



Endothermie et masse corporelle : effet sur la bioénergétique mitochondriale

Jessica Barbe

► To cite this version:

Jessica Barbe. Endothermie et masse corporelle : effet sur la bioénergétique mitochondriale. Biologie animale. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10279 . tel-04832454

HAL Id: tel-04832454

<https://theses.hal.science/tel-04832454v1>

Submitted on 12 Dec 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N° 205
Ecole Interdisciplinaire Sciences Santé (EDISS)**

Discipline : Ecophysiologie

Soutenue publiquement le 11/12/2023, par :
Jessica Barbe

**Endothermie et masse corporelle : effet
sur la bioénergétique mitochondriale**

Devant le jury composé de :

CANET-SOULAS Emmanuelle
CRISCUOLO François
SALIN Karine
YANNIC Glenn
ROUSSEL Damien
VOITURON Yann
BAETZ Delphine

PU, HDR, UCBL, CarMeN
DR CNRS, HDR, UNISTRA, IPHC
CR, HDR, IFREMER, LEMAR
MCU, HDR, USMB, LECA
PU, HDR, UCBL, LEHNA
PU, HDR, UCBL, LEHNA
MCU, HDR, UCBL, CarMeN

Présidente du jury
Rapporteur
Rapporteuse
Rapporteur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Invitée

REMERCIEMENTS

Après trois ans de thèse, une année de covid et une barrière plus tard (ceux qui me connaissent, savent), je tiens à remercier toutes les personnes sans qui cette thèse n'aurait pas pu être ce qu'elle est.

Je voudrais tout d'abord exprimer ma gratitude envers les rapporteur.e.s et les examinateur.s.ices qui ont accepté de faire partie du jury de thèse : **Glenn Yannic**, **Karine Salin**, **François Criscuolo**, **Emmanuelle Canet-Soulas** et **Delphine Baetz**. Je remercie particulièrement Glenn, Karine et François pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'évaluer ce travail de doctorat.

À l'école doctorale **EDISS** et à ses directeur.e.s **Sylvie Ricard Blum** et **Philippe Connes** de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse, grâce à une bourse ministérielle permettant de financer ces 3 années de recherche.

À mon comité de suivi de thèse : **François-Xavier Dechaume-Moncharmont** et **Hervé Dubouchaud**, merci pour votre implication tout au long de ma thèse et des conseils que vous avez pu me donner lors des CST.

Je tiens à remercier l'équipe pédagogique de physiologie et de biochimie qui m'a permis d'effectuer mon Activité Complémentaire d'Enseignement et plus particulièrement : **Claude Duchamp**, **Caroline Romestaing**, **Bastien Doumeche** et **Leyre Brizuela Madrid**. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné l'opportunité de me lancer dans cette expérience de partage avec les étudiants.

Je souhaite remercier l'ensemble du LEHNA pour m'avoir accueillie lors de mes deux stages de master et de ma thèse. Merci à **Christophe Douady** et **Nathalie Mondy** ainsi qu'à toute l'équipe de direction (**Nadine Brochet**, **Nathalie Lyvet**, **Caroline Palisse**) qui réalise chaque jour un travail formidable.

Je pense honnêtement que je ne pouvais pas tomber dans une équipe plus chouette qu'**E2C**. Vous avez été bienveillants, attentionnés et vous avez largement contribué à l'environnement exceptionnel dans lequel j'ai grandi scientifiquement durant ces trois dernières années. Cela va être très difficile de trouver mieux !

Caro, merci d'avoir contribué à la décoration de notre merveilleux bureau (oui c'est le plus beau de tout le bâtiment Darwin, voire de la Doua). Un des secrets de la bonne santé mentale et physique des doctorant.e.s c'est la nourriture, et ça tu l'as compris tout de suite ! Donc merci de nous avoir nourri avec une quantité astronomique de gâteaux, de chocolat, de pâte à tartiner.... Mais surtout merci pour ta disponibilité, tes moments d'écoute, de réconfort et de soutien.

Loïc, merci pour tous ces bonbons et de te rappeler que les meilleurs c'est ceux qui piquent ! Merci également pour tous tes conseils et de nous avoir refilé des trucs à 6 pattes qui mangent des ronces à longueur de journée et meurent aussi tôt ! RIP Pierre Paul Jacques.

Nathalie, merci pour tous ces moments de partage, de tes conseils en tant que cheffe d'équipe, de directrice d'UMR, de femme ET scientifique extraordinaire. Tu fais tellement ! Je suis impressionnée et incroyablement admirative de ce que tu réalises.

Thierry, je te remercie pour toutes ces anecdotes et histoires d'ornitho. C'est passionnant de te voir aussi passionné ! Merci également pour m'avoir initié, en compagnie de Louise, à la « cueillette » des crapauds et de m'avoir permis de tenir le filet toute la nuit ! Sans rire, je crois que c'était le terrain le plus humide mais le plus chouette que j'ai eu la chance de faire.

FX, merci de m'avoir tant appris, de tes conseils, de m'avoir aidé sur des aspects méthodologiques, statistiques mais surtout d'avoir pris de mes nouvelles et de t'être inquiété pour moi lorsque j'avais petite mine.

Claude, je vous dois beaucoup.... De l'entrée en Master à l'entrée en Thèse, vous avez joué un rôle décisif dans ma vie scientifique. Moi, petite écologue de Licence, j'étais loin de cocher toutes les cases en demandant un Master de physio/neuro. Vous m'avez laissé une chance d'emprunter cette voie d'écophysiologie et je vous en suis éternellement reconnaissante. Vous avez également joué un rôle très important lors des concours doctoraux, sans vous, sans vos conseils et vos recommandations, ça n'aurait clairement pas été pareil. De ce fait, merci pour tout.

Antoine, court passage dans l'équipe mais quelle chance de t'avoir rencontré ! J'ai été très heureuse de travailler avec toi sur tes petites cailles et je te remercie particulièrement pour ton implication et l'énergie que tu as investi dans mes processus de publications.

Adeline, merci d'être passée pratiquement tous les soirs pour voir si je n'étais pas décédée sur la chaise de mon bureau et de m'avertir que « dans 2 minutes je serai seule dans le labo ».

Merci également à **Anne** et **Louise**, qui sont de l'autre côté du bâtiment, que je vois moins souvent mais avec qui les discussions se révèlent toujours passionnantes.

Je tiens à remercier chaleureusement mes encadrants **Damien Roussel** et **Yann Voituron**, de m'avoir fait confiance pour la réalisation de cette thèse et de m'avoir accompagnée tout au long de cette aventure. Vous avez formé un duo de choc pour m'encadrer. Les heures passées avec vous en Enerhox étaient un parfait mélange de sérieux et de rigolade, qui m'en laisse un souvenir exceptionnel. Merci pour tout.

Damien, en plus d'être un amateur de sardines en boîte, tu es un expert incontestable de la mitochondrie, à tel point que lorsque tu en parles, tout à l'air tout de suite beaucoup plus simple. Je suis sincèrement honorée de tout le savoir et l'expertise que tu m'as transmis au cours de mes stages de master et de la thèse. Tu as également toujours su te rendre disponible pour

moi très rapidement, et notamment dans les phases un peu critiques de cette fin de thèse. Je t'en remercie. Infiniment.

Yann, tes histoires et tes anecdotes scientifiques et de la vie m'étonneront toujours (surtout ta poule devenue récemment coq). Ta nature plutôt optimiste a permis de (souvent) contrecarrer ma nature plutôt pessimiste. Mine de rien, ça m'a permis d'avancer, un peu plus chaque jour, un peu plus loin. Je te remercie également de m'avoir accompagnée pour « les premiers contacts » chez les éleveurs/chasseurs/piégeurs et de m'avoir laissé faire des prélèvements sanguins en baskets blanches (elles ne sont évidemment plus blanches...). À travers cette thèse, j'espère que ma pensée aura été aussi créatrice qu'espérée.

Finalement, je crois que l'une de mes plus grandes fiertés de placement géographique durant ces trois années de thèse, c'est de m'être retrouvée dans « le bureau au fond du couloir devant Enerhox ». Eh oui, ce petit paragraphe s'adresse à vous, mes moules de bouchot !

Aux nouvelles recrues « poisson », je vous souhaite une incroyable thèse, pleine de réussite. Pensez à vous aussi, ne vous oubliez pas ! **Julia**, je tiens à te féliciter du travail que tu as accompli lors de ton stage avec moi. Je suis très fière que tu commences ta thèse dans cette équipe, avec une thématique qui te plaît. **Chloé**, j'adore le fait de te voir t'enthousiasmer sur les choses habituelles de la vie. Garde cette curiosité bien avec toi, elle est précieuse.

Élisa, merci pour tous tes conseils de jeune docteure en écophysiologie et de m'avoir donnée, souvent, l'opportunité de rencontrer et parler à du beau monde.

Aude, passage éclair mais chouette aventure que de partager le bureau avec toi ! Je te remercie pour ces moments de rire et de chant théâtral. Merci aussi d'avoir été mon acolyte de poisson, je pense qu'on ne peut pas faire pire que nous deux réunies. J'ai également adoré les moments « dessin et créativité » avec toi, bien qu'il n'y en ait pas assez eu à mon sens. Promis je prends beaucoup plus de temps sur mes réalisations en aquarelle.

Julien, aaaaaah Julien ! Que dire ? Premièrement, je suis impressionnée par la quantité d'informations que tu peux retenir et surtout que tu peux ressortir dans n'importe quelle situation ou discussion. Je suis encore plus impressionnée par la capacité de procrastination que tu exerces mais qui n'entache en aucun cas la qualité de ton travail. C'est un réel don ! À part le fait que c'est drôle de te voir manger des pizzas à tous les foutus repas du midi, tu as été d'un réconfort, d'une écoute et d'une humanité exceptionnelle durant ces deux années. Mais surtout, merci pour toutes ces blagues que tu sors à longueur de journée dont 89 % ne sont entendues que par moi. Annaëlle te l'a probablement déjà dit mais je pense qu'il en va de ta survie dans ce monde dangereux où un cycliste se trouve à chaque coin de rue, un tram dans chacun des grands axes et des voitures partout autour de toi : regarde devant toi quand tu marches de dieu !

Ambre et Annaëlle, c'est le moment où je parais un peu prout prout (Ambre pleure pas stp, Annaëlle rigole pas stp). Je suis si fière de vous avoir rencontré. J'adore le fait que l'on voit le monde de la même façon. Savoir qu'il est fait de feu et de cendre mais s'extasier durant des heures sur une noisette. La vie pendant la thèse (et personne ne se le cache) est parfois exténuante, frustrante et décourageante. On passe globalement un peu tout.e.s par là mais

finalement ce qui fait la différence, ce qui nous permet de tenir bon, ce sont les personnes qui nous entourent. Et vous, mes petites cacahouètes salées, vous avez été une source infinie de rire, de soirées alcoolisées¹ ou non, d'initiation à la sorcellerie, de bonheur et d'encouragement. Je ne sais pas bien vous dire à quel point vous êtes importantes pour moi donc je vais juste finir en vous disant : pouet pouet.

Je remercie mes collègues doctorantes de l'EDISS : **Julie, Camille, Juliette, Fanny, Typhanie, Laurie...** avec qui l'organisation d'une journée scientifique devient nettement plus sympa ! Merci pour ces retrouvailles au patchwork café et à nos petits moments de détente entre deux sélections d'abstracts. Un merci particulier à **Julie**, qui m'a été d'une grande aide ces derniers temps avec le manuscrit de thèse mais également d'un soutien émotionnel incontestable.

Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans l'aide précieuse des éleveurs, pisciculteurs, piégeurs et abattoirs, qui m'ont permis de collecter des échantillons sur leurs oiseaux. Merci à eux, à leur temps et à leur disponibilité.

Je remercie tout particulièrement, **Éric Bureau** et son équipe du **Parc des oiseaux** (Villars les Dombes), de nous avoir permis de prélever du sang de certaines de leurs espèces d'oiseaux. Cette collaboration est précieuse et les résultats qui découlent de cette étude également.

D'ailleurs, merci à toi **Ben**, pour cette fabuleuse collaboration sur le sang des oiseaux. J'ai sincèrement apprécié travailler avec toi. Merci de m'avoir accompagnée collecter des échantillons sur des oies, un samedi matin de décembre par 8 degrés dehors. Pauvres oies de Noël....

Merci à **Philippe Veber** pour nos discussions et mails 100 % bayésien. Ton aide a été plus que la bienvenue.

À mes copines de bio genevoises, depuis toujours, les bentos ! Avec qui les réunions annuelles se pérennisent malgré la distance et nos répartitions dans différents cantons : **Lucie, Mag, Gé, Fanny, Maya et Imane**.

Je remercie bien sûr ma famille, et tout particulièrement mes parents, **Alicia et Christian**, pour m'avoir apportée tout ce dont j'avais besoin pour réussir, de m'avoir permis d'arriver jusqu'ici, en m'offrant de si longues études, mais aussi en me soutenant toujours dans mes choix. Je remercie également mon grand frère **François**, qui s'obstine à penser que, puisque je suis scientifique, je comprends la physique quantique. Bienvenue également à **Valentin**, son petit bout qui est né à peine une semaine avant le dépôt de ce manuscrit. J'espère que ta génération fera de ce monde un monde encore plus beau ! Si estás leyendo esto, gracias a vosotros, abuelitos queridos, y especialmente a ti, Yayo, que me iniciaste en el camino científico ayudándome sin descanso con los deberes de matemáticas. Je remercie également ma belle-famille, **Pia, Christian, Elena** des grands passionnés de mon travail, parfois plus que moi !

¹ L'abus d'alcool est dangereux pour la santé, à consommer avec modération.

Allez deuxième moment prout prout, pour l'un de mes humains préférés. **Serge**, mon émotivité au quotidien est assez expressive pour que tu saches déjà tout héhé. Je voulais te remercier pour ton écoute et ton réconfort, ta patience infinie (parfois mise à mal, désolée...), tes achats compulsifs qui s'avèrent fort utiles et tes repas concoctés avec passion et amour. Tu m'as soutenue dans les périodes les plus difficiles de ma vie et tu m'as apporté un soutien sans faille durant ces trois années de thèse. Je t'en suis éternellement reconnaissante. Après ces 10 ans déjà ensemble, j'ai hâte de découvrir plus encore la vie avec toi.

Enfin, de manière *post-mortem* pour certains, je tiens à remercier tous les petits piafs qui ont participé à mes études de bioénergétiques aviaires. Une pensée particulière pour Chuck et Norris, mes pigeons domestiques que j'ai vu naître dans mon meuble, sur mon balcon Lyonnais et dont je me suis occupée durant plusieurs mois (le soin parental chez les pigeons c'est pas top top). J'espère que vous ne serez jamais amené à croiser la route de Damien !



U.N.A.P.A.F.
Union Nationale des Associations
de Piégeurs Agréés de France



LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Article scientifique publié

Article 4 : **Barbe, J.**, Roussel, D. and Voituron, Y. (2023). Effect of physiological hyperthermia on mitochondrial fuel selection in skeletal muscle of birds and mammals. *Journal of Thermal Biology* 117, 103719. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103719>

Article scientifique en révision

Article 1: **Barbe, J.**, Watson, J., Roussel, D. and Voituron, Y. The allometry of mitochondrial efficiency is tissue-dependent: A comparison between skeletal and cardiac muscles of birds. *En révision dans Journal of Experimental Biology*.

Articles scientifiques cours d'écriture

Article 2: **Barbe, J.**, Rey, B., Voituron Y., and Roussel, D. Effect of body mass on mitochondrial respiration in avian erythrocytes. *En preparation*.

Article 3: **Barbe, J.**, Voituron Y., and Roussel. Allometry of enzymatic and oxidase activities: a multi-tissue approach in birds. *En preparation*.

Article 5: **Barbe, J.**, Voituron Y., and Roussel. Effect of muscle temperatures on the mitochondrial coupling efficiency: the pigeon-rat comparison. *En preparation*.

Communications scientifiques

Barbe, J., Voituron Y., and Roussel. Muscular temperature effect on mitochondrial bioenergetics: a comparison between birds and mammals. 5^{ème} Édition du Colloque d'Écophysiologie Animale (CEPA), 2-4 novembre 2021. Montpellier, France. *Communication orale*.

Barbe, J., Voituron Y., and Roussel. Oiseaux versus mammifères : Et si on parlait mitochondrie ? Animations du LEHNA. 24 janvier 2022. *Communication orale, visioconférence*.

Barbe, J., Voituron Y., and Roussel. Allometric relationships between body mass and mitochondrial efficiency of birds. Montpellier, France. Conférence satellite de la Society for Experimental Biology (SEB), 5-6 juillet 2022. Montpellier, France. *Poster*.

Barbe, J., Voituron Y., and Roussel. Mitochondrial fuel selection in birds and mammals: a question of muscular temperature. Conférence annuelle de la Society for Experimental Biology (SEB), 7-9 juillet 2022. Montpellier, France. *Poster*.

Barbe, J., Voituron Y., and Roussel. Allometric relationships between body mass and mitochondrial efficiency of birds. 27^{ème} Journée Scientifique de l'EDISS (jEDISS), 3 novembre 2022. Lyon, France. *Communication orale*.

Barbe, J., Watson, J., Roussel, D. and Voituron, Y. The effect of body mass on mitochondrial efficiency in birds is tissue dependent. Conférence annuelle de la Society for Experimental Biology (SEB). 4-7 juillet 2023. Edimbourg, Écosse. *Pecha kucha*.

RÉSUMÉ

Les oiseaux et les mammifères sont des endothermes qui, à travers des mécanismes de thermorégulation, maintiennent une température corporelle élevée et relativement constante (36°- 41°C). Seulement, les oiseaux ont la singularité de présenter un taux métabolique, une température corporelle ainsi qu'une longévité supérieure à celle des mammifères de même masse. Les oiseaux semblent alors défier une variété de théories écologiques, laissant penser que les différences établies entre ces deux clades, au niveau du métabolisme et des processus de vieillissement, pourraient être la conséquence d'un fonctionnement mitochondrial distinct. Ma thèse avait pour objectif d'étudier l'efficacité du fonctionnement mitochondrial chez les oiseaux et de le comparer à celui des mammifères, récemment exploré. Il était également question de comprendre comment la masse corporelle et la température corporelle (deux grands déterminants des propriétés biologiques des organismes), affectent le métabolisme énergétique mitochondrial, les performances, le vieillissement et la thermorégulation des endothermes. J'ai ainsi étudié l'effet de la masse corporelle sur la bioénergétique mitochondriale des oiseaux (consommation d'oxygène, synthèse d'ATP, production de ROS et efficacité du couplage mitochondriale), à partir de différents tissus tels que le muscle squelettique, le cœur, le foie et le sang. Des analyses comparatives phylogénétiques ont été utilisées pour étudier les patterns allométriques aviaires. J'ai également effectué un "zoom" sur les patterns allométriques en comparant des mitochondries isolées du muscle squelettique de pigeons et de rats, de masse corporelle similaire, à différentes températures *in vitro* et en utilisant différents substrats mitochondriaux, afin de comparer et décortiquer plus en détail le fonctionnement mitochondrial respectif des oiseaux et des mammifères. Les différents travaux réalisés montrent globalement que l'effet de la masse corporelle sur la bioénergétique mitochondriale des oiseaux est 1) dépendant des tissus considérés, 2) dépendant du niveau d'activation du métabolisme et 3) évolue selon un pattern similaire aux mammifères. Cette thèse montre également l'intérêt de prendre en compte les exigences biologiques des endothermes telles que ; les différences de régulation de la température corporelle en sein des endothermes mais également des préférences d'utilisation des substrats mitochondriaux dans les études comparatives oiseaux/mammifères.

Mots-clés : *Bioénergétique mitochondriale, masse corporelle, température corporelle, oiseau, mammifère, substrat respiratoire, étude comparative, phylogénie.*

ABSTRACT

Title: Endothermy and body mass: effects on mitochondrial bioenergetics

Birds and mammals are endotherms which, through thermoregulatory mechanisms, maintain a high and relatively constant body temperature (36°- 41°C). However, birds are remarkable in that their metabolic rate, body temperature, and longevity are higher than those of mammals of the same mass. Birds therefore seem to challenge various ecological theories, suggesting that the differences observed between these two clades, in terms of metabolism and ageing processes, could be the consequence of a distinct mitochondrial function. The aim of my thesis was to study the efficiency of mitochondrial function in birds and compare it with that of mammals, which has recently been explored. The aim was also to understand how body mass and body temperature (two major determinants of the biological properties of organisms) affect mitochondrial energy metabolism, performance, ageing, and thermoregulation in endotherms. I studied the effect of body mass on mitochondrial bioenergetics in birds (oxygen consumption, ATP synthesis, ROS production, and mitochondrial coupling efficiency), using different tissues such as skeletal muscle, heart, liver, and blood. Comparative phylogenetic analyses were used to study avian allometric patterns. I also 'zoomed in' on allometric patterns by comparing mitochondria isolated from the skeletal muscle of pigeons and rats, of similar body mass, at different in vitro temperatures and using different mitochondrial substrates, to compare and dissect in more detail the respective mitochondrial function of birds and mammals. Overall, the various studies carried out show that the effect of body mass on mitochondrial bioenergetics in birds is 1) tissue-dependent, 2) dependent on the level of metabolic activation, and 3) follows a pattern like that of mammals. This thesis also shows the importance of considering differences in body temperature regulation within endotherms, as well as preferences in the use of mitochondrial substrates in comparative studies between birds and mammals.

