitochondrial Haplotypes Influence Metabolic Traits in Porcine Transmitochondrial Cybrids. *Sci Rep.* 19 août 2015;5:13118.



42. Ding Y, Chen W, Li Q, Rossiter SJ, Mao X. Mitonuclear mismatch alters nuclear gene expression in naturally introgressed *Rhinolophus* bats. *Front Zool.* 6 sept 2021;18(1):42.
43. Chen A, Raule N, Chomyn A, Attardi G. Decreased reactive oxygen species production in cells with mitochondrial haplogroups associated with longevity. *PloS One.* 2012;7(10):e46473.
44. Zaidi AA, Makova KD. Investigating mitonuclear interactions in human admixed populations. *Nat Ecol Evol.* févr 2019;3(2):213-22.
45. Rea IM, McNerlan SE, Archbold GP, Middleton D, Curran MD, Young IS, et al. Mitochondrial J haplogroup is associated with lower blood pressure and anti-oxidant status: findings in octo/nonagenarians from the BELFAST Study. *Age.* août 2013;35(4):1445-56.
46. Quque M, Benhaim-Delarbre M, Deneubourg JL, Sueur C, Criscuolo F, Bertile F. Division of labour in the black garden ant (*Lasius niger*) leads to three distinct proteomes. *J Insect Physiol.* sept 2019;117:103907.
47. The ant-colony as an organism - Wheeler - 1911 - *Journal of Morphology* - Wiley Online Library [Internet].
48. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell.* 6 juin 2013;153(6):1194-217.
49. López-Otín C, Kroemer G. Hallmarks of Health. *Cell.* 7 janv 2021;184(1):33-63.
50. Salin K, Luquet E, Rey B, Roussel D, Voituron Y. Alteration of mitochondrial efficiency affects oxidative balance, development and growth in frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *J Exp Biol.* 1 mars 2012;215(Pt 5):863-9.
51. Heine KB, Hood WR. Mitochondrial behaviour, morphology, and animal performance. *Biol Rev.* 2020;95(3):730-7.
52. Koch RE, Buchanan KL, Casagrande S, Crino O, Dowling DK, Hill GE, et al. Integrating Mitochondrial Aerobic Metabolism into Ecology and Evolution. *Trends Ecol Evol.* avr 2021;36(4):321-32.
53. Cl Q, Iv P, M HM, Al O, Md B. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol* [Internet]. 23 mai 2013 [cité 11 juin 2021];1(1).
54. Brand MD. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol.* sept 2000;35(6-7):811-20.
55. Linnane AW, Kios M, Vitetta L. Healthy aging: regulation of the metabolome by cellular redox modulation and prooxidant signaling systems: the essential roles of superoxide anion and hydrogen peroxide. *Biogerontology.* oct 2007;8(5):445-67.



56. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* oct 2007;8(10):813-24.
57. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 22 nov 2002;277(47):44784-90.
58. Goncalves RLS, Watson MA, Wong HS, Orr AL, Brand MD. The use of site-specific suppressors to measure the relative contributions of different mitochondrial sites to skeletal muscle superoxide and hydrogen peroxide production. *Redox Biol.* janv 2020;28:101341.
59. Hirai DM, Colburn TD, Craig JC, Hotta K, Kano Y, Musch TI, et al. Skeletal muscle interstitial O<sub>2</sub> pressures: bridging the gap between the capillary and myocyte. *Microcirc N Y N* 1994. juill 2019;26(5):e12497.
60. Zhang Y, Wong HS. Are mitochondria the main contributor of reactive oxygen species in cells? *J Exp Biol.* 11 mars 2021;224(Pt 5):jeb221606.
61. DeCoursey TE, Ligeti E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 1 oct 2005;62(19):2173-93.
62. Krause KH. Aging: A revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Exp Gerontol.* 1 avr 2007;42(4):256-62.
63. Labat-Robert J, Robert L. Longevity and aging. Role of free radicals and xanthine oxidase. A review. *Pathol Biol.* 1 avr 2014;62(2):61-6.
64. Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res.* déc 1986;59(6):612-9.
65. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 1 oct 2011;51(7):1289-301.
66. Schulz E, Wenzel P, Münzel T, Daiber A. Mitochondrial Redox Signaling: Interaction of Mitochondrial Reactive Oxygen Species with Other Sources of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal.* 10 janv 2014;20(2):308-24.
67. Munro D, Treberg JR. A radical shift in perspective: mitochondria as regulators of reactive oxygen species. *J Exp Biol.* 1 avr 2017;220(7):1170-80.
68. Ransy C, Vaz C, Lombès A, Bouillaud F. Use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue. *Int J Mol Sci.* 30 nov 2020;21(23):9149.
69. Mailloux RJ. An update on methods and approaches for interrogating mitochondrial reactive oxygen species production. *Redox Biol.* 1 sept 2021;45:102044.
70. Starkov AA, Andreyev AY, Zhang SF, Starkova NN, Korneeva M, Syromyatnikov M, et al. Scavenging of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by mouse brain mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* déc 2014;46(6):471-7.



71. Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci.* déc 2008;1147:37-52.
72. Selman C, Blount JD, Nussey DH, Speakman JR. Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? *Trends Ecol Evol.* 1 oct 2012;27(10):570-7.
73. Buffenstein R, Edrey YH, Yang T, Mele J. The oxidative stress theory of aging: embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms. *Age.* sept 2008;30(2-3):99-109.
74. Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato ELO, Procopio J, Morgan D, et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol.* 15 août 2007;583(Pt 1):9-24.
75. Kovac S, Angelova PR, Holmström KM, Zhang Y, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim Biophys Acta.* avr 2015;1850(4):794-801.
76. Salin K, Auer SK, Rey B, Selman C, Metcalfe NB. Variation in the link between oxygen consumption and ATP production, and its relevance for animal performance. *Proc R Soc B Biol Sci.* 7 août 2015;282(1812):20151028.
77. Hill GE, Hood WR, Ge Z, Grinter R, Greening C, Johnson JD, et al. Plumage redness signals mitochondrial function in the house finch. *Proc R Soc B Biol Sci.* 25 sept 2019;286(1911):20191354.
78. Wikelski M, Ricklefs R. The physiology of life histories. *Trends Ecol Evol.* 1 sept 2001;16:479-81.
79. Zera AJ, Harshman LG. The Physiology of Life History Trade-Offs in Animals. *Annu Rev Ecol Syst.* 2001;32(1):95-126.
80. Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett.* janv 2009;12(1):75-92.
81. Costantini D. *Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology: A Marriage Between Mechanistic and Evolutionary Approaches* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014
82. Speakman JR, Garratt M. Oxidative stress as a cost of reproduction: beyond the simplistic trade-off model. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* janv 2014;36(1):93-106.
83. Ołdakowski Ł, Piotrowska Z, Chrzęćik KM, Sadowska ET, Koteja P, Taylor JRE. Is reproduction costly? No increase of oxidative damage in breeding bank voles. *J Exp Biol.* 1 juin 2012;215(Pt 11):1799-805.
84. Bergeron P, Careau V, Humphries MM, Réale D, Speakman JR, Garant D. The energetic and oxidative costs of reproduction in a free-ranging rodent. *Funct Ecol.* 2011;25(5):1063-71.



85. Sudyka J, Casasole G, Rutkowska J, Cichoń M. Elevated reproduction does not affect telomere dynamics and oxidative stress. *Behav Ecol Sociobiol.* 1 déc 2016;70(12):2223-33.
86. Garratt M, Pichaud N, King EDA, Brooks RC. Physiological adaptations to reproduction. I. Experimentally increasing litter size enhances aspects of antioxidant defence but does not cause oxidative damage in mice. *J Exp Biol.* 1 août 2013;216(Pt 15):2879-88.
87. Garratt M, Vasilaki A, Stockley P, McArdle F, Jackson M, Hurst JL. Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in house mice. *Proc R Soc B Biol Sci.* 6 oct 2010;278(1708):1098-106.
88. Blount JD, Vitikainen EIK, Stott I, Cant MA. Oxidative shielding and the cost of reproduction. *Biol Rev Camb Philos Soc.* mai 2016;91(2):483-97.
89. Viblanc VA, Schull Q, Roth JD, Rabdeau J, Saraux C, Uhrich P, et al. Maternal oxidative stress and reproduction: Testing the constraint, cost and shielding hypotheses in a wild mammal. *Funct Ecol.* 2018
90. Dowling DK, Simmons LW. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc Biol Sci.* 22 mai 2009;276(1663):1737-45.
91. Stier A, Reichert S, Massemin S, Bize P, Criscuolo F. Constraint and cost of oxidative stress on reproduction: correlative evidence in laboratory mice and review of the literature. *Front Zool.* 26 déc 2012;9(1):37.
92. Staples JF, Buck LT. Matching cellular metabolic supply and demand in energy-stressed animals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* juin 2009;153(2):95-105.
93. Boutilier RG. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J Exp Biol.* 15 sept 2001;204(18):3171-81.
94. Hochachka PW, Lutz PL. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* déc 2001;130(4):435-59.
95. Argüello RJ, Combes AJ, Char R, Gigan JP, Baaziz AI, Bousiquot E, et al. SCENITH: A Flow Cytometry-Based Method to Functionally Profile Energy Metabolism with Single-Cell Resolution. *Cell Metab.* 1 déc 2020;32(6):1063-1075.e7.
96. Ricklefs RE, Wikelski M. The physiology/life-history nexus. *Trends Ecol Evol.* 1 oct 2002;17(10):462-8.
97. McWilliams S, Pierce B, Wittenzellner A, Langlois L, Engel S, Speakman JR, et al. The energy savings-oxidative cost trade-off for migratory birds during endurance flight. Nwaogu C, Rutz C, éditeurs. *eLife.* 11 déc 2020;9:e60626.
98. Salin K, Villasevil EM, Anderson GJ, Selman C, Chinopoulos C, Metcalfe NB. The RCR and ATP/O Indices Can Give Contradictory Messages about Mitochondrial Efficiency. *Integr Comp Biol.* 1 sept 2018;58(3):486-94.