Keywords: *Mitochondrial bioenergetic, body mass, body temperature, bird, mammal, respiratory substrate, comparative study, phylogeny.*

Table des matières

RÉSUMÉ.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCTION.....	15
I. DÉTERMINANTS DES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES D'UN ANIMAL	17
1. La masse corporelle	19
2. La température corporelle	23
3. Théorie Métabolique Écologique (MTE)	29
II. METABOLISME ENERGETIQUE	31
1. La mitochondrie : source d'énergie cellulaire, de chaleur et de stress oxydatif.....	32
2. L'efficacité mitochondriale.....	40
III. OBJECTIFS DE LA THÈSE	44
1. Différences métaboliques à l'échelle des endothermes.....	44
2. Comprendre ces différences métaboliques en investiguant à l'échelle mitochondriale.....	47
MATÉRIELS ET MÉTHODES	51
I. MODÈLES D'ÉTUDE.....	53
1. Les oiseaux de la ferme & Co.	53
2. Parc des oiseaux.....	55
3. Pigeon <i>versus</i> Rat.....	58
II. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS MITOCHONDRIAUX.....	59
1. Isolation mitochondriale	59
2. Perméabilisation des globules rouges en vue de la respiration.....	59
3. Homogénats	60
III. MESURE DES PARAMÈTRES BIOÉNERGÉTIQUES MITOCHONDRIAUX	61
1. Respiration mitochondriale	61
2. Synthèse d'ATP	67
3. Production de ROS.....	68
4. Mesure des activités enzymatiques tissulaires et mitochondriales.....	69
IV. PRISE EN COMPTE DE LA PHYLOGÉNIE DANS LES ÉTUDES COMPARATIVES	72

1. Les études comparatives	72
2. Application statistique phylogénétique pour nos oiseaux.....	73
RÉSULTATS	81
CHAPITRE 1 - Patterns allométriques mitochondriaux chez les oiseaux	83
CHAPITRE 2 - Température musculaire, substrat et bioénergétique mitochondriale : cas du couple Pigeon/Rat	133
DISCUSSION & PERSPECTIVES	165
I. RÉSULTATS PRINCIPAUX.....	167
1. Patterns allométriques mitochondriaux des oiseaux	167
2. L'effet de la masse corporelle est dépendant du tissu chez les oiseaux	169
II. COMPARAISON DES PATTERNS ALLOMÉTRIQUES OISEAUX / MAMMIFÈRES...	171
1. Universalité de l'évolution du fonctionnement mitochondrial chez les endothermes ?	171
2. Réflexion autour des patterns allométriques chez les endothermes	175
3. Limites à l'étude allométrique aviaire	179
III. PERSPECTIVES.....	183
1. Explorer le petit pour trouver des liens de causalité.....	183
2. Voir plus grand, plus loin.....	187
RÉFÉRENCES	191



INTRODUCTION

I. DÉTERMINANTS DES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES D'UN ANIMAL

D'un point de vue physique, les organismes sont des systèmes thermodynamiques ouverts, échangeant continuellement de l'énergie et de la matière avec leur environnement. Ainsi la variation de leurs caractéristiques biologiques : traits morphologiques, développementaux, physiologiques, comportementaux et écologiques, se reposent à la fois sur l'effet de facteurs extrinsèques (abiotiques ou biotiques) et intrinsèques. Deux des facteurs, probablement les plus importants, intervenants dans la variabilité des traits des organismes sont la [masse/taille corporelle](#) (facteur intrinsèque) et la [température](#) (facteur intrinsèque et extrinsèque) (Peter, 1983 ; Brown et al., 2004). Des corrélations entre les caractéristiques morphologiques des endothermes² et la température de l'environnement ont par ailleurs été observées sur l'ensemble du globe, faisant émerger différentes lois bio-géographiques, qui décrivent les relations entre la taille/masse et la température (**Figure 1**). Les plus connues sont les lois de Bergmann (1847) et de Allen (1877).

La [loi de Bergmann](#), décrit une relation positive entre la taille/masse du corps et la latitude, les individus plus petits se trouvant à des latitudes plus basses où les climats sont généralement plus chauds (Bergmann, 1847 ; Ray, 1960 ; Gardner et al., 2011 ; Baldwin et al., 2022 ; He et al., 2023). L'explication initiale de cette tendance fait appel à la thermorégulation endothermique ainsi qu'à des arguments géométriques concernant la perte de chaleur. Les corps plus petits ont des surfaces proportionnellement plus grandes et des couches limites plus fines, ce qui leur permet d'évacuer plus efficacement la chaleur par convection. Cette caractéristique est avantageuse dans les climats chauds. Dans les climats froids, il est au contraire plus avantageux d'avoir une surface proportionnellement plus petite (grande taille/masse), pour limiter les pertes de chaleurs avec l'environnement.

Chez les manchots par exemple, le manchot empereur (*Aptenodytes fosteri*) est le plus grand des espèces connues. Il mesure 1,15 mètre et pèse en moyenne 30 kg. Il vit dans les régions

² Animaux pour lesquels la température corporelle est indépendante du milieu : oiseaux et mammifères

Antarctiques alors que le manchot des Galápagos (*Spheniscus mendiculus*) est l'espèce qui vit le plus au nord de l'hémisphère Sud (faible latitude), ne pesant que 2 kg.

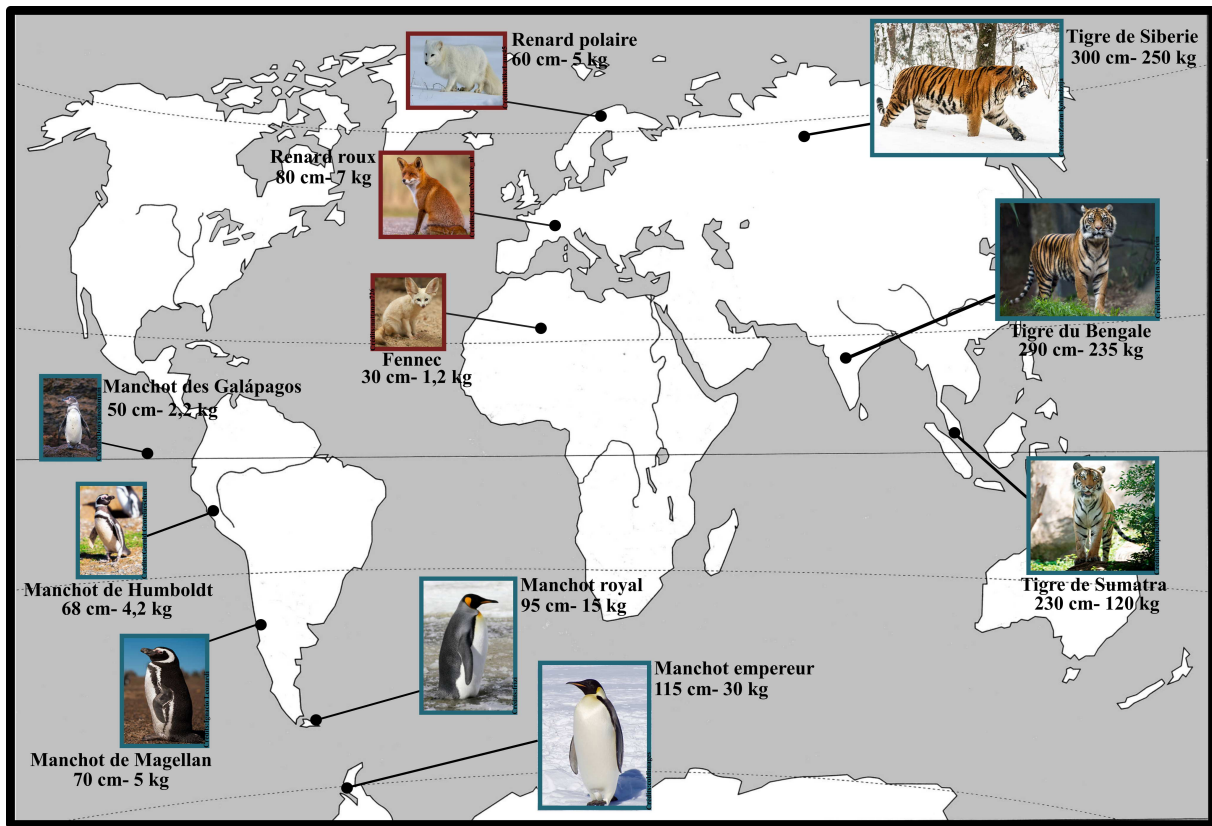


Figure 1 | Exemples d'espèces pour lesquelles, les lois de Bergmann (encadrés bleus) et de Allen (encadrés rouges) s'appliquent.

La **loi de Allen**, prédit que dans les régions chaudes, les animaux ont tendance à avoir des extrémités plus longues et pointues (oreilles, pattes, ailes) et ont un corps plutôt allongé de façon à augmenter leur surface corporelle et évacuer davantage de chaleur. En revanche, les animaux dans les régions où le climat est froid ont généralement un corps compact, des extrémités courtes et sans prolongations, ce qui limite les pertes de chaleur et réduit également les risques de gelure (Allen, 1877 ; Ray, 1960 ; Baldwin et al., 2022 ; He e al., 2023). Chez les renards par exemple, le renard polaire, fait face au froid grâce à des pattes très courtes, des petites oreilles, un petit museau et un pelage très dense. Au du contraire, le fennec du désert, le plus petit des renards, qui dispose de grandes oreilles, très bien irriguées par des vaisseaux sanguins.

En plus de la température ambiante, la **taille/masse corporelle** et la **température du corps** interagissent pour affecter le **taux métabolique**, en plus d'une série de traits écologiques et démographiques des endothermes (Calder, 1984).

1. La masse corporelle

a- Définition et généralités

Pour la plupart des animaux, la masse et taille corporelle sont des caractéristiques universelles et probablement les plus simples à mesurer. Par conséquent, de nombreux chercheurs ont inclus des estimations de ces variables biométriques pour caractériser leurs modèles d'étude et de nombreuses théories empiriques ont alors pu être construites à partir de ces données publiées. Dans les publications scientifiques, le terme de « *body size* » est fréquemment employé pour aborder les phénomènes liés à la taille corporelle par le biais de la masse corporelle « *body mass/weight* ». Paradoxalement, on ne donne que très rarement de définitions claires de ces différents termes, ce qui peut induire de nombreuses confusions dans la bibliographie (Piersma and Davidson, 1991).

En effet, une distinction doit donc être faite entre :

- ✕ **La masse corporelle**, qui combine des informations sur la masse des éléments structuraux (squelette, poils, plumes) mais également des réserves nutritives qui elles-mêmes dépendent de divers paramètres (de l'heure du jour, de l'année, de l'état reproducteur et de la qualité de l'habitat). Cela explique pourquoi la masse corporelle constitue la variable privilégiée dans les études sur l'énergétique (Piersma and Davidson, 1991).
- ✕ **La taille structurelle**, qui est indépendante des réserves nutritionnelles est considérée comme un caractère unique, estimé par une combinaison de mesures de différentes parties du corps. On utilise cette variable plutôt dans les études sur les variations de taille géographiques, des études mécanistiques ou pour l'interprétation de fossiles retrouvés (Dobson, 1992; Nudds et al., 2011; Field et al., 2013).

Dans un souci de clarté, je propose de garder tout au long de cette thèse, le terme de masse corporelle, désignant ainsi la variable biométrique étudiée dans mon travail sur le métabolisme énergétique des endothermes.

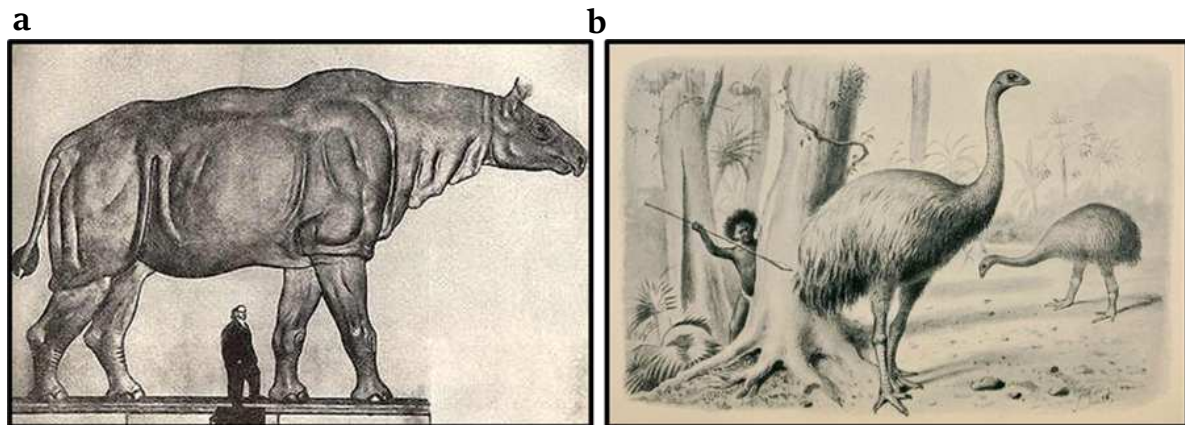


Figure 2 | Représentations du, **a**) Rhinoceros géant (*Baluchitherium*) et **b**) Oiseau-éléphant (*Aepyornis maximus*), respectivement, le plus grand mammifère terrestre et le plus grand oiseau non volant ayant vécu.

La masse corporelle est une variable quantitative, continue, s'échelonnant actuellement sur 8 ordres de grandeur chez les endothermes (oiseaux et mammifères) (Schmidt-Nielsen, 1975; Calder, 1984). La baleine bleue est le plus grand mammifère marin mais également le plus grand animal ayant jamais vécu (100 tonnes). Et si aujourd'hui le plus grand animal terrestre reste l'éléphant d'Afrique dont la masse avoisine les 7 tonnes, il n'en a pas toujours été ainsi. En effet, le plus grand mammifère terrestre était un parent herbivore du rhinocéros, le *Baluchitherium*, datant de l'Oligocène (**Figure 2.a**). On estime qu'il pesait plus de 30 tonnes (Schmidt-Nielsen, 1975) ce qui correspond à un peu plus de 4 fois la masse d'un éléphant de taille normale. Côté oiseaux, le record est détenu par l'oiseau-éléphant (**Figure 2.b**), pesant près d'une demi-tonne et dont l'extinction date du 17^{ème} siècle. Il est évident que les tendances évolutives vers une plus grande masse corporelle ont été corrélées à la fois au temps (loi de Cope) et à la latitude (règle de Bergmann). Cependant, la simple présence du colibri d'Elena (*Mellisuga helenae*, ~2 g) et de la musaraigne étrusque (*Suncus etruscus*, ~2 g) n'exclue pas une sélection naturelle vers des animaux plus petits. Ces tendances atteignent finalement des limites puisqu'il n'y a pas eu d'extrêmes d'oiseaux et de mammifères plus petits ou plus grands que ceux que nous connaissons aujourd'hui (Calder, 1984).

b- Relations allométriques

La masse corporelle est certainement l'un des éléments les plus fondamentaux et les plus significatifs qui caractérisent les propriétés biologiques d'un animal mais également un facteur majeur dans l'histoire de vie de celui-ci (Peters, 1983; Calder, 1984). On définit les études reliant la masse corporelle d'un organisme à divers paramètres biologiques comme de **l'allométrie** (littéralement : études des différences). L'allométrie est particulièrement utile pour la biologie comparative et a été largement explorée dans l'ensemble du domaine du vivant (Hatton et al., 2019; Peters, 1983; West and Brown, 2004a; West and Brown, 2005), pour lequel la masse corporelle influence l'ensemble des processus et des structures biologiques, de l'échelle subcellulaire à la structure et dynamique populationnelle (Peters, 1983; Calder, 1984; Hulbert et al., 2002b; Brand et al., 2003; Else et al., 2004; West and Brown, 2005; Turner et al., 2006; Chamberlain and Holland, 2009).

ENCADRÉ 1



Le désert de Sonora (Mexique) abrite de nombreuses espèces végétales pour lesquelles des réseaux mutualistes fourmis-plantes se sont établies. Les fourmis consomment des ressources de nectar extrafloral produites par les plantes et, en retour, protègent les plantes des herbivores. Il a été montré que le nombre d'espèces de plantes avec lesquelles les fourmis interagissent augmente avec la taille du corps de la fourmi (Chamberlain and Holland, 2009).



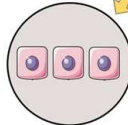
A la fin des années 70, le climat de l'océan Pacifique Nord a radicalement changé et de nombreuses populations de saumons ont vu leur abondance augmenter et leur taille diminuer jusqu'au début des années 1990 (Helle et al., 2007). Cette corrélation négative de la taille des saumons avec l'abondance populationnelle n'est pas un cas isolé puisque la loi de Damuth (1987) en prédit un cadre général pour les grands groupes d'animaux et de plantes.



L'éléphant d'Afrique pèse en moyenne 6 tonnes contre 30 grammes pour une souris. Le pachyderme est alors 200 fois plus lourd que le petit rongeur mais de façon surprenante, 1 gramme de souris demandera plus d'énergie que 1 gramme d'éléphant pour fonctionner. La loi de Kleiber (1932) en prédit un cadre général pour tous les organismes vivants.



La taille et ses conséquences : la masse/taille des organes est l'un des exemples les plus faciles pour mesurer les « différences de proportions » liées à des changements dans les grandeurs absolues de l'organisme (Calder, 1984). Il est donc logique que le cœur d'une baleine soit relativement plus grand que celui d'un poisson.



L'acide docosahexaénoïque ou DHA est un acide gras poly-insaturé de la famille des oméga-3. Il apparaît que le contenu membranaire de cet acide gras chez les oiseaux et les mammifères est corrélé négativement à leur masse corporelle (Hulbert et al. 2002).

De nombreuses variables peuvent être corrélées à la masse corporelle d'un animal et dont le caractère quantitatif de la corrélation n'est pas toujours le même à toutes les échelles et pour toutes les fonctions (Calder, 1984). Les relations allométriques sont généralement exprimées sous forme de la **loi de puissance** :

$$Y = aM^b$$

Equation 1

Où Y correspond à un caractère physiologique, morphologique ou écologique qui apparaît être corrélé avec la masse corporelle (M), exprimé en kg ou g. On appelle cela une loi de puissance parce que la variable dépendante change en fonction d'une certaine puissance de la variable indépendante, décrit par l'exposant allométrique b (« **scaling exponent** »).

Pour les analyses, la loi de puissance (équation 1) est généralement transformée en logarithme, ce qui donne une relation linéaire entre $\log Y$ et $\log M$ (équation 2), b étant estimé par la pente de régression et a étant estimé par l'ordonnée à l'origine (« **scale intercept** ») :

$$\log(Y) = \log(aM^b)$$

Equation 2

$$\log(Y) = \log a + b \log(M)$$

Dont la forme ressemble à celle d'une équation de droite :

$$Y' = \text{intercept} + \text{pente } x$$

Equation 3

c- Conséquence de la masse sur le métabolisme

L'une des relations allométriques les plus fréquemment étudiées est celle entre la masse et le **taux métabolique de base** (BMR). La valeur et l'importance de l'exposant allométrique métabolique b a suscité beaucoup d'intérêt au cours des 150 dernières années.

À la fin des années 1880, de nombreux biologistes ont soutenu l'idée que l'effet de la masse sur le métabolisme pourrait refléter des processus géométriques et physiques simples. Rubner (1883) a été le premier à formuler que : puisque la chaleur produite par les processus métaboliques doit être perdue à travers la surface du corps, le taux métabolique serait proportionnel à la surface corporelle et qui, de plus est, proportionnel à la masse corporelle élevée à la puissance ($M^{2/3}$). Cette découverte, connue sous le nom de « loi de Rubner » ou « loi de surface », n'a pratiquement pas été remise en question pendant près de 50 ans, jusqu'à la publication influente de Max Kleiber (Kleiber, 1932). En effet, en obtenant des estimations de BMR chez un grand nombre d'espèces de mammifères, Kleiber a trouvé expérimentalement un exposant allométrique b proche de $3/4$ pour décrire la relation entre le métabolisme et la masse corporelle plutôt que l'exposant prédit auparavant par la « loi de Rubner ».