99. Mowry AV, Kavazis AN, Sirman AE, Potts WK, Hood WR. Reproduction Does Not Adversely Affect Liver Mitochondrial Respiratory Function but Results in Lipid Peroxidation and Increased Antioxidants in House Mice. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160883.
100. Zhang Y, Hood WR. Current versus future reproduction and longevity: a re-evaluation of predictions and mechanisms. *J Exp Biol*. 15 oct 2016;219(20):3177-89.
101. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol*. 15 nov 2000;529(Pt 1):3-10.
102. Emre Y, Nübel T. Uncoupling protein UCP2: when mitochondrial activity meets immunity. *FEBS Lett*. 16 avr 2010;584(8):1437-42.
103. Emre Y, Hurtaud C, Karaca M, Nubel T, Zavala F, Ricquier D. Role of uncoupling protein UCP2 in cell-mediated immunity: how macrophage-mediated insulinitis is accelerated in a model of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 nov 2007;104(48):19085-90.
104. Stier A, Massemin S, Criscuolo F. Chronic mitochondrial uncoupling treatment prevents acute cold-induced oxidative stress in birds. *J Comp Physiol [B]*. déc 2014;184(8):1021-9.
105. Stier A, Bize P, Hahold C, Bouillaud F, Massemin S, Criscuolo F. Mitochondrial uncoupling prevents cold-induced oxidative stress: a case study using UCP1 knockout mice. *J Exp Biol*. 15 févr 2014;217(Pt 4):624-30.
106. Rolfe DF, Brand MD. The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. *Biosci Rep*. févr 1997;17(1):9-16.
107. Speakman JR, Król E. Maximal heat dissipation capacity and hyperthermia risk: neglected key factors in the ecology of endotherms. *J Anim Ecol*. juill 2010;79(4):726-46.
108. Speakman JR. The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 8 août 2007;363(1490):375-98.
109. Król E, Martin SAM, Huhtaniemi IT, Douglas A, Speakman JR. Negative correlation between milk production and brown adipose tissue gene expression in lactating mice. *J Exp Biol*. 15 déc 2011;214(24):4160-70.
110. Król E, Murphy M, Speakman JR. Limits to sustained energy intake. X. Effects of fur removal on reproductive performance in laboratory mice. *J Exp Biol*. 1 déc 2007;210(23):4233-43.
111. Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol*. sept 1998;16(9):833-8.
112. Naidoo N, Brown M. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. *Front Physiol*.



113. Smith RL, Soeters MR, Wüst RCI, Houtkooper RH. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. *Endocr Rev.* 1 août 2018;39(4):489-517.
114. Brown GC, Borutaite V. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion.* janv 2012;12(1):1-4.
115. Hood WR, Zhang Y, Mowry AV, Hyatt HW, Kavazis AN. Life History Trade-offs within the Context of Mitochondrial Hormesis. *Integr Comp Biol.* 01 2018;58(3):567-77.
116. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 22 févr 2016;2016:e4350965.
117. Mailer K. Superoxide radical as electron donor for oxidative phosphorylation of ADP. *Biochem Biophys Res Commun.* 16 juill 1990;170(1):59-64.
118. D. Lippman R. A new method that investigates superoxides versus respiration in vitro using bioluminescence and Sepharose-bound adenosine derivatives. *J Biochem Biophys Methods.* 1 juin 1982;6(2):81-7.
119. Salin K, Auer SK, Rudolf AM, Anderson GJ, Cairns AG, Mullen W, et al. Individuals with higher metabolic rates have lower levels of reactive oxygen species in vivo. *Biol Lett.* sept 2015;11(9):20150538.
120. Metcalfe NB, Monaghan P. Does reproduction cause oxidative stress? An open question. *Trends Ecol Evol.* juin 2013;28(6):347-50.
121. de Oliveira MAA, Mallmann NH, de Souza GKBB, de Jesus Bacha T, Lima ES, de Lima DSN, et al. Glutathione S-transferase, catalase, and mitochondrial superoxide dismutase gene polymorphisms modulate redox potential in systemic lupus erythematosus patients from Manaus, Amazonas, Brazil. *Clin Rheumatol.* sept 2021;40(9):3639-49.
122. Lambeth JD, Krause KH, Clark RA. NOX enzymes as novel targets for drug development. *Semin Immunopathol.* 1 juill 2008;30(3):339-63.
123. Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee NC, Slone J, Gui B, et al. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 déc 2018;115(51):13039-44.
124. Wolff JN, Gemmell NJ. Mitochondria, maternal inheritance, and asymmetric fitness: why males die younger. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* févr 2013;35(2):93-9.
125. Szabo C, Ransy C, Módis K, Andriamihaja M, Murghes B, Coletta C, et al. Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *Br J Pharmacol.* avr 2014;171(8):2099-122.
126. Barja G, Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* févr 2000;14(2):312-8.



127. Criscuolo F, Gonzalez-Barroso M del M, Maho YL, Ricquier D, Bouillaud F. Avian uncoupling protein expressed in yeast mitochondria prevents endogenous free radical damage. *Proc R Soc B Biol Sci.* 22 avr 2005;272(1565):803-10.
128. Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Prost J, Faivre B, Chastel O, et al. An Experimental Manipulation of Life-History Trajectories and Resistance to Oxidative Stress. *Evolution.* 2006;60(9):1913-24.
129. Drechsel DA, Patel M. Respiration-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Removal in Brain Mitochondria via the Thioredoxin/Peroxiredoxin System. *J Biol Chem.* 3 sept 2010;285(36):27850-8.
130. Munro D, Banh S, Sotiri E, Tamanna N, Treberg JR. The thioredoxin and glutathione-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption pathways in muscle mitochondria: Involvement in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism and consequence to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> efflux assays. *Free Radic Biol Med.* juill 2016;96:334-46.
131. Zoccarato F, Cavallini L, Alexandre A. Respiration-dependent removal of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in brain mitochondria: inhibition by Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem.* 6 févr 2004;279(6):4166-74.
132. Munro D, Baldy C, Pamerter ME, Treberg JR. The exceptional longevity of the naked mole-rat may be explained by mitochondrial antioxidant defenses. *Aging Cell.* juin 2019;18(3):e12916.
133. Hill GE. Plumage coloration is a sexually selected indicator of male quality. *Nature.* mars 1991;350(6316):337-9.
134. Hill GE, McGraw KJ, éditeurs. *Bird Coloration, Volume 1: Mechanisms and Measurements.* Cambridge, MA: Harvard University Press; 2006. 640 p.
135. Faivre B, Grégoire A, Prévault M, Cézilly F, Sorci G. Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science.* 4 avr 2003;300(5616):103.
136. Costantini D, Møller AP. Carotenoids are minor antioxidants for birds. *Funct Ecol.* 2008;22(2):367-70.
137. Koch RE, Josefson CC, Hill GE. Mitochondrial function, ornamentation, and immunocompetence: Mitochondrial function and immunocompetence. *Biol Rev.* août 2017;92(3):1459-74.
138. Klaus S, Ost M. Mitochondrial uncoupling and longevity - A role for mitokines? *Exp Gerontol.* févr 2020;130:110796.
139. Banh S, Wiens L, Sotiri E, Treberg JR. Mitochondrial reactive oxygen species production by fish muscle mitochondria: Potential role in acute heat-induced oxidative stress. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* janv 2016;191:99-107.

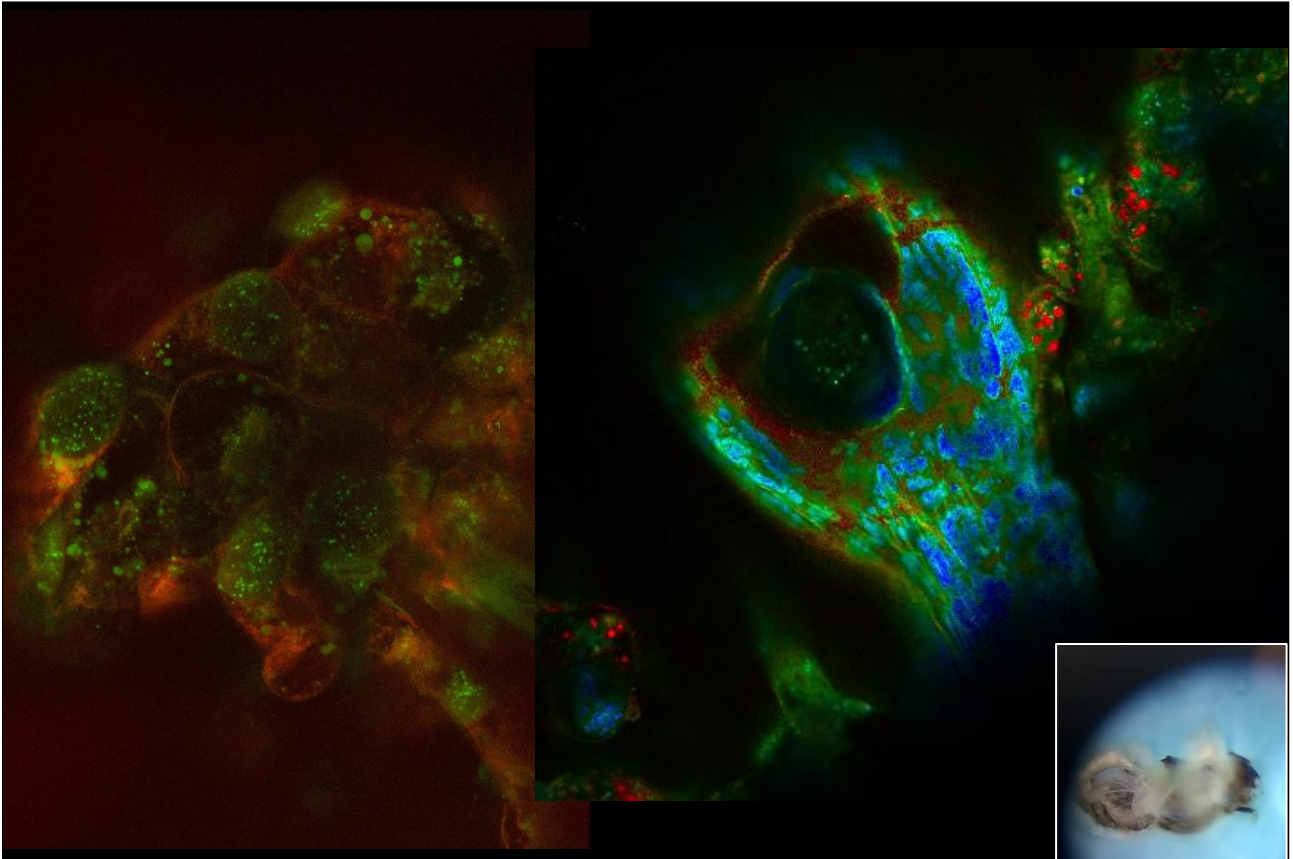




140. Kozieł R, Pircher H, Kratochwil M, Lener B, Hermann M, Dencher NA, et al. Mitochondrial respiratory chain complex I is inactivated by NADPH oxidase Nox4. *Biochem J.* 1 juin 2013;452(2):231-9.
141. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* mars 2004;4(3):181-9.
142. Pomatto LCD, Davies KJA. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radic Biol Med.* 20 août 2018;124:420-30.
143. Lambeth JD. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med.* 1 août 2007;43(3):332-47.
144. Rey B, Déglétagne C, Duchamp C. Transcriptomic data analysis and differential gene expression of antioxidant pathways in king penguin juveniles (*Aptenodytes patagonicus*) before and after acclimatization to marine life. *Data Brief.* déc 2016;9:549-55.
145. Dawson NJ, Salmón P. Age-related increase in mitochondrial quantity may mitigate a decline in mitochondrial quality in red blood cells from zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Exp Gerontol.* mai 2020;133:110883.
146. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 15 juill 1973;134(3):707-16.



## Communications orales:



Tentative de mesure du  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  en FLIM (pour Fluorescence lifetime imaging microscopy) sur gastre de fourmis (le temps de vie à une longueur d'onde donnée est propre à une espèce chimique). Temps de vie très court ( $T < 1\text{ns}$ ) en bleu, temps de vie intermédiaire en vert, temps de vie + long ( $T > 2\text{ns}$ ) en rouge



Why did Batman and Robin become mitochondrial researchers?  
-Because they wanted to uncover the secret identity of the ROS  
villains and bring balance to the Cellular City!