Des études ultérieures (Brody, 1945 ; Kleiber, 1961, Schmidt-Nielsen, 1983) sur le BMR des mammifères et d'autres organismes, y compris des bactéries (Hemmingsen, 1960) établissent

l'existence d'un exposant universel de $\frac{3}{4}$ pour lequel on établit la « loi de puissance $\frac{3}{4}$ » ou « loi de Kleiber » suggérant ainsi que cet effet biologique n'était pas seulement l'apanage des mammifères, mais plutôt la marque de fabrique de tous les organismes. A la fin du 20^{ème} siècle/début 21^{ème}, le débat sur la théorie expliquant le mieux la nature de l'exposant allométrique reprend avec ferveur. Certains biologistes, surtout théoriciens, soutiennent la théorie selon laquelle l'exposant allométrique de $\frac{3}{4}$ sous-tend toute la diversité biologique invoquant la nature fractale du réseau vasculaire de distribution chez les animaux (West and Brown, 2004a; West and Brown, 2005; West et al., 1997; West et al., 1999; West et al., 2002). Alors que de nombreux autres biologistes estiment que les hypothèses pour la loi $\frac{3}{4}$ sont peu convaincantes pour rejeter l'hypothèse nulle selon laquelle l'exposant serait plutôt de $\frac{2}{3}$ (Dodds et al., 2001; White and Seymour, 2003; White and Seymour, 2005). Des ensembles de données ont alors été étudiés et pour lesquels il a été observé que l'exposant allométrique métabolique b était très variable, couvrant une large gamme de valeur. Les grands mammifères sont généralement décrits par un exposant $b=\frac{3}{4}$, alors que chez les petits mammifères et plusieurs espèces d'oiseaux, on observe plutôt un $b=\frac{2}{3}$ (Dodds et al., 2001; White and Seymour, 2003). Il n'existerait probablement pas d'exposant universel unique et cet exposant n'exprimerait donc pas un simple principe physique mais refléterait une variété de mécanismes biologiques. C'est finalement à partir des années 2010 que l'on accepte la nature variable de cet exposant allométrique (Feldman, 1995; Demetrius, 2006; Glazier, 2010; Beaman et al., 2020; Glazier, 2022) dont on établit les sources de variations (degrés d'activité de l'organisme, phylogénie, divers facteurs environnementaux...).

2. La température corporelle

La température, au sens large, est l'un des grands facteurs physiques et abiotiques. L'étude des effets de la température est l'un des domaines les plus prolifiques de la biologie fonctionnelle : de la structure de base des macromolécules jusqu'à la vitesse à laquelle les réactions chimiques se produisent, la température influence pratiquement tous les aspects de la physiologie d'un organisme (Cossin et Bowler, 1987 ; Schmidt-Nielsen, 1997 ; Gillooly et al., 2001).

La température constitue le principal déterminant climatique de la répartition des espèces (Jeffree and Jeffree, 1994). Sur Terre, les températures les plus froides enregistrées proviennent des régions polaires (-89.2°C) tandis que les températures les plus chaudes enregistrées atteignent les 56.7°C (USA). La Terre serait finalement « froide » avec une température moyenne de 15°C ([World Meteorological Organization](#)).

ENCADRÉ 2



La **température** est une description de l'intensité du mouvement cinétique des atomes et molécules constitutifs d'un système (Cossins et Bowler, 1987). Ainsi, une hausse de température augmente le mouvement et l'énergie des molécules qui interagissent et ainsi accélère les vitesses des réactions biochimiques, enzymatiques, métaboliques et presque toutes les autres activités biologiques. La cinétique des réactions varie en fonction de la température (augmente de façon exponentielle avec la température) et est décrite par le facteur de Boltzmann ou la relation Van't Hoff-Arrhenius (Arrhenius 1889 ; Boltzmann 1872 ; Brown et al., 2004 ; Gillooly et al., 2001) :

$e^{-E/kT}$ où T est la température absolue (en degrés K), E est l'énergie d'activation et k est la constante de Boltzmann.

a- Les stratégies d'adaptation thermique des animaux

Les animaux sont continuellement influencés par des échanges de chaleur avec leur environnement, se faisant par le biais de quatre mécanismes physiques de transfert d'énergie thermique (chaleur) : le rayonnement, la conduction, la convection et l'évaporation (Schmidt-Nielsen, 1997 ; Sherwood et al., 2012). Ces échanges thermiques entre l'organisme (température interne) et l'environnement (température externe) peuvent avoir d'importantes conséquences sur l'organisme puisque les réactions chimiques et enzymatiques qui conditionnent le métabolisme sont liées à la température du milieu interne. Ainsi, pour permettre une optimisation du fonctionnement de l'organisme, les animaux utilisent différents processus assurant l'homéostasie thermique que l'on nomme **thermorégulation** (Schmidt-Nielsen, 1997, (Mota-Rojas et al., 2021; Tansey and Johnson, 2015)). La thermorégulation est un processus neuronal qui fait correspondre l'information sur l'environnement externe avec la réponse animale appropriée (thermogénèse ou thermolyse) pour maintenir un environnement interne plus ou moins stable par rapport aux variations externes (Morrison et al., 2008; Seebacher, 2009).

Les physiologistes classent généralement les animaux en deux grandes catégories : les **endothermes** (endo, « interne »), ceux qui dépendent principalement de sources internes pour

leur chaleur corporelle et les **ectothermes** (ecto, « externe ») - ceux qui dépendent de sources externes pour leur chaleur corporelle (Sherwood et al., 2012 ; Lovegrove, 2017). Ces derniers représentent 99% des espèces animales présentes sur Terre (reptiles, insectes, poissons, amphibiens) et utilisent généralement des processus de thermorégulation comportementale, dépendant ainsi de décisions volontaires (Mota-Rojas et al., 2021). Les comportements de thermorégulation les plus basiques consistent à rechercher des habitats chauds (se réchauffer au soleil) ou froids (se mettre à l'abri du soleil) permettant ainsi à l'organisme de contrôler son taux de perte ou de gain de chaleur (Seebacher, 2009; Flouris and Piantoni, 2015; Mota-Rojas et al., 2021). Ainsi, chez ectothermes, les variations thermiques de l'environnement peuvent déterminer la température corporelle et donc affecter le métabolisme de manière thermodynamique.

Les endothermes (oiseaux, mammifères) utilisent également certains processus de thermorégulation comportementale et sociale (Batchelder et al., 1983; Gilbert et al., 2006; Terrien, 2011) comme par exemple le déplacement dans des niches thermiques favorables (migration, enfouissement dans des terriers) ou les regroupements (« turtle huddling ») des Manchots empereurs. La différence avec les ectothermes est que la thermorégulation et la régulation des fonctions cellulaires sont étroitement liées car le métabolisme cellulaire génère également la chaleur qui détermine la température corporelle. Les endothermes utilisent alors principalement des processus de thermorégulation physiologique comme la vasodilatation/vasoconstriction, la sudation (Tansey and Johnson, 2015), la thermogénèse avec ou sans frisson (Janský, 1973; Duchamp et al., 1991; Lovegrove, 2017).

b- Les oiseaux et les mammifères : représentants du clade des endothermes

Origine des oiseaux et des mammifères

En 1861, le paléontologue Allemand Hermann von Meyer découvre dans les dalles calcaires lithographiques de Solnhofen (Bavière) les restes d'un spécimen que l'on nommera *Archæopteryx* et datant du jurassique (~ 160 Ma). L'origine de ce spécimen fait débat dans la communauté scientifique pendant de nombreuses années puisque *Archæopteryx* possède des éléments communs aux dinosaures et aux oiseaux. Tous deux cohabitent jusqu'à la catastrophe

menant à la crise du Crétacé-Tertiaire il y a 65 Ma. Cette crise entraîne la disparition en masse de tous les dinosaures et des oiseaux aux formes archaïques laissant les oiseaux modernes se diversifier par radiation évolutive au cours du Tertiaire pour donner nos espèces actuelles (Longrich et al., 2011). En 2022, on répertorie plus de 11 000 espèces d'oiseaux vivant sur notre planète (<https://www.iucnredlist.org>). Leur expansion a été facilitée par l'acquisition de l'aile puis par la conquête du ciel. Ils ont conquis tous les milieux depuis 150 millions d'années et sont présents sous toutes les latitudes. Les oiseaux jouent un rôle important dans les écosystèmes en régulant les populations d'insectes, en pollinisant les fleurs et en disséminant les graines (Whelan et al., 2008).

Au cours de l'évolution, les reptiles mammaliens vont se différencier en un groupe qui est les Cynodontes, un groupe avancé des thérapside (Crompton and Jenkins, 1973) et qui aboutira aux premiers vrais mammifères (Trias moyen : 220 Ma). Les mammifères sont surtout connus et caractérisés par la présence de poils (exception pour certains mammifères marins), et de glandes mammaires permettant la lactation des petits. On répertorie un peu moins de 6 000 espèces mammaliennes (<https://www.iucnredlist.org>), réparties en trois grands groupes : les mammifères placentaires, marsupiaux et monotrèmes. Les mammifères placentaires ont colonisé tous les milieux (marin, terrestre et aérien), les marsupiaux quant à eux, se répartissent sur une zone très restreinte (Australie, Tasmanie, Nouvelle-Guinée).

L'endothermie a évolué au moins deux fois, dans les lignées des mammifères (thérapside) et des oiseaux (théropodes) (Clarke and Pörtner, 2010; Hedrick and Hillman, 2016)

Définition, avantages et inconvénients de l'endothermie

L'endothermie est caractérisée par une température corporelle interne élevée (36-41°C) et relativement constante (homéothermie).

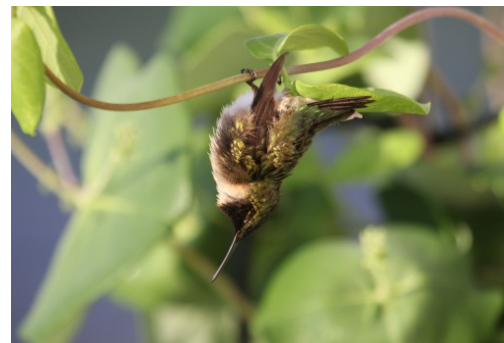
Les oiseaux et les mammifères partagent donc les avantages conférés par la chaleur (via la thermorégulation), tels que le réglage fin du métabolisme, l'extension de l'activité de jour à la nuit, des capacités plus élevées d'activités soutenues (vol, course) à travers une puissance musculaire élevée, une croissance rapide et un degré important d'indépendance par rapport à la température ambiante (McNab, 1974; Bennett and Ruben, 1979; Lovegrove et al., 1991; Clarke

and Pörtner, 2010; Lovegrove, 2017), une expansion de l'aire de répartition climatique mais également le contrôle de la température d'incubation avec des avantages pour les soins parentaux (Grigg et al., 2021).

L'endothermie a cependant un coût d'entretien élevé, car les taux métaboliques élevés qui lui sont associés sont énergétiquement très coûteux et nécessitent une grande quantité de nourriture. Dans la nature, ce coût énergétique pour les endothermes, est considérable par rapport à celui des ectothermes comme les reptiles. Par exemple, les mammifères et oiseaux de masse moyenne ont des « *field metabolic rates* » et des besoins alimentaires similaires, mais 17 fois plus élevés que ceux des ectothermes de masse similaire (Nagy, 1987).

Variation de la température corporelle

Face à un environnement contraignant (froid), la température corporelle peut être sujette à des variations temporelles et n'est donc pas toujours élevée ou constante. On utilise alors le terme d'**hétérothermie**, définissant un abaissement significatif ($>2^{\circ}\text{C}$) des températures corporelles pendant plusieurs heures à plusieurs mois (Schmidt-Nielsen, 1979). Par exemple, l'endothermie peut être temporairement interrompue pendant les périodes de torpeur ou d'hibernation, en suspendant le maintien des températures élevées et en diminuant de nombreuses activités physiologiques (Geiser, 1988; Geiser, 2004; Krüger et al., 1982; Mckechne and Lovegrove, 2002).



Colibri à gorge rubis en torpeur
Crédits : Mary Ann Jacobs

La température corporelle peut également présenter une variabilité circadienne, pour laquelle l'amplitude de l'oscillation diminue avec l'augmentation de la masse corporelle (Prinzinger et al., 1991; Refinetti, 1999; Angilletta, 2009). Certaines espèces sont sujettes à des changements de température corporelle en fonction de la saison et des périodes de reproduction (Veghte, 1964; Dawson and Carey, 1976; Prinzinger et al., 1991).

La réduction des températures peut également se restreindre à certaines régions du corps et l'on parlera alors d'hétérothermie régionale. En effet, les régions périphériques et les membres ont un rapport surface/volume élevé qui rend vulnérable à une perte de chaleur et en même temps utiles pour évacuer la chaleur et ainsi protéger les organes internes comme le cœur (McCafferty et al., 2017; Stawski et al., 2014; Rummer et al., 2021). L'hétérothermie chez les endothermes peut également dépendre de l'activité métabolique et donc d'une variation de température corporelle au niveau des muscles locomoteurs (Prinzinger et al., 1991). En effet, la température corporelle des endothermes présente des valeurs plus basses en phase de repos et des valeurs plus élevées en phase active ou de forte activité en raison de la production de chaleur par la contraction musculaire. Alors que la température moyenne des oiseaux est de $\sim 41^{\circ}\text{C}$ et celle des mammifères placentaires de $\sim 37^{\circ}\text{C}$, on a constaté qu'elle augmentait pendant les phases actives pour atteindre $\sim 44^{\circ}\text{C}$ chez les oiseaux (McNab, 1966; Prinzinger et al., 1991) et $\sim 42^{\circ}\text{C}$ dans les muscles des mammifères pendant l'exercice (Saltin et al., 1968; Brooks et al., 1971). Ainsi, les muscles squelettiques, en particulier ceux qui soutiennent la locomotion, peuvent être exposés à des changements de température considérables (dû à l'hétérothermie régionale), ce qui peut modifier la flexibilité comportementale et physiologique des endothermes pour réguler leur température corporelle et assurer une locomotion efficace.

c- Température, métabolisme et masse corporelle

Le taux métabolique de l'organisme entier varie en fonction de la masse corporelle mais augmente également de manière exponentielle avec la température (**Figure 3**). Les variations du taux métabolique des organismes en fonction de la masse corporelle et de la température sont connues depuis longtemps. On retrouve notamment le travail de Hemmingsen (1960), complétant ceux de Kleiber (1932) et Brody (1945), pour lequel il semble que les relations métaboliques suivent la loi $3/4$ (**Figure 3.a**) chez les organismes unicellulaires, les ectothermes et les endothermes. Par la suite, White et al., (2006) ont utilisé les données de 938 espèces allant de 158 mg à 138 kg, et couvrant toutes les principales classes de vertébrés et chaque groupe a été

comparé à une température standard (38°C et 20°C), après prise en compte des effets du Q_{10} ³. Cette fois-ci, des arguments solides ont été avancés en faveur d'un exposant de 2/3 pour les petits mammifères et les oiseaux (**Figure 3.b**). Il apparaît également une différence d'intercept (a, *équation 1*) entre les ectothermes et les endothermes.

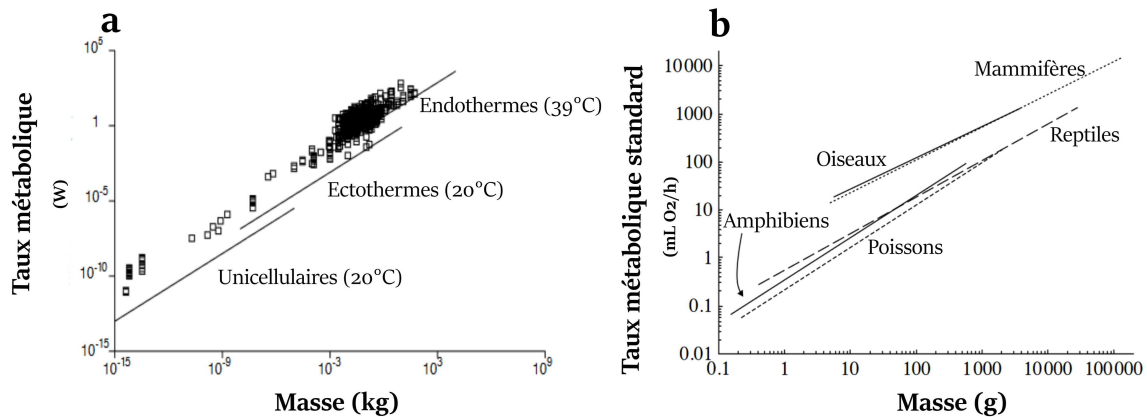


Figure 3 | Relations entre le taux métabolique de base et la masse corporelle chez les organismes unicellulaires, les ectothermes et les endothermes. **a)** Figure adaptée de Gillooly et al., 2001 et adaptée à partir des travaux de Hemmingsen (1960). La valeur de la pente commune correspond à 0.751 ± 0.015 . **b)** Figure adaptée de White et al., 2006 représentant les relations entre le taux métabolique standard (SMR) normalisé à une température corporelle de 38°C et la masse corporelle pour les mammifères, les oiseaux, les reptiles, les amphibiens et les poissons. La valeur de la pente pour les oiseaux et les mammifères est de 2/3 et diffère de celle d'Hemmingsen (1960).

En conséquence, les animaux endothermiques (oiseaux et mammifères) dont la température corporelle est relativement élevée, auront un taux métabolique également plus élevé que les ectothermes (par exemple les reptiles et les amphibiens). En effet, pour une masse comparable, un ectotherme aura un métabolisme entre 12 et 20 fois inférieur (Nagy, 2005; Nagy et al., 1999) ainsi qu'une consommation d'oxygène entre 24 et 30 fois plus faible que celui d'un endotherme (Gillooly et al., 2017).

3. Théorie Métabolique Écologique (MTE)

La température corporelle est une variable indépendante aussi pratique et commode que la masse corporelle. Cependant, contrairement à la masse corporelle, l'effet de la température sur les activités chimiques et biochimiques repose sur une justification physico-chimique solide. Par

³ L'effet de la température sur un processus biologique est traditionnellement exprimé sous la forme d'un Q_{10} , qui quantifie la dépendance à la température dans une plage de température limitée (10°C).

conséquent, nous pouvons supposer que la température corporelle aura un effet significatif sur les taux biologiques seule ou en interaction avec l'effet de la masse corporelle (Peters, 1983).

D'ailleurs, dans les années 2000, une théorie quantitative appelée « théorie métabolique écologique (MTE) » a été développée pour expliquer comment le métabolisme varie en fonction de la masse corporelle et de la température corporelle des organismes (West et al., 1997; Brown et al., 2004). Elle soutient que la minimisation des coûts de l'approvisionnement en sang (et donc en oxygène) des tissus dans le système cardiovasculaire d'un vertébré (structure fractale) exige que le métabolisme basal soit proportionnel à la masse M tel que $M^{0,75}$. Cette théorie métabolique affirme que l'allométrie métabolique serait fondamentale et causale pour de nombreuses autres allométries fonctionnelles (**Figure 4**).

La MTE aurait pour but de prédire comment le taux métabolique, en fixant les taux d'absorption des ressources de l'environnement et d'allocation des ressources à la survie, à la croissance et à la reproduction, contrôle les processus écologiques à tous les niveaux

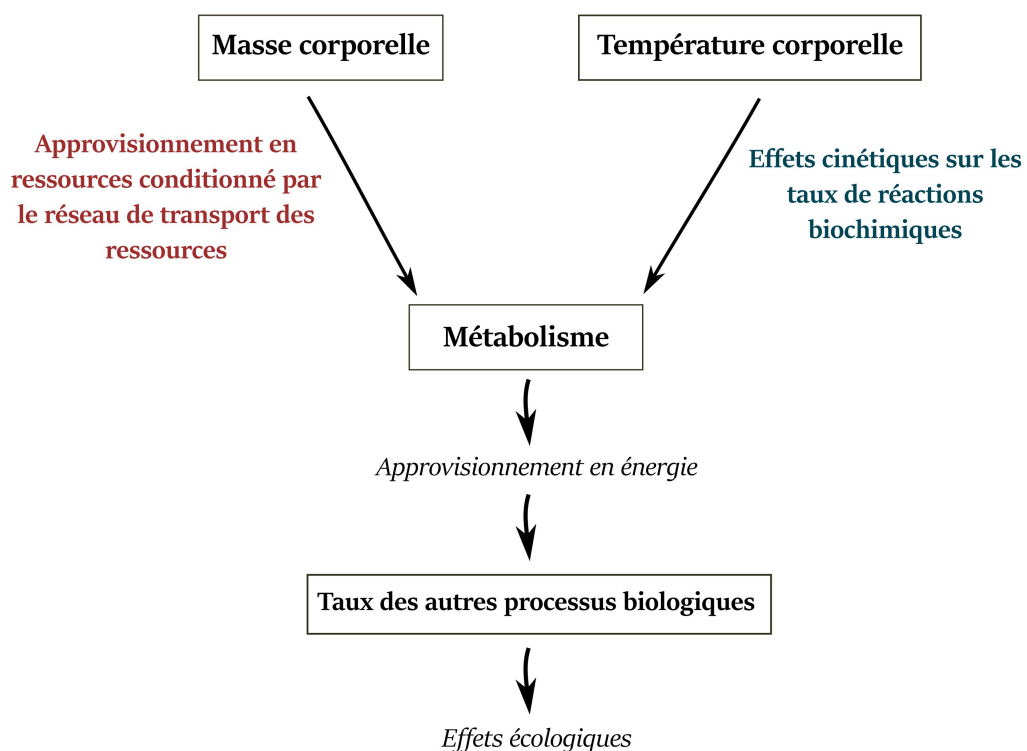


Figure 4 | Représentation schématique modifiée de Glazier (2015), basée sur la théorie métabolique de l'écologie (MTE). Le flux de contrôle unidirectionnel allant de la masse corporelle et de la température (agissant indépendamment selon des lois physiques) au métabolisme et à d'autres taux de processus biologiques, qui ont ensuite des effets écologiques variés. Le réseau de transport des ressources limiterait l'approvisionnement en ressources des cellules métaboliques.

d'organisation : du niveau moléculaire au niveau de l'écosystème (Brown et al., 2004; West and Brown, 2005; West et al., 1997). En résumé, l'idée de cette théorie unificatrice était de servir de fondement conceptuel à une grande partie de l'écologie. Seulement cette théorie se voit vivement critiquée pour de nombreuses raisons analytiques, conceptuelles et théoriques (Dodds et al., 2001; White et al., 2007; Glazier, 2010; Glazier, 2015; Kozłowski et al., 2020; Glazier, 2022), et dont certaines ont déjà été discutées dans les sections I.1 et I.2.