Alexandrins (sans contrainte de césure à l'hémistiche ici) composés dans le

cadre de ma thèse en 180 secondes :

Une curieuse affaire, sous nos pieds prend place,  
Pour laquelle depuis trois ans me décarcasse.  
Lasius niger, ou fourmi noire des jardins,  
Est l'objet central de mes recherches sans fin.

Muse de La Fontaine, et insecte social,  
Tous dans la colonie ont un rôle crucial :  
Reine, ouvrières et mâles - castes figées -  
Division du travail régit leur société.

Mais, le discours du jour est affaire de dames,  
Car les mâles, en saison, quittent notre trame.  
Essaimant et aimant dans un souffle éphémère,  
Le vol nuptial est pour eux un vol funéraire.

Sur la reine repose l'avenir du groupe,  
Se cherche lieu sûr où choyer sa jeune troupe.  
Bientôt, elle délègue et pond pour faire nombre,  
En comptant les saisons, bien placide dans l'ombre.

Humbles ouvrières, aux tâches dévouées,  
Leur temps s'égrène, dans deux rôles bien dictés :  
Elles veillent courain, et reine bien aimée,  
Ou bravent les périls, pour cité sustanter.



Un fait singulier anime ici le chercheur,  
Des longévités contrastées rythment leurs heures.  
La reine règne trente années - avec splendeur -  
L'ouvrière à deux ans perd toute sa lueur.

**Mais comment expliquer pareilles différences ?**

Remarquable insecte de si grande endurance !

Ainsi mes travaux concernent-ils quelque affaire  
Expliquant bien des maux, des effets délétères :  
Nos cellules possèdent des mitochondries,  
Centrales électriques, moteurs de la vie,  
Centrales consommant l'oxygène inhalé  
Pour produire l'énergie, noble destinée.

Il arrive que l'oxygène malicieux  
Induise genèse de produits pernicieux.  
Les radicaux libres, ainsi sont-ils nommés,  
Créent stress oxydant, Ô combien redouté.

Car les radicaux libres attaquent cellules  
Protéines, *ADN*, moulttes molécules.  
Ainsi mitochondrie, à tort ou a raison,  
Se retrouve associée à ce sombre blason,  
Car si l'oxygène de sa tâche est l'essence,  
Le stress qu'il engendre provoque sénescence.

L'objet de mon ouvrage: étudier, sans détour,  
Sur organisme myrmécéen, chaque jour,



Stress oxydant contre systèmes de défenses,  
Et montrer sur mon modèle quelque influence.

En bonne fourmi, je m'attelle à cette tâche  
Dans un grand cabinet des heures sans relâche  
Je revêts blouse blanche de l'inquisition  
Prends des volontaires, soumises à la question.  
Dans des chambres en verre, avec soin je les place,  
Leur faible respiration mesure, sagace.

Arrive l'étape fatale qui dérange,  
Je les broie et produis de formiques mélanges,  
Puis dose protéines du stress oxydant,  
En espérant sortir solides arguments.

La fourmi n'a point la réputation prêteuse,  
Mais en face se tient étudiante joueuse.  
Je volerai à la reine, pour récompense,  
Un doux verre de la Fontaine... de Gourvence.



## A. CEPA MONTPELLIER 2021 (Poster)

### WHAT ANTS TELL US ABOUT METABOLIC AGEING

Maily KERVELLA<sup>1</sup>, Martin QUQUE<sup>1</sup>, Fabrice BERTILE<sup>1</sup>, François CRISCUOLO<sup>1</sup>,  
Frédéric BOUILLAUD<sup>2</sup>,

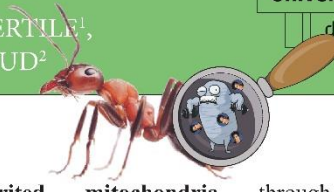
Most social insects are characterized by remarkable disparity in life-history traits between individuals of the same species, since sterile workers live months, while queens may live decades. Some theories of ageing emphasise the importance of metabolism and oxidative stress in explaining longevity. Mitochondria at the crossroads of bioenergetics and ROS theory of aging offer the opportunity to explore both at the same time. We thus aimed at understanding the association between oxidative stress, metabolism, ageing and social organisation in such eusocial species, through the study of mitochondria. Mitochondria are maternally inherited. Besides, ant queens and workers are all females. Consequently, using black garden ant (*Lasius niger*) colonies with a single queen made it possible to minimize genetical variation when establishing the energetic profiles of ants with distinct social roles. Our work is one of the very first to explore oxidative stress and metabolism at this scale, and thus the methods need multiple adjustment to reveal the secrets of this original model. Here, we propose to share our methodology for a same pool of individuals, of a same caste, including measurement of O<sub>2</sub> consumption to estimate energy expenditure, and measurement of various key parameters of oxidative stress (e.g. antioxidants, markers of oxidative stress).

<sup>1</sup>Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France.

<sup>2</sup> Université de Paris, INSERM, CNRS, Institut Cochin U1016 UMR 8104, F-75014 Paris, France.

Email : [maily.kervella@iphc.cnrs.fr](mailto:maily.kervella@iphc.cnrs.fr), martin quque <[martin.quque@iphc.cnrs.fr](mailto:martin.quque@iphc.cnrs.fr),  
[fbertile@unistra.fr](mailto:fbertile@unistra.fr), [francois.criscuolo@iphc.cnrs.fr](mailto:francois.criscuolo@iphc.cnrs.fr), [frederic.bouillaud@inserm.fr](mailto:frederic.bouillaud@inserm.fr)



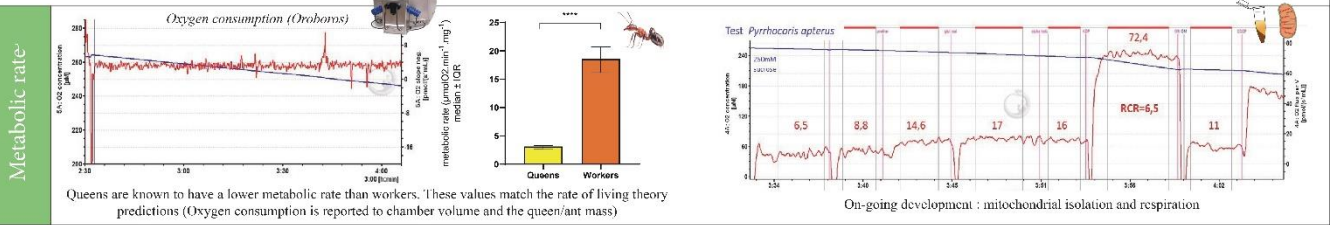
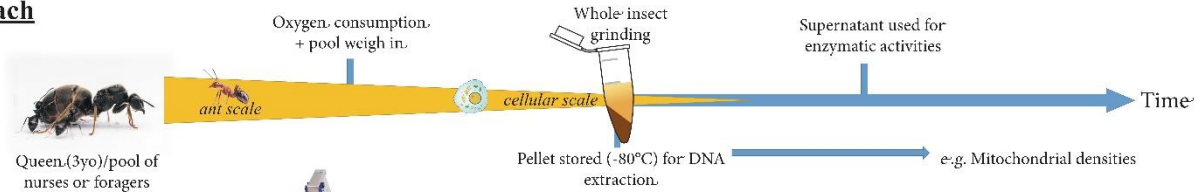


## Context

Social insect workers and queens share same maternally inherited mitochondria through the germline, but are characterized by remarkable disparity in lifespan *ie* months vs. decades. Some theories of ageing emphasise the importance of energetic metabolism and oxidative stress in explaining longevity.

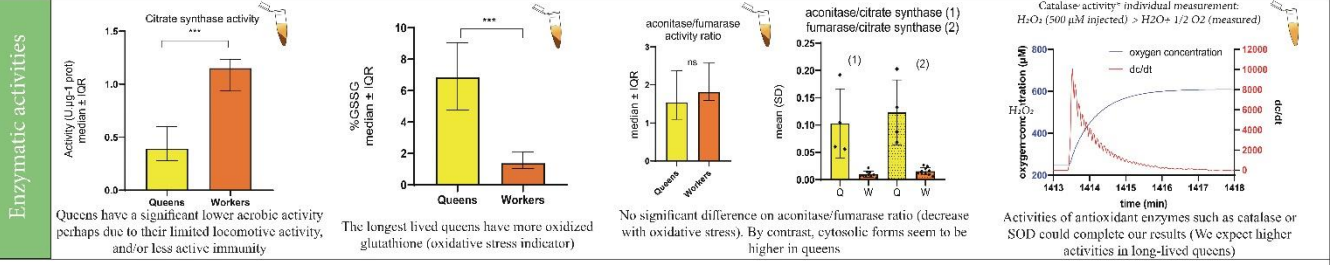
Mitochondria at the crossroads of bioenergetics and ROS theory of ageing offer the opportunity to explore both at the same time. We propose the following experiment to establish the energetic profiles of our ant model with distinct social roles.

## Approach



Queens are known to have a lower metabolic rate than workers. These values match the rate of living theory predictions (Oxygen consumption is reported to chamber volume and the queen/ant mass)

On-going development : mitochondrial isolation and respiration



Queens have a significant lower aerobic activity perhaps due to their limited locomotive activity, and/or less active immunity

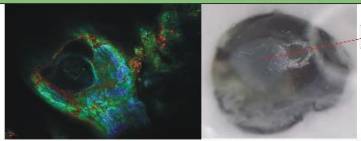
The longest lived queens have more oxidized glutathione (oxidative stress indicator)

No significant difference on aconitase/fumarase ratio (decrease with oxidative stress). By contrast, cytosolic forms seem to be higher in queens

Activities of antioxidant enzymes such as catalase or SOD could complete our results (We expect higher activities in long-lived queens)

## Developments to come

Fluorescence-lifetime imaging microscopy (FLIM) (\*individual)

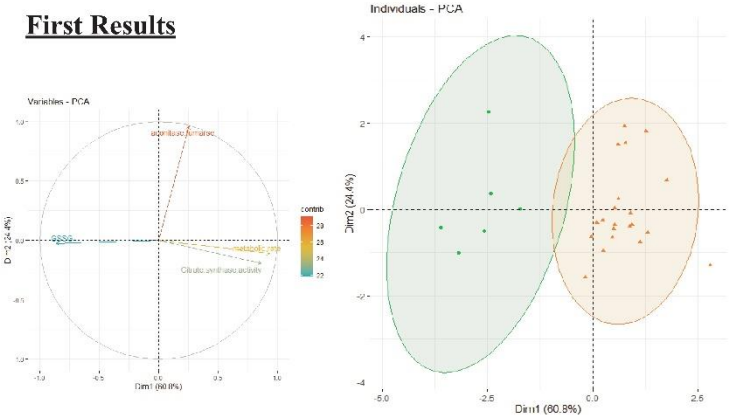


o Mapping the redox state  
lifetime < 1ns  
intermediate lifetime  
lifetime > 2ns  
Lifetime for a given wavelength specific to a chemical species

Proteomics (other pool)

- o Mitochondria isolation
- o Quantitative differences in mitochondrial protein abundances (Targeting the mitochondrial electron transport chain complexes / antioxidant enzymes)

## First Results



o Queens and workers are well separated using our ageing proxies. Long life expectancy of queens seems to be based on a low metabolic rate and citrate synthase activity.