Même si aujourd'hui de nombreux auteurs utilisent la MTE comme base théorique dans leurs études, elle semble malheureusement offrir une vision incomplète et trop simplifiée du rôle du métabolisme dans le rythme de vie. Le débat encore bien actif dans la littérature actuelle, propose d'avoir une vision plus complexe et élargie impliquant des interactions multidirectionnelles (et non unidirectionnelles, **Figure 4**) entre le métabolisme, la masse, la température corporelle et d'autres processus (Glazier, 2015).

II. METABOLISME ENERGETIQUE

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions biochimiques qui se produisent dans les cellules des organismes vivants. Les processus métaboliques impliquent de nombreuses voies cellulaires interconnectées afin de fournir aux cellules l'énergie nécessaire à l'accomplissement de leurs fonctions. L'importance et l'avantage évolutif de ces voies sont évidents car nombre d'entre elles restent inchangées chez les animaux, les plantes, les champignons et les bactéries. Chez les eucaryotes, les voies métaboliques se déroulent dans le cytosol et les mitochondries des cellules, l'utilisation du glucose ou des acides gras fournissant la majorité de l'énergie cellulaire chez les animaux (Judge and Dodd, 2020).

*Un processus clé de la bioénergétique, fait intervenir les **mitochondries**, responsables du couplage chimio-osmotique de l'oxydation phosphorylante (Mitchell, 1961).*

1. La mitochondrie : source d'énergie cellulaire, de chaleur et de stress oxydatif

Connues depuis plus d'un siècle, les mitochondries sont un important sujet de recherche dans plusieurs disciplines de la biologie et de la médecine. Les troubles inhérents aux mitochondries, entraînent une perturbation majeure du métabolisme et peuvent provoquer des maladies métaboliques (obésité, diabète), neurodégénératives et des myopathies (Chinnery and Schon, 2003; Duchen, 2004; Johannsen and Ravussin, 2009; Larsson, 2010; Vernochet and Ronald Kahn, 2012). Les questionnements autour du rôle, de l'évolution, des propriétés et des limites fonctionnelles des mitochondries sont actuellement en plein essor.

Elles sont surtout connues pour être le siège de la respiration cellulaire et pour leur rôle prépondérant dans le métabolisme énergétique via leurs capacités à oxyder des substrats et à produire la majeure partie de l'énergie (ou ATP) nécessaire à la cellule.

a- Origine et Structure

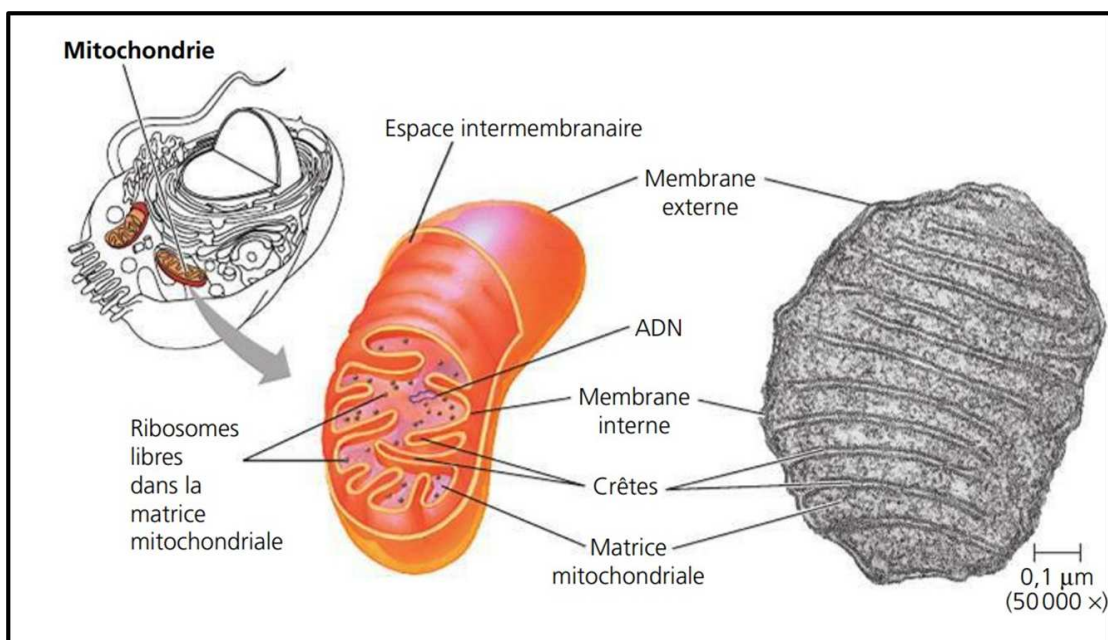


Figure 5 | Schéma et micrographie électronique (MET) d'une mitochondrie. Illustration tirée de Campbell Biologie, 9^{ème} édition (2012).

Les mitochondries sont présentes dans la très grande majorité des cellules **eucaryotes** (végétaux, animaux, eumycètes et protistes). L'origine de cet organite serait l'endosymbiose (*Théorie endosymbiotique* d'après Schimper, 1883 et Margulis, 1971). Un ancêtre lointain des cellules eucaryotes aurait absorbé un procaryote, non photosynthétique et aérobie. Au fil de l'évolution, la cellule hôte et son endosymbionte aurait fusionné pour ne former qu'un seul organisme, soit une cellule eucaryote renfermant une mitochondrie devenant un composant cellulaire à part entière.

Les mitochondries mesurent de 1 à 10 μm de long et 0,5 à 1 μm de largeur. Elles se composent de deux membranes, une externe et une interne, qui délimitent trois milieux : le milieu extra-mitochondrial (cytoplasme de la cellule), l'espace intermembranaire et la matrice (**Figure 5**). Alors que la membrane externe est lisse, la membrane interne est repliée sur elle-même, formant ainsi des crêtes mitochondriales dans lesquelles sont retrouvés les composants de la **chaîne respiratoire mitochondriale** (CRM) ou **chaîne de transports des électrons** (CTE).

La membrane externe constitue une barrière semi-perméable (poreuse) avec le cytosol, qui permet l'échange de métabolites, d'ions et de précurseurs passant par des protéines membranaires que l'on appelle des porines mitochondriales (Bay and Court, 2002; Becker and Wagner, 2018). Les molécules plus grosses, en particulier les protéines, doivent être importées par des translocases spéciales (Paschen and Neupert, 2001; Krüger et al., 2017; Araisio et al., 2022). En raison de sa porosité, il n'y a pas de potentiel membranaire à travers la membrane externe. En revanche, la membrane interne permet la diffusion de petites molécules non chargées (comme l'eau, l'oxygène, le dioxyde de carbone, l'ammoniaque) contrairement aux molécules chargées comme les ions H^+ , qui nécessitent des systèmes de transports spécifiques (Bhagavan, 2002 ; O'Rourke, 2007). La membrane interne est le lieu de l'**oxydation phosphorylante** (OXPHOS) où une série de complexes protéiques membranaires (chaîne de transport des électrons) créent un potentiel électrochimique de proton d'environ 140-220 mV, qui est ensuite consommé par une ATP synthétase membranaire afin de synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate.

Les mitochondries possèdent leur propre génome (ADNmt) codant pour 13 protéines, principalement liées à l'oxydation phosphorylante. Toutes les autres protéines mitochondriales, nécessaires au fonctionnement de cet organite, sont codées par le génome nucléaire et sont

importées dans les mitochondries. Les deux génomes doivent donc travailler en synergie (Annesley et Fisher, 2019). Une mauvaise interaction entre les deux génomes engendre de nombreux dysfonctionnement affectant de nombreux processus physiologique et écologique (Wolff et al., 2014). Leur nombre des mitochondries dépend généralement de l'activité métabolique de la cellule. Aussi, leur structure et leur organisation fonctionnelle témoignent d'une haute spécialisation cellulaire, laquelle est étroitement liée aux besoins métaboliques des tissus.

Les mitochondries sont loin d'être des organites cylindriques statiques puisqu'elles se déplacent, modifient leur forme, s'organisent en réseau tubulaire coordonné par des événements de fusion (union de deux mitochondries en une seule) et de fission (division d'une mitochondrie en deux mitochondries filles) (Westermann, 2012; Bliet et al., 2013; Tilokani et al., 2018; Giacomello et al., 2020). L'équilibre entre ces deux processus opposés régule le nombre, la taille et le positionnement des mitochondries dans le cytoplasme et est appelé « **dynamique mitochondriale** ».

b- La mitochondrie : usine énergétique de notre cellule

L'**ATP** constitue la source d'énergie chimique, directement utilisable par les cellules. Les organismes aérobies produisent l'ATP principalement par deux voies métaboliques : la glycolyse dans le cytosol et l'oxydation phosphorylante au niveau de la membrane interne mitochondriale (**Figure 6**). Ce dernier processus représente la majorité de la production d'énergie de la cellule (90 %) et fournit 17 fois plus d'ATP que la glycolyse, pour une même quantité de glucose dégradée. Environ 90 % de l'oxygène inspiré par les organismes est consommé par la mitochondrie (Rolfe and Brown, 1997). Lors des processus d'oxydation phosphorylante, la synthèse d'ATP par la mitochondrie est donc principalement couplée à cette consommation d'oxygène.

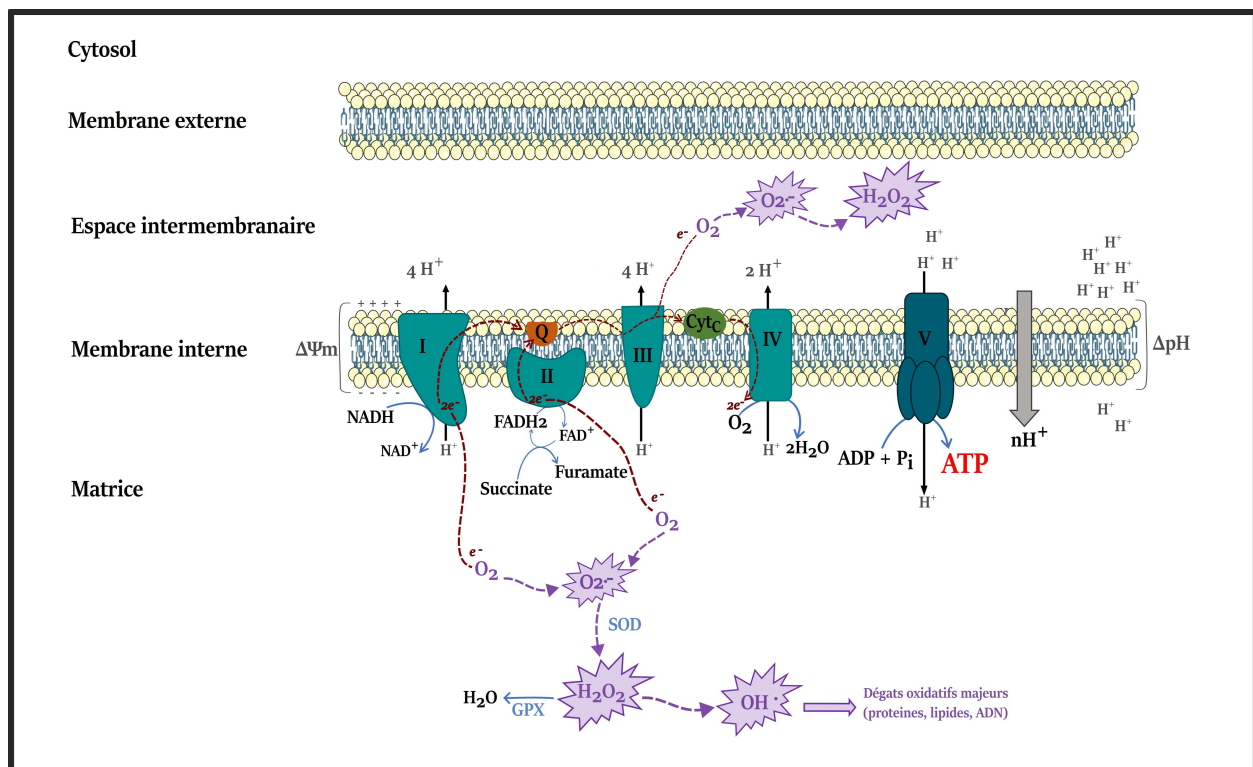


Figure 6 | Schéma du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. I : NADH-ubiquinone oxydoréductase ; II : succinate-ubiquinone oxydoréductase ; III : cytochrome bc1 ; IV : cytochrome c oxydase ; V : Fo/F1-ATP synthétase ; Q : ubiquinone ; Cyt_c : cytochrome c ; $\Delta\Psi_m$: potentiel de membrane mitochondrial ; ΔpH : gradient électrochimique de proton. En pointillés rouges est représenté le flux d'électrons (e^-). En violet est représentée la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). SOD : Superoxyde dismutase ; GPX : Glutathion peroxydase

L'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire est apportée par l'oxydation des nutriments (glucides, lipides) *via* le métabolisme intermédiaire (cycle de Krebs, β -oxydation...), générant des coenzymes réduits : le NADH et le FADH₂. Ces coenzymes réduits véhiculent puis cèdent leurs électrons, lors de réactions d'oxydo-réduction, aux quatre complexes protéiques de la chaîne respiratoire (**Figure 6**). Le NADH et le FADH₂ transfèrent leurs deux électrons au niveau du complexe I et du complexe II (ou équivalent), respectivement. Le flux d'électron est successivement pris en charge par un premier transporteur mobile ubiquinone (Q), le complexe III, le second transporteur cytochrome c, le complexe IV et enfin par l'oxygène moléculaire (accepteur final) pour former une molécule d'eau. Les complexes I, III, et IV de la chaîne respiratoire, en plus d'être des transporteurs d'électrons, sont également des pompes à protons qui font sortir des protons (H^+) de la matrice vers l'espace intermembranaire, créant une force proton motrice Δp composée à la fois d'un gradient électrochimique de proton de (ΔpH) et d'un potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) (Mitchell, 1961 ; Kadenbach et al., 2010).

Le complexe V, ou Fo/F1-ATP synthétase, utilise l'énergie de la force proton-motrice Δp pour coupler le retour des protons vers la matrice mitochondriale avec la phosphorylation d'ADP en ATP. Le phosphate inorganique (P_i), nécessaire pour cette réaction, est importé dans la mitochondrie par le transporteur de phosphate. L'ATP formé est ensuite exportée dans le cytosol, en échange d'ADP, par la translocase des nucléotides adényliques (ANT, *non représenté sur la Figure 6*). Ces différentes étapes représentent l'oxydation phosphorylante et permet la synthèse d'ATP à partir de nutriments selon la **théorie du couplage chimiosmotique** (Mitchell, 1961).

c- La mitochondrie « fuitante »

Le couplage entre la respiration mitochondriale (consommation d'oxygène) et la synthèse d'ATP n'est pas parfait et ne permet pas un rendement de 100 % lors des processus d'oxydation phosphorylante. En effet, il existe un retour non négligeable de protons vers la matrice mitochondriale, sans passer par l'ATP synthase. Il y a alors une consommation mitochondriale d'oxygène qui n'est pas associée à la synthèse d'ATP mais qui sert à maintenir le gradient de proton à travers la membrane interne. Ce phénomène, qualifié de **fuite de protons** (Brand et al., 1994 ; Nicholls, 1977), peut se faire directement à travers la membrane interne mitochondriale (dissipation sous forme de chaleur) ou *via* des protéines membranaires comme les protéines découplantes (« uncoupling proteins », UCPs) ou l'ANT (Brand et al., 2005; Bertholet et al., 2019). On pense que la fuite de protons mitochondriale est physiologiquement importante et représente donc une part significative du métabolisme de base. A titre d'exemple, dans les hépatocytes isolés de rat, elle représente 20 à 30 % de la consommation d'oxygène (Rolfe and Brand, 1996; Rolfe et al., 1999).

Cette fuite de protons est présente dans les mitochondries de tous les tissus, et l'intensité de cette fuite est variable, dépendante de divers paramètres dont les principaux sont :

- ✕ **La masse corporelle** : La conductance protonique des mitochondries hépatiques est inversement corrélée à la masse corporelle chez les oiseaux et les mammifères (Porter and Brand, 1993; Brand et al., 2003). En d'autres termes, les plus gros animaux endothermiques auront une plus faible proportion de fuite de protons mitochondriale que les petits.

- ✕ **La température corporelle** : Les ectothermes (reptiles) ont des taux métaboliques de base inférieurs à ceux des mammifères de taille équivalente, mais également des mitochondries hépatiques avec une fuite de protons réduite par rapport aux mammifères (Else and Hulbert, 1985; Brand, 1990). Cette fuite de protons chez les endothermes est d'ailleurs responsable d'une génération de chaleur jouant un rôle dans la thermorégulation (Brand et al., 2005).
- ✕ **Le statut thyroïdien** : L'hyperthyroïdie, qui augmente le taux métabolique, augmente la fuite de protons dans les hépatocytes et dans les mitochondries isolées du foie de rat. L'inverse est observé en cas d'hypothyroïdie (Harper et al., 1993; Harper and Seifert, 2008).
- ✕ **La composition en acides gras** de la membrane interne : La composition en acides gras de la membrane interne expliquerait les variations de la fuite de protons entre espèces de masse corporelle différente (Brand, 1990; Brand et al., 2003). En effet il a été montré que la diminution de la perméabilité membranaire mitochondriale hépatique liée à l'augmentation de la masse corporelle s'expliquerait majoritairement par la diminution du taux en acides gras polyinsaturés (par exemple l'acide docosahexaénoïque 22 :6 n-3) et/ou par l'augmentation du taux en acides gras monoinsaturés des phospholipides (Porter et al., 1996; Brand et al., 2003; Hulbert et al., 2007).

d- La mitochondrie : source de radicaux libres

(i) La mitochondrie donne la vie mais elle donne également la mort

Au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, les électrons sont transportés de complexe en complexe jusqu'à l'accepteur final des électrons : l'O₂. Cependant, une partie des électrons peuvent s'échapper de la voie de transfert et spontanément réduire directement l'oxygène ce qui est à l'origine de la production de radicaux libres⁴ comme l'anion superoxyde (O₂^{•-}) (Brand, 2000; Turrens, 2003). L'oxygène, sous cette nouvelle forme, est plus réactif et peut aller oxyder d'autres molécules, c'est pourquoi cet anion est appelé « *reactive oxygen species* » (ROS). La majeure partie de la production de ROS par les mitochondries a lieu au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, le plus souvent au niveau des complexes I et III (Murphy,

⁴ Un radical libre est une molécule capable d'exister indépendamment et qui contient un ou plusieurs électrons non appariés.

2009), en tant que sous-produit de la respiration. L'anion superoxyde est aussi le précurseur de la plupart des autres ROS (**Figure 6**), en particulier, sa formation enzymatique en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et secondairement la formation du radical hydroxyle ($OH^\bullet$) en présence d'atomes métalliques libres. Les ROS attaquent et altèrent chimiquement les macromolécules cellulaires tels que les protéines (l'addition de groupes carbonyles, fragmentation), les lipides (peroxydation lipidique), et l'ADN (Betteridge, 2000) produisant une réaction en chaîne de radicaux libres avec la formation de nouveaux radicaux et causant des dommages métaboliques souvent sévères. Bien que le H_2O_2 ne soit pas lui-même un radical libre, il peut se comporter comme un cheval de Troie, en diffusant hors de ses sites de production pour générer le radical hydroxyle (demi-vie courte mais dont les dommages sont les plus importants) et d'autres radicaux réactifs à d'autres endroits de la cellule, générant ainsi un stress oxydant⁵ (Hulbert et al., 2007). L'ADN mitochondrial produit au niveau de la membrane interne de la mitochondrie est alors une cible majeure des dommages induits par les ROS et la fonction mitochondriale serait une victime précoce du **processus de vieillissement** (*Théorie radicalaire du vieillissement* d'après (Herrero and Barja, 1998; Hulbert et al., 2007).

(ii) Variabilité de la production radicalaire

On estime la proportion de molécules d' O_2 convertie en ROS au niveau de la chaîne respiratoire, de 1 à 2 % (Chance et al., 1979; St-Pierre et al., 2002) voire parfois moins de 1 % dans certains tissus comme pour le tissu cardiaque chez le rat (Hansford et al., 1997). Cependant la génération de ROS n'est pas constante et varie non linéairement avec la consommation d' O_2 (Barja et al., 1994; Barja, 2004; Barja, 2007; Murphy, 2009). Cette relation non linéaire survient principalement du fait de divers paramètres et conditions modulant la génération de ROS. En effet, la production mitochondriale de ROS dépend fortement du degré de réduction des transporteurs d'électrons (Barja, 2007 ; Murphy, 2009). Plus le degré de réduction de la chaîne est élevé et plus les électrons vont fuir et semi-réduire l' O_2 pour produire des ROS. En d'autres termes, lorsque la cellule a moins besoin d'ATP, la respiration mitochondriale diminue, le flux d'électrons est lent, et les électrons ont tendance à s'accumuler dans la chaîne respiratoire. Dans

⁵ Le stress oxydatif a été défini comme une perturbation de l'équilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (radicaux libres) et les défenses antioxydantes, ce qui peut entraîner des dommages et lésions tissulaires.

ces conditions, les complexes respiratoires, notamment les complexes I et III principaux générateurs de ROS, ont tendance à être plus réduits (plus remplis d'électrons) et donc à produire plus de ROS. Par conséquent, l'intensité métabolique dans laquelle se trouve la mitochondrie est un facteur important dans la modulation de la production de ROS. En effet lorsque l'on se trouve dans une activité métabolique augmentée (besoin d'ATP au niveau de la cellule), le flux d'électrons augmente, la chaîne respiratoire accélère sa vitesse de fonctionnement, les électrons circulent plus rapidement, cependant sans pouvoir s'accumuler et la production de ROS diminue (Barja, 2007; Goncalves et al., 2015). Ainsi, lorsque l'activité mitochondriale augmente en intensité, la production de ROS diminue jusqu'à devenir très faible à l'atteinte de l'activité maximale (Starkov and Fiskum, 2003; Kadenbach et al., 2010; Treberg et al., 2018). Chez les mammifères, une étude récente a montré que les mitochondries du muscle squelettique présentaient une explosion de la libération de H_2O_2 à un faible taux de phosphorylation oxydative, essentiellement une fois que l'activité de l'oxydation phosphorylante mitochondriale avait atteint 26 % de la respiration maximale (Voituron et al., 2020). Allant de pair avec l'activité mitochondriale, le potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$) se voit être un autre paramètre régulant la génération de ROS. En effet, la formation de ROS augmente exponentiellement à des valeurs de $\Delta\Psi_m$ supérieures à 140 mV (Korshunov et al., 1997; Liu, 1997; Kadenbach et al., 2010; Starkov and Fiskum, 2003). On estime qu'une diminution de 10 mV du potentiel membranaire mitochondrial entraîne une réduction de 70 % de la production de ROS, au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire (Miwa and Brand, 2003). D'autres facteurs relatifs à la perméabilité membranaire comme la composition lipidique (Paradies et al., 2002; Hulbert et al., 2007), la composition protéique, par exemple la teneur en UCPs (Brand, 2000) ou encore la nature du substrat énergétique (Zoccarato et al., 2009; Brand, 2016) viennent apporter de la complexité à la relation entre la génération de ROS et la respiration mitochondriale.

(iii) Balance oxydative

Les ROS constituent également des signaux puissants (second messenger intracellulaire) envoyés rapidement par les mitochondries à d'autres sites cellulaires, déclenchant une cascade intracellulaire (Hensley et al., 2000; Murphy, 2009) qui induit des réponses physiologiques tels

que la cardioprotection, la prolifération cellulaire, les processus d'apoptose, l'induction de la mort cellulaire (Dröge, 2002; Marín-García and Goldenthal, 2002).

Cependant, les animaux possèdent des systèmes bien développés de **défenses antioxydantes** leur permettant ainsi de limiter les dommages dus aux ROS, composés d'enzymes et d'antioxydants non enzymatiques (Turrens, 2003; Andreyev et al., 2005; Hulbert et al., 2007; Starkov, 2008). Les enzymes antioxydantes qui piègent directement les ROS sont les superoxyde dismutases (SOD), les glutathion peroxydases (GPX), les thioredoxine peroxydases (TRX) et la catalase (CAT). Les SOD convertissent le radical anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (**Figure 6**). Ensuite, l' H_2O_2 est pris en charge par les glutathion et thioredoxine peroxydases et la catalase pour être réduit en H_2O . Outre les enzymes antioxydantes, il existe différents types de molécules endogènes non enzymatiques (Vitamine E, C, glutathion...) qui coopèrent pour limiter le stress oxydatif cellulaire. Après avoir réagi avec les ROS, ces molécules sont oxydées et doivent donc être réduites pour retrouver leur capacité antioxydante (Hulbert et al., 2007). Les organismes peuvent également limiter la production des ROS par les mitochondries en utilisant des **protéines découplantes** (UCPs), qui permettent aux protons de s'échapper à travers la membranaire interne. Cela résulte en une chute du gradient de proton et donc du potentiel membranaire qui accélère la respiration, et diminue la génération de ROS. L'augmentation de la fuite de protons à travers la membrane mais également par les UCPs, pourrait contribuer à minimiser les dommages oxydatifs causés à l'ADN et à ralentir le vieillissement. Ce fut d'ailleurs l'objet d'une publication assez influente par Brand (2000) exposant sa théorie de « *Uncoupling to survive* » proposant que l'augmentation de la conductance protonique soit bénéfique pour les organismes.

2. L'efficacité mitochondriale

a- Efficacité de conversion d'énergie

La chaîne respiratoire mitochondriale est donc le haut lieu de la conversion de l'énergie chimique apportée par l'oxydation des nutriments en une énergie directement utilisable par les cellules et impliquée dans les performances individuelles des organismes (par exemple : maintien des gradients cellulaires, locomotion, survie, reproduction, croissance...). Les flux

mitochondriaux (consommation d'O₂, synthèse d'ATP, génération de ROS, fuite de protons H⁺...) sont bien étudiés et facilement mesurables mais ne nous permettent pas d'obtenir une information fidèle de la capacité de conversion de l'énergie des systèmes biologiques.

Pour obtenir ce rendement énergétique mitochondriale, on utilise le **rapport ATP sur oxygène (ATP/O)** nommé **efficacité de couplage mitochondrial** (**Figure 7**).

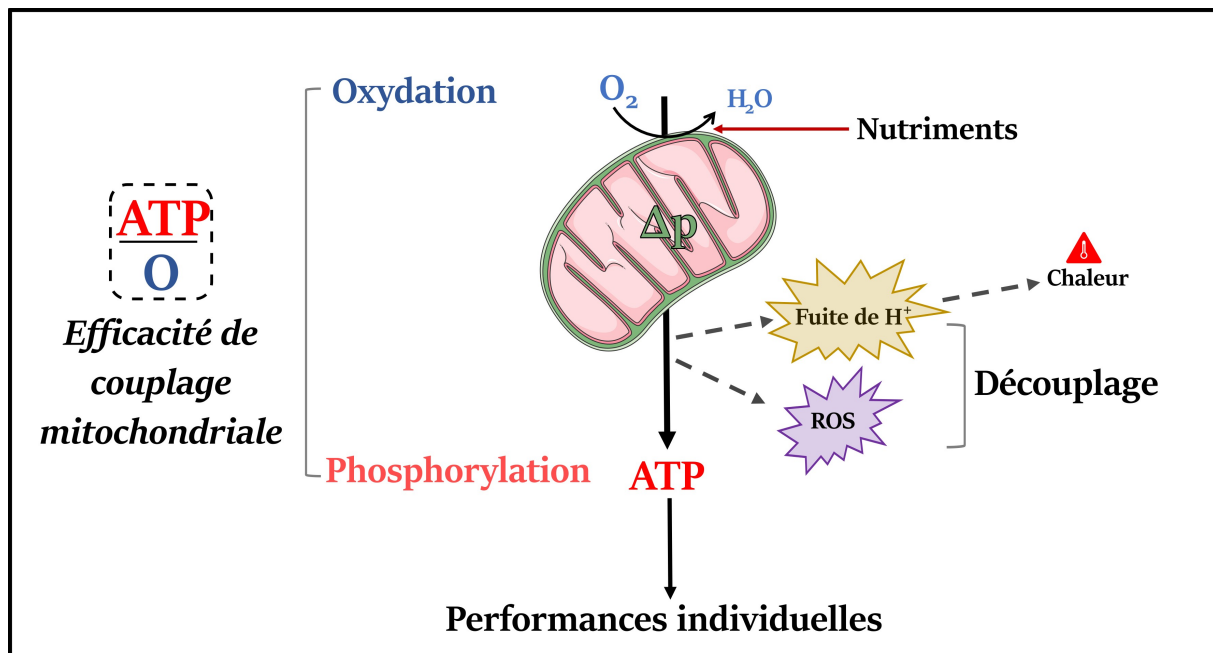


Figure 7 | Schéma résumant le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et intégration du concept d'efficacité de couplage mitochondrial représentée par le rapport ATP/O.

b- Flexibilité de l'efficacité mitochondriale

Comme écrit précédemment, tout l'oxygène consommé au niveau de la mitochondrie n'est pas utilisé, *in fine*, pour la synthèse d'ATP. En effet, environ 20 % est associé aux fuites de protons et 1 à 2 % pour la génération de ROS. Ainsi, la synthèse d'ATP, la fuite de protons H⁺ et la génération de ROS sont en « compétition » vis-à-vis du même gradient électrochimique de protons, imposant un compromis énergétique pour les organismes. L'efficacité de l'oxydation phosphorylante, définie ainsi par le rapport de la quantité d'ATP produite sur la quantité d'oxygène consommée (ATP/O), se voit alors modifiée par tout phénomène capable d'impacter :

(1) la force proton motrice par « découplage extrinsèque » : fuite de protons, perméabilité membranaire, génération de ROS.

(2) en diminuant l'efficacité des pompes à protons par « découplage intrinsèque », c'est à dire en diminuant la stœchiométrie H^+/e^- (découplage des réactions chimiques et du pompage des protons aux trois sites de pompage des protons : complexes I, III et IV) ou en augmentant la stœchiométrie H^+/ATP (stœchiométrie variable au niveau de la Fo-F1 ATP-synthétase). (Pietrobon et al., 1983; Brand et al., 1994; Brand, 2005a). Ces phénomènes de découplages intrinsèques et extrinsèques de l'efficacité de couplage mitochondriale sont régis par différents grands leviers (environnementaux, morphologiques, physiologiques) jouant sur sa flexibilité.

ENCADRÉ 3



7L/100 km

- Rapide
- Production de chaleur
- + Efficace

Qu'est-ce qu'une mitochondrie efficace ? ... Analogie avec les voitures ...

Une mitochondrie efficace est une mitochondrie économe. Son rapport ATP/O sera élevé et sa consommation d'oxygène pour produire une certaine quantité d'ATP sera faible. A l'inverse une mitochondrie peu efficace consommera plus d'oxygène pour produire une même quantité d'ATP



70L/100 km

- + Rapide
- + Production de chaleur
- Efficace

Lors d'une restriction calorique ou d'un jeûne alimentaire, l'efficacité mitochondriale peut également être impactée. Chez certaines espèces aviaires, le jeûne alimentaire entraîne un hypométabolisme à l'échelle subcellulaire, associé à une amélioration de l'efficacité mitochondriale (Monternier et al., 2015; Bourguignon et al., 2017; Monternier et al., 2017). De façon similaire, une restriction calorique sévère (-60 %) pendant 5 mois induit un hypométabolisme musculaire associé avec une augmentation de l'efficacité mitochondriale chez le rat (Zangarelli et al., 2006). A l'inverse chez une espèce ectotherme (truite commune), une réduction de la disponibilité en nourriture a entraîné une diminution du rapport ATP/O de ses mitochondries hépatiques (Salin et al., 2018).

L'entrée des électrons par le complexe I (Pyruvate, NADH) ou le complexe II (Succinate, FADH₂) importe puisque le transport séquentiel des électrons par ces deux complexes ne

présente pas la même stœchiométrie. Ainsi, la chaîne complète du NADH à l'oxygène permet le passage de dix protons par atome d'oxygène consommé ($10\text{H}^+/\text{O}$), et la chaîne du FADH_2 à l'oxygène permet le passage de seulement six protons par oxygène consommé ($6\text{H}^+/\text{O}$) (Brand, 2005a). L'efficacité mitochondriale est donc affectée par le rapport entre le NADH et le FADH_2 oxydé au niveau de la chaîne respiratoire, qui dépend de la nature du substrat énergétique utilisées (pyruvate versus palmitoyl-carnitine) (Brand, 2005 ; Monternier et al., 2015).

Dans les études de bioénergétique, les tissus les plus actifs métaboliquement (muscle squelettique, foie, cœur, rein, cerveau) sont les plus explorés. Dans une étude de Monternier et al. (2015), la flexibilité du couplage mitochondrial induite par le jeûne dépend du phénotype des muscles squelettiques (pectoral vs gastrocnémien) chez le canard. Toujours chez le canard, il a été également montré que le rendement de la phosphorylation oxydative était plus faible dans les mitochondries musculaires que dans les mitochondries hépatiques, une différence étant associée à une conductance de protons plus élevée dans les mitochondries musculaires (Salin et al., 2010).

En condition physiopathologique, une hyperthyroïdie est à l'origine d'un hypermétabolisme associé à un découplage mitochondrial et donc à une réduction du rapport ATP/O (Harper and Brand, 1993; Nogueira et al., 2002).

Chez les ectothermes, l'augmentation de la température ambiante accroît directement la vitesse des réactions biochimiques et stimule ainsi la consommation d'oxygène de l'organisme entier. L'augmentation de la température ambiante peut accroître la perméabilité membranaire, augmenter la conductance protonique et conduire à une diminution du rapport P/O, réduisant ainsi l'efficacité de la production d'ATP (Brooks et al., 1971; Sommer and Pörtner, 2004; Roussel and Voituron, 2020). Chez les poussins de manchots royaux, il a été constaté qu'une diminution de la température de 8°C (*in vitro*), augmente l'efficacité de couplage de 23 % des mitochondries du muscle squelettique (Monternier et al., 2014).

La transition de l'état respiratoire non-phosphorylant (état 4) à l'état respiratoire phosphorylant maximal (état 3) s'accompagne d'une augmentation de la consommation d'oxygène et de la synthèse d'ATP, ainsi que d'une diminution de la fuite de protons. Du fait de la diminution de la fuite de protons, l'efficacité mitochondriale est améliorée au cours de

l'augmentation de l'activité mitochondriale (Brand et al., 1994; Boël et al., 2019; Boël et al., 2023).

Enfin, nous retrouvons l'effet de la masse corporelle comme facteur majeur de la flexibilité de l'efficacité de couplage mitochondrial. Très peu d'études se sont intéressées à la variation de ce paramètre avec celle de la masse corporelle. Des études réalisées chez les ectothermes en comparaisons intra- et interspécifique (Salin et al., 2012; Roussel et al., 2015), ont montré que l'efficacité mitochondriale augmente avec la masse corporelle des individus. Très récemment, des études allométriques ont été mené sur le groupe des mammifères (Boël et al., 2019 ; Böel et al., 2023) et ont montré que dans le muscle squelettique, l'efficacité mitochondriale des grands mammifères était d'autant meilleure que celle des petites que l'activité métabolique était faible, proche de l'état de repos du tissu. De façon intéressante, cette corrélation entre la taille et la rapport ATP/O était moins prononcée dans les mitochondries hépatiques (Boël et al., 2023).

III. OBJECTIFS DE LA THÈSE

1. Différences métaboliques à l'échelle des endothermes

Les oiseaux et les mammifères sont les représentants des endothermes, caractérisés par la capacité à maintenir une température corporelle relativement haute et constante, *via* des processus de thermorégulation (McNab, 1978 ; Grigg et al., 2004 ; Koteja, 2004 ; Clarke et Pörtner, 2010 ; Lovegrove, 2017). Ils partagent donc les avantages conférés par la chaleur (via la thermorégulation) mais également les désavantages liés à la thermorégulation à savoir un coût énergétique (et taux métabolique) élevé. Et mêmes si on étudie beaucoup les oiseaux et les mammifères pour leurs caractéristiques communes, ce sont surtout leurs différences métaboliques qui sont décrites dans la littérature scientifique.

a- Première différence : la température corporelle

Les oiseaux et les mammifères ne régulent pas leur température corporelle aux mêmes valeurs. Chez les oiseaux, les températures corporelles au repos, sont situées entre 38 et 43.5°C

(Prinzinger et al., 1991) alors que chez les mammifères, elles sont généralement situées entre 30 à 39°C (Clarke and Rothery, 2008). Ces intervalles de températures se voient modifiés pour les deux taxons en fonction de l'activité métabolique (locomotion), du rythme circadien mais également des stratégies thermiques mises en place face à un environnement contraignant (McNab, 1966).

La relation entre la température corporelle et la masse corporelle des oiseaux et des mammifères a longtemps été considérée à l'échelle du clade, sans prendre en compte la phylogénie. La température corporelle des oiseaux, bien que remise en question (Clarke et Rothery, 2008) tend à corrélér négativement à la masse, c-à-d que les plus petites espèces aurait une température plus élevée que les grandes (Rodbard, 1950 ; McNab, 1966), avec cependant des différences en fonction de la taxonomie : les températures sont plus basses chez les ratites (autruches) et les manchots, plus élevées chez les passereaux, et intermédiaires chez les autres espèces. Cependant, la très faible masse des colibris et de certains pinsons pose un problème de conservation de l'énergie, qui est finalement résolu par une réduction du taux métabolique basal (McNab, 1966), ce qui réduit encore plus les températures corporelles contrairement à ce que l'on pourrait penser. Chez les mammifères, la relation entre la masse corporelle et la température est un peu plus complexe et n'est pas clairement avérée. Elle est d'abord remise en question par une analyse comprenant plus d'espèces par McNab (1966) suggérant également de prendre en compte les différents groupes de mammifères pour l'analyse. On conclut (Clarke et Rothery, 2008) quelques décennies après, d'une absence de relation d'échelle globale pour les mammifères.

Quoiq'il en soit, on s'accorde tout de même à dire que la température corporelle des oiseaux est plus élevée que celle des mammifères de masse corporelle équivalente (McNabb, 1966 ; Prinzinger et al., 1991), de 2°C en moyenne. Cela établit la première différence entre les oiseaux et les mammifères.

b- Deuxième différence : les taux métaboliques

Deux hypothèses ont été avancées pour rendre compte de cette différence : La première serait une adaptation au vol, les oiseaux volants ayant des températures corporelles plus élevées que

les mammifères ou les oiseaux incapables de voler. La seconde, serait due aux taux métaboliques plus élevés des oiseaux (**Figure 8a**) avec généralement une perte de chaleur (conductance) plus faible que les mammifères. Les taux métaboliques des oiseaux plus élevés (pour une même masse) établissent la seconde grande différence métabolique entre les oiseaux et les mammifères.

c- Troisième différence : la longévité

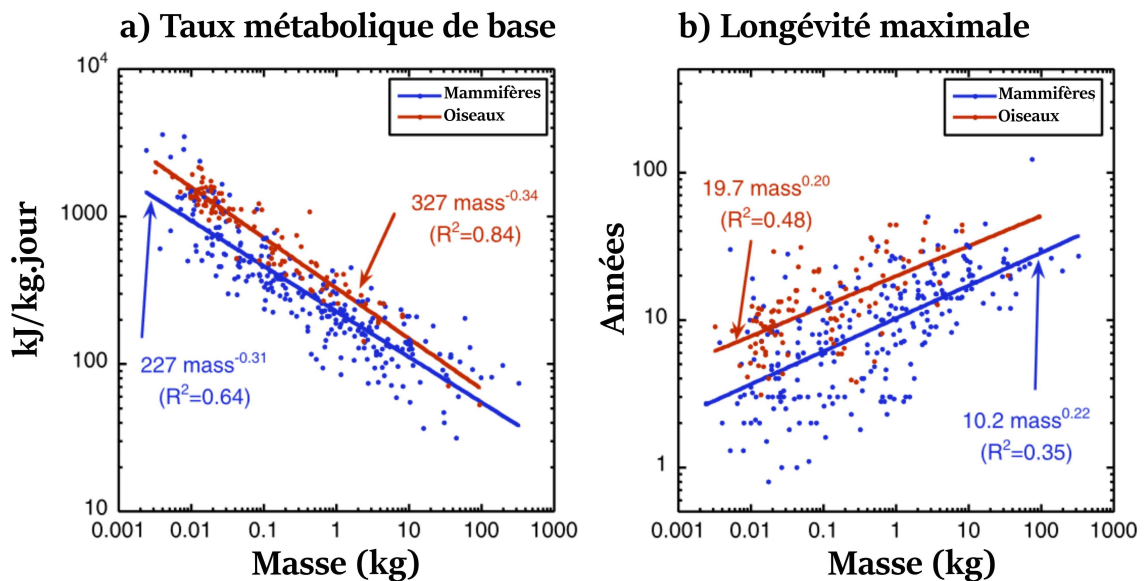


Figure 8 | Relations entre la masse corporelle des oiseaux et des mammifères avec le taux métabolique de base **a)** et la longévité maximale **b)**. Illustration modifiée, issue et de Hulbert et al., 2007.