- Step 1 : establishment of energetic profiles of ants with distinct social roles
- Step 2 : Test of oxidative stress
- Step 3 : What about other social species?  
How have co-evolved sociality and ageing patterns ?

<sup>1</sup>Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR7 CNRS 178, FR-67200, <sup>2</sup>Institut Cochin, UMR CNRS 8104/U1016 Inserm, FR-75014





## B. CEPA TOURS 2023 (Poster)

### Mitochondrial adaptations of wolf spiders (*Araneae, Lycosidae*) to hypoxic stress related to immersion

Boulais Valentin, Kervella Maily, Criscuolo François, Pétillon Julien

Wolf spiders (*Lycosidae*) are found in almost all terrestrial habitats, including regularly flooded environments. Among species found there, *Pardosa purbeckensis* and *Arctosa fulvolineata* can survive longer than their terrestrial wolf spider relatives when submerged for a few hours in salty water, the second surviving submerged for more than 16 hours. This extraordinary resistance is made possible by the spider's ability to enter a hypoxic coma under these conditions, meaning they become unresponsive but not dormant.

Hypoxia places the cell in a metabolic challenge, as it must strike a balance between lower ATP production and the preservation of cellular integrity. Mitochondrion take there a central role: an increase of reactive oxygen species production (ROS) among respiratory chain leads to hypoxia induced response.

The aim of this study was to initiate a first comparison of the mitochondrial capacities and antioxidant capabilities, and finally mitochondrial oxidative stress of spiders found or not in salt marsh-dwelling in response to hypoxic stress.

The species were collected at the Biological Station of Paimpont / in the marshes and shellfish beds of Le-Vivier-sur-Mer. They were submerged for 3 hours (stress) or not (control) before measurements. Subsequently, either their mitochondria were isolated for the respiratory chain analyse (normalized to citrate synthase activity), or homogenates were prepared in a phosphate buffer to measure catalase activity or the aconitase/fumarase ratio. Surprisingly, our preliminary results indicate no particular difference among these parameters. However, the protocol would benefit from some adjustments to ensure higher-quality isolates.



## C. SEB MONTPELLIER 2022 (présentation)

### WHAT ANTS TELL US ABOUT METABOLIC AGEING

Maily KERVELLA\*<sup>1</sup>, François CRISCUOLO<sup>1</sup>, Frédéric BOUILLAUD<sup>2</sup>

Some theories on ageing emphasise the importance of metabolism and oxidative stress to explain longevity. Mitochondria being at the crossroads of bioenergetics and ROS theory of ageing offers the opportunity to explore both at the same time. Social insect workers and queens share the same maternally inherited mitochondria through the germline, but are characterized by remarkable disparity in lifespan *i.e.* months vs. decades. The aim of our work was therefore to establish the first step in energetic profiles of the different castes of black garden ant, *Lasius niger*. We conducted our analyses on different scales, from the individual to the mitochondria. This way, ants from different castes were placed into respiration chambers, to establish their metabolic rate (oxygen consumption being based on the mass). Our results matched the rate of living theory predictions, with values 5 to 6 time lower in long-lived queens. Oldest workers (foragers) also showed the highest metabolic rates. In order to define which mitochondrial determinant between density and/or activity explains these results, we measured densities by PCR, and also used electron microscopy on different tissues to characterize the structure of the organelle. Mitochondrial activities were measured with the first tricarboxylic acid cycle enzyme, citrate synthase. Lastly, we explored oxidative barrier as catalase activity, and stress markers (glutathione, aconitase/fumarase ratio).

<sup>1</sup>Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR7178

<sup>2</sup>Institut Cochin, U1016

\*maily.kervella@iphc.cnrs.fr



## D. CEPA TOURS 2023 (présentation)

### ARE DIFFERENCES IN LONGEVITY AMONG CASTES ATTRIBUTABLE TO CONSERVED MITOCHONDRIAL CHARACTERISTICS?

Maily Kervella\*<sup>1</sup>, Valériane Gaxotte<sup>1</sup>, Fabrice Bertile<sup>1</sup>, Frédéric Bouillaud<sup>2</sup>, François Criscuolo<sup>1</sup>

Eusociality in ants has coevolved with the extraordinary long-lifespan of queens in species where task specialization has largely separated individuals into castes with different social roles. However, ants have developed a large diversity of social organization, species being distributed over a continuum of socialities, from real eusocial to less organized colonial systems (e.g. with several queens or reproducing workers).

In this study, we set out to explore the potential relationship between caste-specific longevity and metabolism across seven distinct ant species positioned at different points along the social continuum. Inspired by aging theories that underscore the pivotal roles of metabolism and oxidative stress, we turned our attention to mitochondria, crucial cellular organelles at the crossroad of bioenergetics and the theory of aging through reactive oxygen species (ROS). We hypothesized mitochondrial functioning will be less different between castes in species where social organization is more cursory than in eusocial species. We assessed (i) energy expenditure via indirect calorimetry, (ii) mitochondrial densities using citrate synthase activity, and (iii) mitochondrial oxidative stress by analyzing the aconitase/fumarase ratio.

Our results matched the rate of living theory predictions, with values significantly lower in queens than in relative workers. Moreover, the more the lifespan were contrasted in a species, the more the metabolic rate differed. In pursuit of a deeper understanding of whether conserved mitochondrial characteristics underlie these differences in caste-specific longevity, we initiated a mitoproteome analysis.