Enfin, les oiseaux de masse équivalente aux mammifères ont une longévité plus importante (**Figure 8b**). Au regard de la théorie radicalaire du vieillissement (Harman, 1983), les oiseaux ayant un taux métabolique plus élevé, consomment d'avantage d'O₂, et devraient générer plus de ROS que les mammifères, et ainsi subir des dégâts cellulaires plus importants associés à une longévité moindre. Les oiseaux défient alors cette théorie combinant un taux métabolique élevé avec une longévité importante. On constate que les oiseaux possèderaient tout simplement une plus faible production mitochondriale de ROS par unité d'oxygène (Ku et Sohal, 1993 ; Barja et al., 1994), soit un niveau plus important de défenses antioxydantes (Ku and Sohal, 1993). En plus des faibles taux de formations de ROS mitochondriaux, les oiseaux présentent une composition plus élevée de phospholipides membranaires résistants à la peroxydation que les espèces

mammaliennes ce qui les protègent d'avantage des dégâts cellulaires (Pamplona et al., 1996; Pamplona et al., 1999a; Pamplona et al., 1999b).

2. Comprendre ces différences métaboliques en investiguant à l'échelle mitochondriale

Pour résumer ce qui se passe à l'échelle de l'organisme : (1) les taux métaboliques et la longévité des endothermes corréleront négativement et positivement avec la masse corporelle. (2) Les oiseaux possèdent un taux métabolique, une température corporelle ainsi qu'une, longévité plus élevée que les mammifères de masse corporelle similaire. Nous voyons un écart se dessiner entre les relations (**Figure 8**) correspondant aux oiseaux et aux mammifères. Nous pouvons alors nous demander si cet écart entre ces relations ne serait pas la conséquence d'un fonctionnement mitochondrial différent et plus particulièrement la conséquence d'une différence de rendement énergétique inférieure aux mammifères, c'est-à-dire, provenant d'une efficacité de couplage mitochondriale distincte.

Cette thèse a donc pour objectif d'évaluer le fonctionnement mitochondrial à la fois au niveau des flux mitochondriaux (consommation d'oxygène, synthèse d'ATP et génération de ROS) et de l'efficacité de couplage (ATP/O) chez les oiseaux. Par une approche comparative, il est question de comprendre en quoi les déterminants des propriétés biologiques des oiseaux : la masse corporelle et la température corporelle impactent le métabolisme énergétique mitochondrial et ainsi les performances individuelles.

La question des patterns allométriques mitochondriaux (effet de la masse corporelle) chez les endothermes a déjà fait l'objet de certaines investigations au sein de notre laboratoire et notamment chez les mammifères. Mélanie Boël, dans le cadre de sa thèse a investigué ces patterns allométriques chez **12 espèces mammaliennes** dont les masses corporelles allaient de 5 g (souris pygmée Africaine) à 550 kg (bœuf). Les résultats principaux étant :

- 1) L'efficacité mitochondriale globale est corrélée positivement avec la masse corporelle (Boël et al., 2019).
- 2) L'efficacité mitochondriale est flexible et dépendent de l'intensité métabolique (Boël et al., 2019).
- 3) Cette flexibilité mitochondriale présente dans le muscle squelettique des mammifères, ne s'observe pas systématiquement dans le foie (Boël et al., 2023).

Le travail de Mélanie Boël, apporte de nombreuses réponses sur la bioénergétique mitochondriale des mammifères mais soulève également d'autres questions sur les oiseaux. J'ai ainsi investigué l'effet de la masse corporelle sur la bioénergétique mitochondriale des oiseaux (**Chapitre 1**), en mesurant la variation des flux mitochondriaux (consommation d'O₂, synthèse d'ATP et génération de ROS) ainsi que l'efficacité de couplage (ATP/O) des mitochondries isolées de muscles squelettique et cardiaque (**Article 1**), chez des oiseaux dont la masse corporelle varie de 15 g (pinsons) à 160 kg (autruche). Dans le cadre d'une analyse comparative, ce jeu de données est comparé aux récents patterns allométriques trouvés chez les mammifères (Boël et al., 2019). Des analyses complémentaires d'activités enzymatiques des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ont été menées sur des échantillons de muscle squelettique, de cœur et de foie provenant des mêmes espèces (**Article 3**).

Les érythrocytes des oiseaux sont nucléés et possèdent des mitochondries fonctionnelles. L'objet de l'**Article 2**, consistait à rechercher des signatures évolutives, en caractérisant finement le fonctionnement mitochondrial érythrocytaires aviaire, en couvrant un maximum d'espèces et de masses corporelles. Cet article s'appuie sur des espèces prélevées au Parc des oiseaux à l'hiver 2021 et tente de déterminer s'il existe une variation des paramètres énergétiques mitochondriaux de ce tissu avec une variation de la masse corporelle des oiseaux.

Les espèces les plus proches sont plus susceptibles d'être similaires, créant ainsi des relations d'apparentées entre leurs traits. Il est donc nécessaire de considérer les relations phylogénétiques entre les espèces lors de l'analyse de leurs traits/caractères. Les relations allométriques mitochondriales ont alors nécessité une analyse comparative profonde et complexe, qui constitue un pilier méthodologique nécessaire et sous-jacent à toutes mes études allométriques. C'est pour cela que la partie **IV** de la section « Matériels et Méthodes » est dédiée à l'explication de la méthode statistique pour prendre en compte la phylogénie dans mon travail de thèse.

Le deuxième aspect de mon travail de thèse s'articule autour de l'effet de la température corporelle (**Chapitre 2**), deuxième grand déterminant des organismes. Dans le but de comparer et décortiquer plus finement leur fonctionnement mitochondrial respectif, nous proposons de faire « un zoom » sur notre pattern allométrique oiseaux/mammifères en comparant des mitochondries isolées du muscle squelettique de pigeons et de rats, de masse corporelle similaire (élimination de l'effet de la masse sur le métabolisme), à différentes températures *in vitro* et en utilisant différents substrats mitochondriaux. De cela, nous mesurons alors la respiration mitochondriale (**Article 4**), l'efficacité mitochondriale (**Article 5**) avec une perspective d'investigation sur la génération de ROS (non inclus dans la thèse).



MATÉRIELS ET MÉTHODES

Une des caractéristiques techniques des études mitochondriales, est que les expériences sont... très intenses. La mitochondrie est un organite fragile, ayant une durée de vie limitée hors de son environnement tissulaire. Il faut donc aller vite, être précis et efficace. Sans l'aide précieuse de mes deux directeurs de thèse (Yann Voituron et Damien Roussel), ainsi que des personnes avec qui j'ai collaborées (Benjamin Rey et Antoine Stier), ce travail expérimental n'aurait pas pu se concrétiser. Ainsi, la section "Matériels et Méthodes" que je vous présente est le fruit de l'investissement et du travail de plusieurs personnes.

I. MODÈLES D'ÉTUDE

1. Les oiseaux de la ferme & Co.

a- Caractéristiques des oiseaux sélectionnés

Les mesures bioénergétiques relatives aux patterns allométriques du muscle squelettique, du cœur et du foie (articles n°1 et 6), ont été effectuées sur un total de **85 oiseaux** représentant **14 espèces** de **9 familles** et **8 ordres** : Struthioniformes, Sphenisciformes, Anseriformes, Suliformes, Galliformes, Columbiformes, Psittaciformes et Passeriformes. La masse corporelle des plus petites espèces (pinson, 16-18 g) diffère d'un facteur de 10^4 de celle de l'espèce la plus grande (autruche, ~160 kg). Le **Tableau 1** regroupe toutes les espèces d'oiseaux, leur masse corporelle, le nombre d'oiseaux prélevés par espèces, la provenance et la saison de prélèvement.

La plupart de ces oiseaux sont issus d'élevages (autruches, oies, canards, faisans, perdrix, cailles) abattus pour la consommation de viande dans des centres spécialisés (abattoirs ou directement à la ferme). Une autre partie des oiseaux (corvidés, pigeons, cormorans) sont fréquemment soumis à des régulations populationnelles, régies elles-mêmes par des décrets ministériels (Articles R421-1 à R429-21 du code de l'environnement relatifs aux espèces sauvages). Les corvidés et les pigeons nous ont donc été fournis par des piégeurs agréés, membres de l'Union Nationale des Associations des Piégeurs Agréés de France (UNAPAF). Les cormorans sont issus d'une régulation fine par les pisciculteurs des étangs de la Dombes. Les pinsons et les perruches nous ont été fournis par plusieurs fournisseurs professionnels de la région Rhône-Alpes.

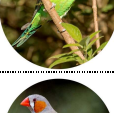
	Espèces	Masse (g)	n	Provenance	Saison / année
	Autruche <i>Struthio camelus</i>	163 828 ± 9 606	7	Abattoir ABAG Grenoble (Isère)	Hiver 2020- 2021
	Manchot royal <i>Aptenodytes patagonicus</i>	13 687 ± 582	8	Station Française Alfred Faure (Crozet)	Été austral 2016
	Oie cendrée <i>Anser anser</i>	8 033 ± 491	3	Élevage Villars les Dombes (Ain)	Hiver 2021-2022
	Canard de Barbarie <i>Cairina moschata</i>	4 250 ± 137	10	Ferme du Terray Balan (Ain)	Début été 2021
	Grand cormoran <i>Phalacrocorax carbo</i>	2 125 ± 75	2	Régulation pop. pisciculteur (Ain)	Printemps 2022
	Faisan commun <i>Phasianus colchicus</i>	1 538 ± 51	10	Faisandrie des Monts Lyonnais (Rhône)	Printemps 2020
	Corneille noire <i>Corvus corone</i>	419 ± 5	3	Piégeur agréé de France (Ain)	Printemps 2022
	Corbeau freux <i>Corvus frugilegus</i>	388 ± 2,5	3	Piégeur agréé de France (Ain)	Printemps 2022
	Perdrix grise <i>Perdix perdix</i>	363 ± 8	7	Ferme, élevage (Ain)	Hiver 2020- 2021
	Pigeon commun <i>Columba livia</i>	282 ± 12	10	Piégeur agréé de France (Ain)	Automne 2020/Printemps 2021
	Caille japonaise <i>Coturnix japonica</i>	237 ± 17	6	Ferme, élevage (Ain)	Hiver 2020- 2021
	Perruche ondulée <i>Melopsittacus undulatus</i>	37,3 ± 1,5	3	Fournisseur local (Rhône)	Automne 2020
	Diamant mandarin <i>Taeniopygia guttata</i>	18,2 ± 1,4	7	Fournisseur local (Rhône)	Été/Automne 2020
	Moineau du Japon <i>Lonchura striata</i>	16,5 ± 0,4	6	Fournisseur local (Rhône)	Hiver 2020- 2021

Tableau 1 | Résumé des 14 espèces d'oiseaux sélectionnées pour les études de bioénergétique mitochondriale sur le muscle squelettique, le cœur et le foie. La masse corporelle est exprimée en grammes (moyenne ± s.e.m).

Tous les individus étaient des mâles, adultes (ayant atteint la maturité sexuelle). À l'exception d'une autruche femelle (prélèvement sur carcasse et contrainte de la chaîne d'abattage).

b- Mesure de la masse corporelle et prélèvement des échantillons.

Les oiseaux étaient mis à mort puis pesés individuellement grâce aux structures spécifiques mises en place dans les abattoirs ou à l'aide de balances pour les plus petites espèces.

Des échantillons (2-4 g) de muscle squelettique (locomotion principale de l'oiseau : pectorale pour tous les oiseaux sauf pour l'autruche pour laquelle le gastrocnémien a été prélevé), de muscle cardiaque, et de foie (quand cela était possible) ont été prélevés et mis dans un tampon d'isolation (composition dans la section II.1 du Matériels et Méthodes). Les échantillons étaient préservés dans la glace et le retour au laboratoire pour l'isolation mitochondriale se faisait dans les deux heures (maximum) après le prélèvement.

Les manchots royaux (*Aptenodytes patagonicus*) ont été capturés au cours d'une campagne d'été austral à la station française Alfred Faure, archipel Crozet (île de la Possession, 46°25'S, 51°45'E). Conformément aux mesures convenues pour la préservation de la faune antarctique et subantarctique et à l'approbation du comité d'éthique français pour la recherche polaire (programme IPEV 131), le muscle pectoral superficiel a été biopsié chirurgicalement sous anesthésie générale à l'isoflurane (le cœur n'a pas été échantillonné chez cette espèce). Après l'opération, les oiseaux ont été laissés en convalescence dans un enclos extérieur pendant 4 à 7 jours, avant d'être relâchés sur le site de leur capture.

2. Parc des oiseaux

Cette étude spécifique sur le sang des oiseaux, en collaboration avec le laboratoire de biométrie et biologie évolutive (LBBE, Dr. Benjamin Rey) et le Parc des oiseaux de Villars les Dombes, a nécessité la collection d'autres espèces, indépendantes de la première étude, présentées précédemment.

a- Caractéristiques des oiseaux sélectionnées

Le [Parc des oiseaux](#) de Villars les Dombes, situé à 45 minutes de la métropole de Lyon, s'étale sur 35 hectares et regroupe ~2 000 oiseaux représentant 250 espèces au total. Chaque année, Éric Bureau (D.M.V) et son équipe, vaccine un pool d'oiseaux pour lutter contre influenza (grippe aviaire). Les oiseaux sont donc manipulés le temps de l'injection et relâché ensuite dans leurs enclos. C'est à cette occasion que des prélèvements sanguins ont été effectués pour notre étude sur les patterns allométriques érythrocytaires.

Au contraire de l'étude sur les tissus musculaires et hépatiques, les prélèvements sanguins ont été réalisés sur des individus mâles et femelles, de tout âge (juvéniles et adultes). Au total, **73 oiseaux** représentant **18 espèces**, **13 ordres** et **15 familles** ont été prélevé (**Tableau 2**). La masse corporelle de la plus petite espèce (Martin chasseur géant, 482 g) est 20 fois plus faible que celle de l'espèce la plus grande (Vautour fauve, ~10 kg).

b- Mesure de la masse corporelle et prélèvement des échantillons.

La masse corporelle de chaque individu a été relevée et le fichier spécifique à l'individu a été mis à jour. En effet, tous les oiseaux du parc possèdent un numéro d'identification (ID) et donc des informations spécifiques à l'individu (date de naissance, âge, sexe, suivi de la masse corporelle...) ce qui facilite fortement les études longitudinales menées sur ces espèces.

Les prélèvements ont été réalisés sur la période de novembre 2021 à janvier 2022, le plus souvent dans la matinée. Aucune mise à mort n'a été nécessaire puisque le prélèvement sanguin est relativement peu invasif. Environ 1 ml de sang était prélevé grâce à des seringues héparinées (pour éviter la coagulation), mis au frais (4°C) puis transporté dans la glace jusqu'au laboratoire pour les mesures de bioénergétique érythrocytaire.

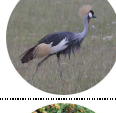
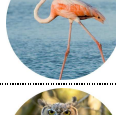
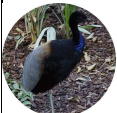
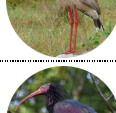
Espèces		Masse (g)	n				
	Vautour Fauve <i>Gyps fulvus</i>	10 120 ± 500	5				
	Oie cendrée <i>Anser anser</i>	8 033 ± 491	3				
	Marabout d'Afrique <i>Leptoptilos crumeniferus</i>	7 167 ± 33	3				
	Pélican blanc <i>Pelecanus onocrotalus</i>	6 700 ± 394	5				
	Grue royale <i>Balearica regulorum</i>	5 820 ± 468	5				
	Cygne noir <i>Cygnus atratus</i>	5 275 ± 531	4				
	Bucorve d'abyssinie <i>Bucorvus abyssinicus</i>	4 833 ± 281	6				
	Flamant de Cuba <i>Phoenicopterus ruber</i>	3 000 ± 275	5				
	Hibou grand-duc <i>Bubo bubo</i>	2 572 ± 21	3				
	Grue demoiselle <i>Grus virgo</i>	2 450 ± 50	2				
	Oie à tête barrée <i>Anser indicus</i>	2 384 ± 124	5		Agami trompette <i>Psophia crepitans</i>	1 093 ± 33	3
	Cariama huppé <i>Cariama cristata</i>	2 200 ± 100	4		Pigeon Nicobar <i>Caloenas nicobarica</i>	790 ± 58	3
	Ibis chauve <i>Geronticus eremita</i>	1 176 ± 49	5		Ortalide du chaco <i>Ortalis canicollis</i>	555 ± 43	4
	Ara militaire <i>Ara militaris</i>	1 130 ± 78	4		Martin-chasseur géant <i>Dacelo novaeguineae</i>	432 ± 12	4

Tableau 2 | Résumé des 18 espèces d'oiseaux sélectionnées pour les études de bioénergétique mitochondriale érythrocytaire. La masse corporelle est exprimée en grammes (moyenne ± s.e.m).

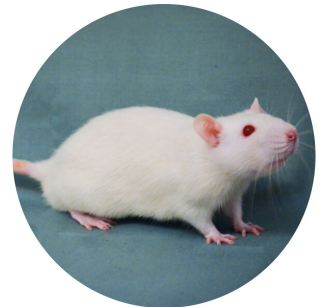
3. Pigeon versus Rat

« Le pigeon est un peu le rat du ciel, un rat auquel on aurait greffé des ailes avant de le repeindre en gris » Patrick Deville

Pour investiguer les différences et similarités de la bioénergétique mitochondriale chez les oiseaux et les mammifères, nous avons choisi de revisiter la fameuse comparaison « Pigeon versus Rat ». En effet, le rat et le pigeon ont largement été utilisés dans la littérature comme couple phare scientifique et expérimental (Ku and Sohal, 1993; Pamplona et al., 1999b; Portero-Otin et al., 2004; Rasmussen et al., 2004; Montgomery et al., 2011).



Le rat est un des modèles de laboratoire le plus utilisé dont l'élevage et la stabulation est commune dans les animaleries. Le pigeon, bien que sauvage, possède une masse corporelle similaire au rat, et semble être un candidat parfait dans cette étude comparative oiseaux/mammifères.



Des rats Wistar (*Rattus norvegicus* ; n=8 ; 276 ± 29 g) et des pigeons (*Columba livia* ; n=8 ; 293 ± 17 g) de masse corporelle équivalente ont été sélectionnés. Les rats ont été fournis par la plateforme d'animaux de laboratoire (ASCED) et stabulés à 25°C (cycle jour/nuit de 12h:12h). Un piègeur agréé (UNAPAF) a fourni les pigeons capturés et maintenus dans des volières extérieures (cycle jour/nuit de 15h:9h ; 13-23°C).

Les mesures de bioénergétiques ont été réalisées au printemps 2021. Chaque jour était organisé de façon à passer un couple pigeon rat permettant ainsi de standardiser le protocole pour tous les individus. Après la mise à mort, les individus ont été pesés et des échantillons du muscle squelettique, de la locomotion principale de l'animal ont été prélevés à hauteur de 2-4 grammes. Chez le pigeon, le pectoral a été prélevé (muscle principal du vol) alors que chez le rat, les muscles de la jambe ont été prélevés (quadriceps, gastrocnémien, muscles pour la course).

II. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS MITOCHONDRIAUX

1. *Isolation mitochondriale*

Des échantillons de muscle squelettique et de muscle cardiaque (environ 2 g) ont été utilisés pour la préparation des mitochondries. Les populations mitochondriales du muscle squelettique et du cœur ont été isolées dans un tampon d'isolement glacé (100 mM de saccharose, 50 mM de KCl, 5 mM d'EDTA et 50 mM de Tris-base, pH 7,4), selon un protocole d'extraction standard, en utilisant un homogénéisateur, une digestion protéasique et une centrifugation différentielle. Toutes les étapes se déroulant à 4 °C. En bref, les tissus musculaires ont été finement découpés, homogénéisés (Potter-Elvehjem, cinq passages) et centrifugés à 1 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant contenant des mitochondries sous-sarcolemmal a été conservé dans de la glace et le culot contenant des mitochondries inter-myofibrillaires a été suspendu dans le tampon d'isolement et traité avec la protéase de *Bacillus licheniformis* (1 mg.g⁻¹ tissu) pendant 5 min dans de la glace. L'homogénat a ensuite été dilué (1:2) avec le surnageant de la première centrifugation et le mélange a été centrifugé à 1 000 g pendant 10 min. Le surnageant obtenu a été filtré et centrifugé à 8 700 g pendant 10 minutes pour culotter les mitochondries. Le culot mitochondrial a ensuite été remis en suspension dans le tampon d'isolement et centrifugé à 8 700 g pendant 10 minutes, et cette étape de lavage a été répétée une fois de plus. Les concentrations en protéines ont été déterminées dans la suspension mitochondriale à l'aide du dosage des protéines BCA avec de l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard.

2. *Perméabilisation des globules rouges en vue de la respiration*

Alors que certains protocoles chez les oiseaux ne perméabilisent pas les cellules sanguines (Stier et al., 2017; Nord et al., 2021) gardant ainsi les érythrocytes intacts, d'autres protocoles, les perméabilisent avant respiration ou directement dans la cuve de respiration (Stier et al., 2013; Jansen et al., 2016). Nous avons choisi un protocole qui couple des cycles de lavage et perméabilisation par la digitonine avant les mesures de respiration (*voir section III.1 du Matériels et Méthodes*).

Les échantillons sanguins, une fois réceptionnés, sont centrifugés une première fois à 850 g pendant 5 minutes (10°C). Cette première centrifugation permet de séparer les constituants du sang en trois parties : les globules rouges constituant le culot, le plasma constituant le surnageant et une ligne intermédiaire constituant les cellules immunitaires sanguines. Ainsi, 100 µL de culot (globules rouges) ont été prélevés et re-suspendus dans 1 mL de tampon phosphate salin (PBS). Une seconde centrifugation de « lavage » à 850 g pendant 5 min permet de récupérer le culot de globule rouge et de le re-suspendre une nouvelle fois dans 1 mL de PBS. Une troisième centrifugation de « lavage » à 850 g pendant 5 min a lieu, à la suite de laquelle le culot de globule rouge est re-suspendue cette fois-ci dans 1 mL de tampon de respiration MiRO5 (110 mM sucrose, 0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 60 mM K-lactobionate, 20 mM taurine, 10 mM KH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ BSA sans acides gras, 20 mM Hepes, pH 7,1).

La perméabilisation des érythrocytes se fait par l'ajout de 10 µL de digitonine (10 mg/ml diluée dans du DMSO au préalable) et d'une incubation avec agitation sur plaque, à température ambiante, suivi d'une centrifugation à 850 g pendant 10 minutes. Cette étape se produit au minimum 3 fois, dans certains cas plus de cycles de perméabilisation sont nécessaires. Le nombre de cycle est déterminé par la couleur du culot qui est proportionnelle à la teneur en hémoglobine persistante. A la fin des 3 cycles (ou plus) de perméabilisation avec la digitonine, le surnageant est enlevé et le culot est récupéré pour être re-suspendu dans 1 mL de MiRO5 et mis dans la glace. Les mesures de respiration se feront à partir de cellules sanguines que l'on nomme des « ghost cells ». Ce nom particulier vient du fait que ce sont des globules rouges avec une concentration intracellulaire d'hémoglobine (Hb) faible (Jansen et al. 2016). Les concentrations en protéines ont été déterminées à la suite de la respiration, à l'aide du dosage des protéines BCA avec de la BSA comme standard.

3. Homogénats

Dans le cadre des études allométriques sur les tissus musculaires et hépatique, ainsi que dans l'étude comparative Pigeon vs Rat, des échantillons de tissus ont été prélevés à hauteur de quelques grammes et conservés au -80°C dans le but de réaliser des activités enzymatiques par la suite.

Après avoir été décongelés, les échantillons (muscle squelettique, cœur et foie) ont été pesés puis homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur de tissus (2010 Geno/Grinder - [SPEX® SamplePrep](#)). Avant d'être introduits dans la machine, des billes d'acier de 1 mm de diamètre et du tampon phosphate (100 mM, pH=7,4) ont été ajoutées. Les échantillons de muscle squelettique ont subi 3 cycles de 30 secondes à une vitesse de 1 700 agitations/min, avec 20 secondes de repos entre chaque cycle. Les échantillons de cœur et de foie ont subi la même procédure mais avec seulement 2 cycles. Du tampon phosphate a été ajouté pour ajuster la concentration de l'homogénat, de 40 à 60 mg/ml. Les homogénats ont ensuite été congelés à -80°C.

III. MESURE DES PARAMÈTRES BIOÉNERGÉTIQUES MITOCHONDRIAUX

1. *Respiration mitochondriale*

a- Les outils : Le rank Brother

Les mesures de respiration des mitochondries isolées à partir des muscles squelettique et cardiaque ont été réalisées via une méthode de polarographie permettant de doser l'oxygène dissout dans le milieu. Les mitochondries ont été placées en cuve de respirométrie ([Rank Brothers® LTD](#), **Figure 1**) contenant au préalable du milieu de respiration (120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 3 mM Hepes, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0,3% BSA délipidée ; pH 7,4) thermostaté à température spécifique à l'étude en cours :

- 40°C pour l'étude « patterns allométriques mitochondriaux musculaires des oiseaux » ;
- 37, 40 et 43°C pour l'étude « Pigeon vs Rat »

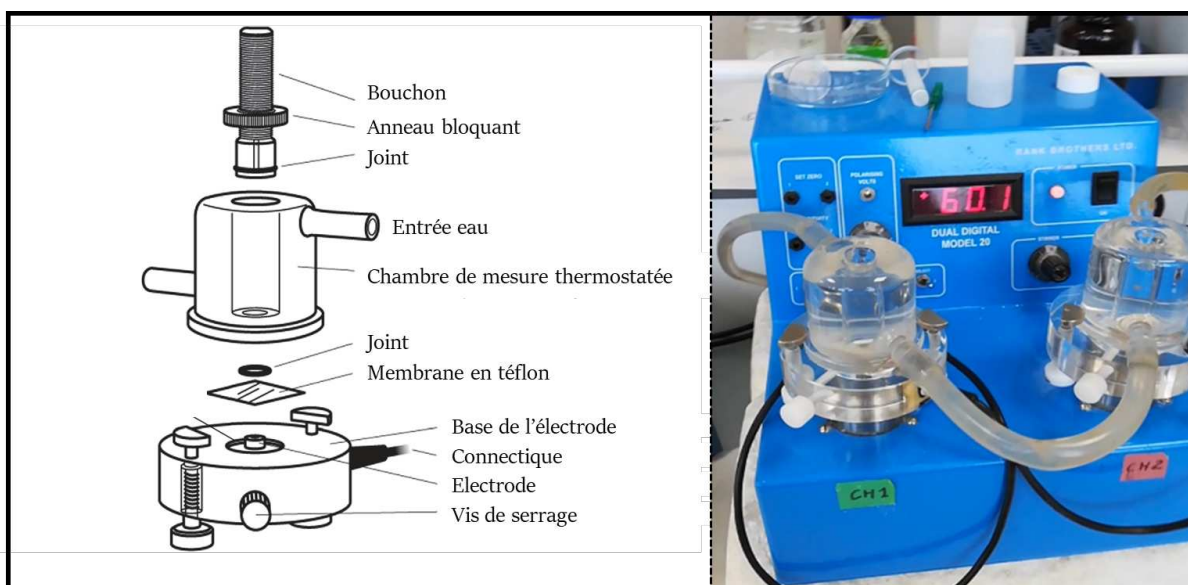


Figure 1 | Illustration modifiée, issue du manuel d'utilisation de la cuve de respirométrie et photographie de l'oxygraphe Rank Brothers - Dual Digital Model 20.

La cuve de respirométrie est équipée d'une électrode de Clark (**Figure 1**), composée d'une cathode en platine et d'une anode en argent baignant dans un électrolyte (KCl), qui est séparée du milieu à étudier par une membrane perméable à l'oxygène et imperméable à l'eau et aux ions. L'oxygène diffusant à travers la membrane est réduit en interagissant avec les électrons libérés par la cathode en platine, entraînant un courant entre les deux électrodes, proportionnel à la concentration d'oxygène contenue dans le milieu. La respiration des mitochondries engendre une diminution de cette concentration d'oxygène, ce qui se caractérise par une diminution linéaire de l'intensité du courant. Les cuves de respirométrie étant reliées à un papier enregistreur, nous obtenons, un tracé de la consommation d'oxygène en fonction du temps pour lesquelles des mesures de pentes se font par la suite pour caractériser les différents états respiratoires.

L'électrode était calibrée avec le milieu de respiration saturé en oxygène (100 %), dont la concentration dépendait de la température (37, 40 ou 43°C contenant 406, 393 et 380 nmol d'O₂/mL pour les températures de 37, 40, ou 43°C, respectivement). Le 0 % d'oxygène a été réalisé grâce à la respiration mitochondriale jusqu'à épuisement total de l'oxygène du milieu (après fermeture de la cuve). Enfin, la chambre de mesure est fermée hermétiquement par un bouchon, qui possède un passage fin par lequel on ajoute les substrats et les inhibiteurs à l'aide d'une seringue Hamilton.

b- Les outils : L'Oroboros

Les mesures de respiration érythrocytaires des oiseaux du Parc des oiseaux ont été réalisées via une méthode d'oxygraphie avec un respiromètre de haute précision de type [Oroboros®](#).

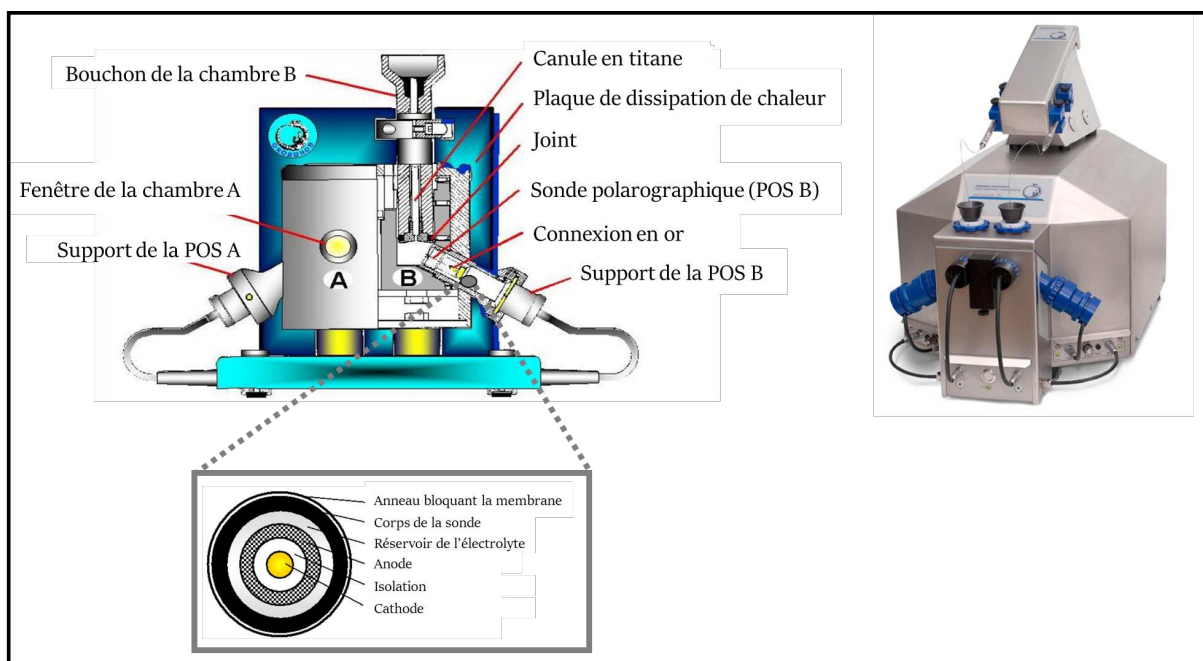


Figure 2 | Photographie et illustration modifiée de Gnaiger (2011) représentant les différents composants du respiromètre Oroboros®

Cet appareil possède une résolution de mesure plus importante que le Rank Brother, ce qui le rend plus approprié pour des mesures effectuées sur des petits échantillons biologiques du type cellules sanguines. Cet appareil possède également deux chambres équipées de sondes polarographiques (ou électrodes) de type Clark qui détectent des variations de la concentration en oxygène de l'ordre du *pmol*. Les deux chambres sont logées dans un bloc de cuivre dont la température est contrôlée et qui est en contact direct avec les plaques de dissipation de chaleur (**Figure 2**), permettant de réguler finement la température de chaque cuve durant les mesures. Le principe de mesure au niveau des électrodes est le même que pour le Rank Brothers LDT. L'intensité du courant est ensuite transformée en consommation d'oxygène grâce au logiciel *DatLab* (Gnaiger, 2020).

c- Mesure de la consommation d'O₂

La respiration mitochondriale (consommation d'O₂) à partir de mitochondries isolées (Rank Brothers) ou d'érythrocytes (Oroboros), est initiée par l'ajout de substrats énergétiques. L'addition de différents substrats énergétiques, d'ADP et d'inhibiteurs de l'activité respiratoire, permet de mesurer l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire. Le **Tableau 3**, regroupe les effecteurs mitochondriaux utilisés tout au long de la thèse. L'utilisation de ces différents effecteurs, ensemble ou séparément permette l'obtention de ce que l'on appelle des « états respiratoires ». En présence de substrats seuls (pyruvate, succinate, malate, palmitoyl-carnitine ou glycerol-3-P), la consommation d'oxygène mesurée est considérée comme basale, car non liée à une production d'ATP. Cette respiration correspond à la respiration **LEAK**, également souvent nommée **état 2**, puisque son intensité dépend majoritairement des fuites de protons qui ont lieu à travers la membrane interne mitochondriale. Pour activer la partie phosphorylante, il faut donc ajouter de l'ADP. On obtient alors la respiration phosphorylante **OXPHOS**, également nommée **état 3** de la respiration. L'inhibition de la production de l'ATP par un inhibiteur spécifique, comme l'oligomycine, permet d'obtenir un **état 4** de la respiration, qui correspond également à une respiration **LEAK**.

Pour estimer le niveau de couplage mitochondrial à partir des activités respiratoires, et évaluer la qualité de la préparation mitochondriale, on utilise le rapport du contrôle respiratoire (RCR). Il représente la respiration mitochondriale soutenant la synthèse de l'ATP par rapport à celle requise pour compenser la fuite de protons (Salin et al., 2018) et on l'estime par les formules suivantes :

$$\text{RCR} = \frac{\text{État 3 ADP}}{\text{État 4 oligo}} \quad \text{ou} \quad \frac{\text{État 3 FCCP}}{\text{État 4 oligo}}$$

Cependant, le RCR présente quelques limitations conceptuelles conduisant à un biais statistique (variances non symétriques) que l'on peut contourner en calculant un autre indice de couplage mitochondrial (Gnaiger, 2020) : l'efficacité de contrôle P-L (« P_L control efficiency »). L'efficacité du contrôle P-L est le rapport entre la capacité OXPHOS nette et la capacité OXPHOS totale, qui est égale à l'efficacité du couplage biochimique E-L, pour un système entièrement couplé (lorsque le RCR se rapproche de l'infini) :

$$\text{P-L control efficiency} = 1 - \left(\frac{LEAK}{OXPHOS} \right)$$

Ce paramètre qui décrit le contrôle du flux d'ADP sur l'oxydation du substrat peut-être, en effet, considéré comme un indicateur de l'efficacité du couplage OXPHOS. Une valeur proche de 1 indique une respiration couplée maximale, et une valeur de 0 indique une respiration non contrôlée par l'ADP.

Effecteurs	Nature	Fonctionnement	Induction d'un état respiratoire	Concentration en [mM]
Pyruvate	Substrat respiratoire glucidique	La décarboxylation oxydative de ce substrat fournit le NADH, qui sera oxydé au niveau du complexe I	État 2, respiration basale non phosphorylante (LEAK)	5 mM
Succinate	Substrat respiratoire, métabolite intermédiaire du cycle de Krebs	Transformé en fumarate au niveau du complexe II, fournissant également des électrons (via FADH ₂)	État 2, respiration basale non phosphorylante (LEAK)	5 mM
Glycerol-3-phosphate	Substrat de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale	Génération de FADH ₂ et transfert d'électrons au coenzyme Q	État 2, respiration basale non phosphorylante (LEAK)	10 mM
Palmitoyl-L-Carnitine	Dérivé ester de la carnitine impliquée dans le métabolisme des acides gras	Le palmitoyl-carnitine est transporté dans les mitochondries et transformé en acyl-coA nécessaire à l'oxydation des acides gras (β -oxydation) et à la production d'énergie	État 2, respiration basale non phosphorylante (LEAK)	40 μ M
Malate	Substrat de la malate déshydrogénase, formé à partir du fumarate et oxydé en oxaloacétate (cycle de Krebs). Il ne peut traverser la bicouche lipidique des membranes et a donc besoin d'une navette	Il est ajouté en complément de chacun des autres substrats, car il permet d'entretenir le cycle de Krebs et ainsi le métabolisme mitochondrial	État 2, respiration basale non phosphorylante (LEAK)	2,5 mM
ADP	L'adénosine diphosphate est un nucléotide. C'est un substrat de l'ANT et de l'ATP synthase	L'ADP est phosphorylé au niveau de l'ATP synthétase avec un phosphate inorganique (Pi) afin de former de l'ATP	État 3, respiration phosphorylante (- OXPHOS)	A saturation (500 μ M) ou moins
Oligomycine	Inhibiteur de la CRM	Inhibiteur de l'ATP synthase en bloquant son canal à protons, qui est nécessaire à la phosphorylation oxydative de l'ADP en ATP	État 4, respiration non phosphorylante (LEAK)	2 μ g.mL ⁻¹
Antimycine A	Inhibiteur de la CRM	Inhibiteur du complexe III et du transfert d'électrons jusqu'à l'accepteur final	Consommation d'oxygène résiduelle non mitochondriale	2,5 - 5 mM
Rotenone	Inhibiteur de la CRM	Inhibiteur du complexe I et inhibe donc l'oxydation du NADH, pas de transfert d'électron jusqu'à l'accepteur final. On l'utilise souvent avant le succinate pour éviter le flux réverse des électrons.	Blocage de la respiration au niveau du complexe I	0,5 - 2 μ M
FCCP	Agent découplant	Réduction du gradient électrochimique de proton	État découplé, respiration mitochondrial maximale	2 μ M
Ascorbate + TMPD	Couple de donneur d'électrons à la CRM	Permet la réaction d'oxydation - réduction en fournissant une quantité élevée d'électrons au niveau du complexe IV, permettant de stimuler au maximum cette enzyme (COX)	Capacité oxydative maximale mitochondriale	4 mM/0,5 mM
Cytochrome c	Composant de la voie de transfert d'électrons	Utilisé sur mitochondries isolées, décongelées pour le transfert des électrons du complexe III au IV. Après injection sur mitochondries fraîchement isolées, l'augmentation de la respiration est synonyme d'une détérioration de la membrane externe mitochondriale	Consommation d'oxygène d'intensité variable	12 μ M

Tableau 3 | Résumé des effecteurs mitochondriaux appliqués à la chaîne respiratoire mitochondrial (CRM), dans les études oiseaux et Pigeon vs Rat.

2. Synthèse d'ATP

Dans le cas des mitochondries isolées provenant du muscle squelettique et du cœur, différentes concentrations d'ADP (5, 10, 20, 100 et 500 μM) sont injectées dans un milieu de respiration supplémenté avec du glucose (2M) et de l'hexokinase (1,5-2 U/mL). La présence du couple glucose/hexokinase permet de piéger l'ATP synthétisé par la mitochondrie sous la forme de glucose-6-phosphate et de régénérer l'ADP, permettant de maintenir différents états phosphorylants stables mais d'intensités variables. La consommation d'oxygène a été mesurée durant 2 minutes pour chaque état énergétique, puis 4 aliquotes (100 μL) de la suspension mitochondriale ont été prélevées toutes les minutes et placées dans une solution d'acide perchlorique (10 % HClO_4 , 25 mM EDTA) afin de précipiter les protéines et ainsi stopper les réactions enzymatiques. Après une centrifugation à 21 000 g durant 5 minutes (4°C), le surnageant a été neutralisé grâce à une solution de KOH (0,2 M KOH et 0,3 M MOPS). La solution neutralisée est à nouveau centrifugée à 21 000 g durant 5 minutes (4°C). Un aliquot du surnageant est ensuite utilisé pour doser le glucose-6-phosphate.