<sup>1</sup> : Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC)

CNRS : UMR7178

<sup>2</sup> : [Institut Cochin] Département Endocrinologie, métabolisme, diabète (EMD)

Institut cochin



## Résumé de these

Les animaux présentent un large éventail de durées de vie, allant de quelques jours à une existence presque éternelle, et une telle variation de longévité fascine les scientifiques depuis des siècles. Des modèles emblématiques tels que les baleines sillonnant les mers pendant des siècles ou les rats-taupes nus aménageant leurs galeries pendant des décennies ont conduit à la découverte de processus anti-âge sélectionnés au cours de l'évolution. Au milieu de ceux-ci, une créature bien discrète, vivant sous nos pieds, détient elle aussi le secret de la longévité : la fourmi.

Les fourmis offrent une opportunité scientifique passionnante pour l'étude des processus de vieillissement, car ces dernières ont développé une variabilité frappante de longévités, à la fois entre les espèces et au sein d'une même espèce, parmi différentes castes. En effet, les sociétés de fourmis reposent sur une séparation des rôles associée à des tailles intra- et interspécifiques différentes (et donc à la régulation du taux de croissance) ainsi qu'à des longévités différentes. Les reines plus grandes se reproduisent et vivent plus longtemps que les ouvrières plus petites dans la plupart des cas. Il est intéressant de noter que les différences intraspécifiques de durée de vie ne peuvent pas simplement être attribuées à de grandes différences génétiques (à l'exception de l'épigénétique) car tous les membres d'une colonie partagent au moins la moitié du même génome. De plus, étant donné que toute la colonie provient de la même mère (la reine), elle partage également les mêmes mitochondries, des organites cellulaires qui produisent de l'énergie pour la cellule mais contribuent également au vieillissement par la gestion de la phosphorylation oxydative et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Par conséquent, une approche relativement simple utilisant les fourmis peut être d'une importance primordiale pour séparer les influences génétiques des influences environnementales sur la variabilité individuelle du fonctionnement mitochondrial et son lien avec la longévité. Jusqu'à présent, très peu d'études publiées ont abordé la manière dont les mitochondries des différentes castes de fourmis, aux longévités contrastées, diffèrent réellement dans leurs rôles métaboliques et dans le vieillissement.

Cette thèse avait comme objectif principal de caractériser de la manière la plus complète possible la bioénergétique des mitochondries des castes reproductrices et ouvrières (c'est-à-dire les reines, les ouvrières du nid et les fourrageuses) de *Lasius niger*, une espèce reconnue pour un contraste important dans la longévité des reines par rapport aux ouvrières. Pour ce faire, nous développerons des mesures innovantes de la consommation d'oxygène (**article méthodologique, publication 1 soumise**), de la production de ROS ou des activités enzymatiques, en particulier sur l'organisme entier des fourmis et les mitochondries isolées. En intégrant la bioénergétique et les mécanismes de vieillissement, nous avons montré que (i) le taux métabolique est plus bas chez la reine longévive, tandis que (ii) la charge énergétique de leurs mitochondries est plus élevée que chez les ouvrières (**article original, publication 2, en préparation**), suggérant que le ratio de production de ROS mitochondriaux par unité d'oxygène consommé n'est pas le seul paramètre clé (**article de revue, en correction**) à prendre en compte lors de la tentative d'explication de la longévité extraordinaire des reines de fourmis.

Mots-clés : Vieillissement, Fourmis, Bioénergétique, Mitochondries, Longévité, Production de ROS, Taux métabolique.



## Thesis abstract

Animals may live for days or almost eternally, and such a variation in longevities has been fascinating scientists for centuries. Whales plying the seas for centuries or naked mole rats lining their territories with galleries for decades are all emblematic biological models that have led to the discovery of evolutionarily selected anti-aging processes. However, one small animal living right under our feet still undoubtedly holds the secret to longevity: the ant.

Ants offer an exciting scientific opportunity for the study of ageing processes since these animals have evolved a striking variability of longevities both among species but also within a species among different castes. Indeed, ant societies are based on a separation of roles associated with different intra- and inter-specific sizes (and thus growth rate regulation) and longevities, bigger queens reproducing and leaving longer than smaller workers in most of the cases. Interestingly, intra-specific difference in lifespan cannot merely be attributable to large genetic differences (at the exception of epigenetic) because all members of a colony share at least half of the same genome. In addition, because the whole colony originate from the same mother (the queen), they also share the same mitochondria, a cell organelle that is producing the energy for the cell but also contributing to ageing via the management of oxidative phosphorylation and production of oxidative. Consequently, a relatively simple approach using ants may be of prime importance in separating genetic from environmental influences on individual variability in mitochondrial functioning and its link with lifespan. To date, very few published studies addressed how mitochondria from ant's castes of contrasting longevities are actually differing in their metabolic and ageing roles.

This thesis had as a main objective to characterize as deep as possible the bioenergetics of mitochondria from breeder and worker castes (i.e., queen and nest-workers and foragers) from *Lasius niger*, a species well-known for a large contrast in queen vs. workers longevities. To do this, we will develop innovative measurements of oxygen consumption (**methodological paper, publication 1 submitted**), ROS production, or enzymatic activities especially on ant whole organism and isolated mitochondria. By integrating bioenergetics and ageing mechanisms we showed that (i) metabolic rate is lower in the long-lived queen while (ii) the energy charge of their mitochondria is higher than in workers (**original paper, publication 2, in preparation**), (iii) suggesting that the ratio of mitochondrial ROS production per unit of oxygen consumed is not the only key parameter (**Review paper, in correction**) to take into account when trying to explain the extraordinary lifespan of ant queens.

**Keywords:** Aging, Ants, Bioenergetics, Mitochondria, Longevity, Oxygen Consumption, ROS Production, Metabolic Rate.