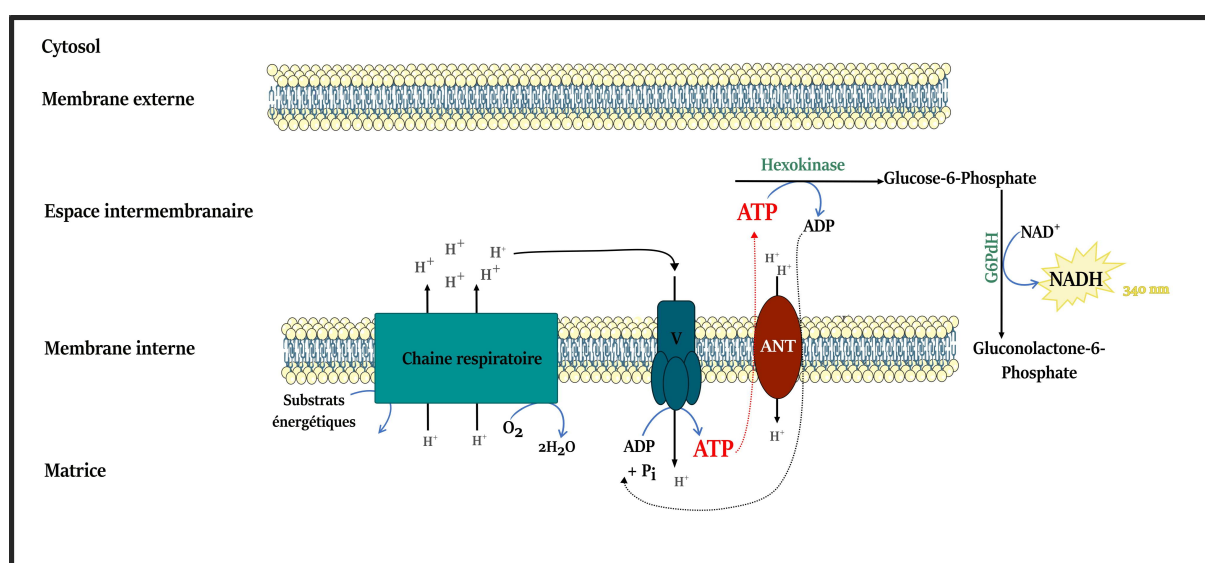


Figure 3 | Schéma de la méthode de dosage enzymatique de la production d'ATP. ANT : Adénine Nucléotide Translocase ; ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate ; G6PdH : glucose-6-phosphate déshydrogénase

La production d'ATP est déterminée à partir de la teneur en glucose-6-phosphate (Glc-6-P) des échantillons dans le milieu de dosage contenant : 50 mM triéthanolamine-HCl, 7,5 mM MgCl_2 , and 3,75 mM EDTA, 0,5 mM NAD^+ , 0,5 U de glucose-6-phosphate déshydrogénase de *Leuconostoc mesenteroides* (pH 7,4 à température ambiante). La production de NADH, qui

dépend de la concentration en glucose-6-phosphate présente dans le milieu, est mesurée à 340 nm (**Figure 3**). Comme toutes les réactions mises en jeu ($\text{ATP} \rightarrow \text{glc-6-Pi} \rightarrow \text{NADH}$) sont équimolaires, le dosage du NADH en fonction du temps (1 prélèvement toutes les minutes) permet de calculer la production d'ATP mitochondrial. Les mêmes expériences ont été effectuées en présence d'oligomycine ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), pour vérifier que la synthèse d'ATP était spécifique à l'activité de l'ATP synthétase.

L'efficacité du couplage mitochondrial de la phosphorylation oxydative, c'est-à-dire le rapport ATP/O, a été calculée en divisant le taux d'ATP synthétisé par unité de temps et par quantité de protéines mitochondriales ($\text{nmol ATP/min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) avec la consommation d'O₂ au cours de l'état 3, par unité de temps et par quantité de protéines mitochondriales ($\text{nmol O/min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) permet de visualiser le rapport ATP/O. En fonction de la concentration d'ADP injectée, on peut déterminer deux types de rapport ATP/O :

$$(1) \quad \frac{ATP}{O} \text{ maximal} = \frac{\text{synthèse ATP}}{\text{consommation O}_2} \text{ , à l'état phosphorylant maximal (500 } \mu\text{M ADP),}$$

permettant d'estimer l'efficacité mitochondriale maximale et donnant une indication de la stœchiométrie finale de la phosphorylation oxydative

$$(2) \quad \frac{ATP}{O} \text{ effective} = \frac{\text{synthèse ATP fixe}}{\text{consommation O}_2 \text{ phosphorylante}} \text{ , représente la capacité de la}$$

mitochondrie à générer une certaine quantité d'ATP (fixe, donnée) par molécule d'oxygène consommée. L'efficacité effective prend en compte le flux d'oxygène basal.

3. Production de ROS

La mesure de la production de ROS s'effectue indirectement par le dosage de H₂O₂ issu de la dismutation de l'anion superoxyde produit par la superoxyde dismutase mitochondriale. Le dosage se réalise sur des mitochondries isolées (en parallèle de la respiration mitochondriale). Le taux de H₂O₂ libéré par les mitochondries du muscle squelettique et du cœur a été mesuré dans un tampon respiratoire complété par 5 U/mL de peroxydase et 1 μM d'Amplex Red (colorant fluorescent) à 37, 40 ou 43°C, à l'aide d'un fluorimètre (SFM-25, Kontron Instrument, Augsburg, Germany). En présence de peroxydase, l'Amplex red réagit pour former la Resorufin qui est excitée à 560 nm (longueur d'onde d'excitation) et qui émet à 584 nm (longueur d'onde

d'émission). Les taux de génération de H₂O₂ ont été enregistrés en présence des substrats seuls (5 mM pyruvate/2,5 mM malate/5 mM succinate - état basal non phosphorylant) et après l'ajout d'ADP (état actif, phosphorylant). Le signal de fluorescence a été préalablement calibré après ajouts successifs de H₂O₂ (jusqu'à 35 pmoles).

4. Mesure des activités enzymatiques tissulaires et mitochondriales

Les activités enzymatiques de la lactate déshydrogénase et de la citrate synthase ont été mesurées à partir d'homogénats de muscle squelettique, cœur et foie. Les activités enzymatiques des complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale ont été mesurées sur des mitochondries isolées du muscle squelettique et du cœur.

a- La lactate déshydrogénase (LDH)

La LDH est une enzyme, « marqueur » du métabolisme glycolytique dans le cytosol, qui régénère le NAD⁺ à partir du NADH et du pyruvate (dernier produit de la glycolyse), formant ainsi du lactate dans les conditions anaérobies.

Le dosage de la LDH a été effectué grâce à un dosage spectrophotométrique (340 nm), à partir de la mesure de disparition du NADH au cours de la réaction :

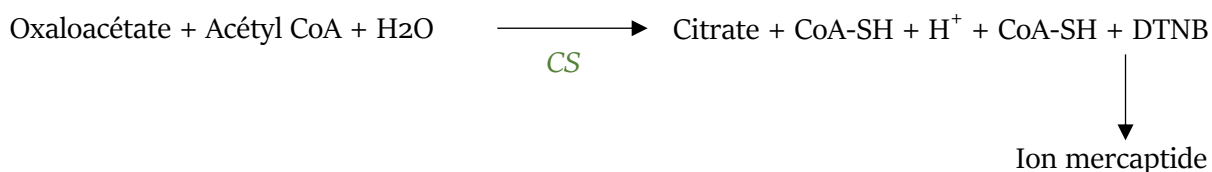


La réaction étant équimolaire, le dosage de NADH permet de déterminer l'activité de la LDH de chaque échantillon. Premièrement, 3 à 7 µL d'échantillon (dilué 1 :11) étaient ajoutés dans chaque puits, suivi de 250 µL d'un tampon de réaction (20 mM Imidazole, 0,02 % BSA, 280 µM NADH). L'activité de la LDH était mesurée par l'absorbance du NADH à 340nm à 37, 40 et 43°C (BioTek® Epoch-2). Le logiciel Gen5® a permis d'obtenir les pentes de l'activité LDH lorsque 10 µL de pyruvate (5 mM) ont été ajoutés pour démarrer la réaction. L'activité enzymatique de la LDH a été déterminée par la loi de Beer-Lambert, où $A = \epsilon \cdot l \cdot c$, avec $\epsilon_{\text{NADH}} = 6\,220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, l la longueur de la cuve (0,6756 cm), c la concentration et A l'absorbance.

b- Citrate synthase (CS)

La CS est une enzyme clé du cycle de Krebs, catalysant la réaction irréversible de l'acétyl-CoA avec l'oxaloacétate pour former le citrate (1^{ère} étape du cycle de Krebs).

Le dosage de la CS a été effectué grâce à un dosage spectrophotométrique (412 nm), à partir de la mesure d'apparition de l'ion mercaptide, au cours de la réaction :



La réaction étant également équimolaire le dosage de l'ion mercaptide permet d'activité de la CS de chaque échantillon. 3 à 7 µL d'échantillon (dilué 1 :11) étaient ajoutés dans chaque puits, suivi de 250 µL d'un tampon de réaction (100 mM TRIS pH 8, 300 µM Acetyl-CoA, 10 µM DTNB). L'activité de la CS était mesurée par l'absorbance de l'ion mercaptide à 412 nm à 37, 40 et 43°C (BioTek® Epoch-2). Le logiciel Gen5® a permis d'obtenir les pentes de l'activité CS lorsque 10 µL d'oxaloacétate (400 µM) ont été ajoutés pour démarrer la réaction. L'activité enzymatique de la CS a été déterminée par la loi de Beer-Lambert, avec $\epsilon_{\text{ion mercaptide}} = 13\,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Son activité, exprimée par quantité de tissu, est un marqueur de la capacité aérobie oxydative et de la densité mitochondriale. L'activité de la citrate synthase a également été mesurée à partir d'échantillons de mitochondries isolées. On obtient alors l'activité de la CS, mitochondriale exprimée en $\text{nmol}/\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéine mitochondriale. Par la suite, on peut mesurer le contenu mitochondrial des tissus musculaires (mg de protéines mitochondriales/ mg de tissu musculaire) par le rapport entre l'activité CS mesurée dans le tissu et celle mesurée dans des mitochondries isolées.

À partir des activités LDH et CS, on a calculé le rapport : LDH/CS qui renseigne sur l'évolution du pattern glycolytique du tissu.

c- NADH ubiquinone oxydo-reductase (complexe I)

Le complexe I est le premier complexe de la chaîne respiratoire, il transfère les électrons du NADH à l'ubiquinone. Son activité est mesurée par un dosage en spectrophotométrie, en suivant la diminution de l'absorbance du NADH à 340 nm (oxydation du NADH). L'ubiquinone, très

hydrophobique, est remplacée par le décyl-ubiquinone, une forme plus hydrophile. Comme le NADH peut aussi être oxydé par une autre enzyme, la NADH b5 oxydo-reductase (dont l'activité est insensible à la roténone), il est nécessaire d'évaluer en parallèle l'activité du complexe I en présence de la roténone, un inhibiteur du complexe I.

Ainsi, l'activité spécifique du complexe I = activité sensible à la présence de roténone = activité totale – activité insensible à la roténone.

Entre 4 et 7 μL d'échantillon (dilué 1 : 21), étaient ajoutés dans chaque puits, suivi de 250 μL d'un tampon de réaction (50 mM tampon phosphate/1 mM EDTA, 100 μM décyl-ubiquinone, 3,75 g.L^{-1} BSA, avec ou non 10 μM roténone). La réaction est initiée par l'ajout de NADH (120 μM) et mesurée à 340 nm à 37, 40 et 43°C (BioTek® Epoch-2). Le logiciel Gen5® a permis d'obtenir les pentes de l'activité du complexe I qui est exprimée en nmol NADH/min.mg de protéine par la loi de Beer-Lambert, avec $\epsilon_{\text{NADH}} = 6\,220\, \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

d- Succinate: ubiquinone oxydo-reductase (complexe II)

Le complexe II de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du succinate dont il transfère les électrons (via le FADH_2) au coenzyme Q10 ou ubiquinone. Cette molécule, très hydrophobe, est remplacée dans l'essai par la décylubiquinone, beaucoup plus hydrophile. L'activité est mesurée en suivant la réduction du 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP) par la baisse de l'absorbance à 600 nm du DCPIP oxydé.

Entre 4 et 7 μL d'échantillon (dilué 1 : 21), étaient ajoutés dans chaque puits, suivi de 250 μL d'un tampon de réaction (50 mM tampon phosphate/1 mM EDTA, 100 μM DCPIP, 1 mM KCN, 20 mM succinate et 2 g.L^{-1} BSA). L'activité du complexe II était mesurée par l'absorbance du DCPIP à 600 nm à 37, 40 et 43°C (BioTek® Epoch-2). Le logiciel Gen5® a permis d'obtenir les pentes de l'activité du complexe II lorsque 10 μL de décyl-ubiquinone (0,1 mM) ont été ajoutés pour démarrer la réaction. L'activité enzymatique du complexe II est calculé en nmol DCPIP/min.mg de protéine et a été déterminée par la loi de Beer-Lambert, avec $\epsilon_{\text{DCPIP}} = 19\,000\, \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

IV. PRISE EN COMPTE DE LA PHYLOGÉNIE DANS LES ÉTUDES COMPARATIVES

1. Les études comparatives

a- L'ascension des études comparatives

Les études comparatives se sont développées pour répondre à un grand nombre de questions sur l'évolution corrélée de caractères par une approche corrélatrice entre taxons, généralement entre espèces (Garamszegi, 2014). La plupart des études sont menées pour des caractères discrets et continus (comme la masse corporelle).

Au 18^{ième} siècle, Charles Darwin et Ernst Haeckel utilisaient l'anatomie comparée entre espèces pour tenter d'expliquer les patrons de diversité. Le fait de comparer plusieurs espèces entre elles étaient une approche classique utilisée depuis déjà bien longtemps. Dans les années 80, il y a un début de conscience que les espèces ne sont pas des données indépendantes. Ce changement de paradigme important dans l'application des méthodes comparatives s'est produit, principalement grâce aux travaux influents de Felsenstein en 1985. En effet, il établit que les variations interspécifiques ne peuvent pas être interprétées sans tenir compte de la phylogénie. D'un point de vue statistique, l'effet de la phylogénie peut être considéré comme un facteur de confusion qui viole les hypothèses de non-indépendance de l'unité d'analyse et qui introduit potentiellement des corrélations artéfactuelles entre les caractères/traits (Felsenstein, 1985; Westoby et al., 1995; Garamszegi, 2014) (**Figure 4**).

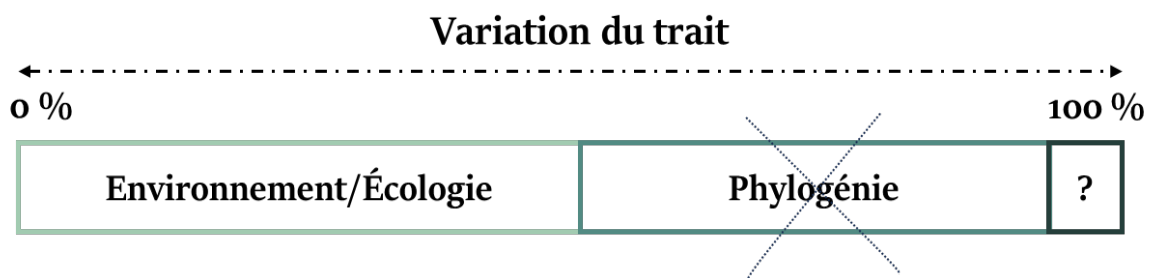


Figure 4 | Schéma illustrant les pourcentages de variation entre les espèces d'un trait, en corrélation avec la phylogénie et l'écologie. Modifié d'après Westoby et al., 1995.

b- Progression et prise en compte de la phylogénie

La méthode des contrastes indépendants de Felsenstein est alors utilisée comme un moyen efficace de se débarrasser des effets indésirables de la phylogénie. Elle est basée sur une matrice de variance-covariance, qui permet la mesure de la dépendance phylogénétique (structure) des données et sur le mouvement Brownien (variance linéairement liée au temps correspond à la longueur des branches sur l'arbre) caractérisant l'évolution des caractères/traits. Les variables sont transformées de manière à ne comparer que des points indépendants. La transformation implique la reconstruction des états ancestraux et la définition de « contrastes⁶ ». Les données transformées sont ensuite analysées par des méthodes classiques.

2. Application statistique phylogénétique pour nos oiseaux

a- L'approche fréquentiste

Les modèles « Phylogenetic Independent Contrast models » ou « PIC models » ont été construits générant des "contrastes" avec la fonction *pic()* du package R « *ape* » (Paradis, 2006; Paradis and Schliep, 2019) (**Figure 5**). L'arbre de nos espèces a été construit à partir d'un « super-arbre » phylogénétique des oiseaux (disponible sur [phyloT](#) - générateur d'arbres basé sur la taxonomie NCBI).

Cette méthode, permettant d'ajuster simultanément un modèle linéaire et des paramètres liés à la phylogénie nous offrait facilement l'estimation de la pente, correspondant à l'exposant allométrique *b*. C'est également une méthode qui a été utilisée lors des analyses comparatives au sein des espèces mammaliennes (Boël et al, 2019 ;2023) et qui a globalement très bien fonctionné. Cependant, lors de mes analyses sur les différentes espèces aviaires, il a été constaté une plus forte variabilité intra-espèce (inter-individuelle) chez les oiseaux qui n'était pas aussi présente chez les mammifères. Une des limitations de la méthode PIC est que l'intégration des individus se fait en moyennant tous les individus pour créer un seul contraste, associé à une

⁶ Les contrastes permettent de remplacer *n* valeurs corrélées par *n* – 1 différences indépendantes et de neutraliser la matrice de covariance phylogénétique et la valeur ancestrale du trait μ pour étudier simplement la matrice de covariance des traits. Cette simplification se fait au prix d'une légère perte de puissance : passage de *n* à *n* – 1 observations lors du calcul des contrastes (Bastide et al., 2022).

position (label) dans l'arbre phylogénétique. En résumé, un contraste indépendant correspond à une espèce qui elle-même correspond à la moyenne des individus d'une même espèce. Il n'y a donc pas de visibilité sur cette variabilité intra-espèce, ne pouvant donc pas être imputée comme effet aléatoire dans le modèle PIC.

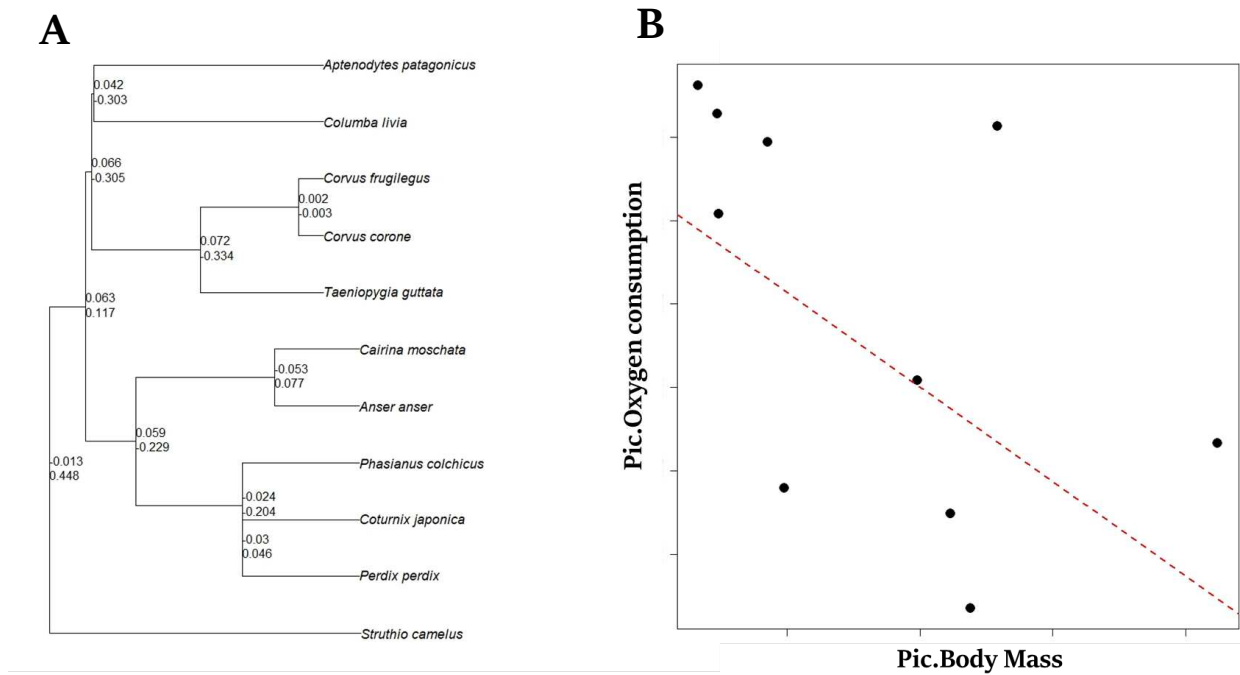
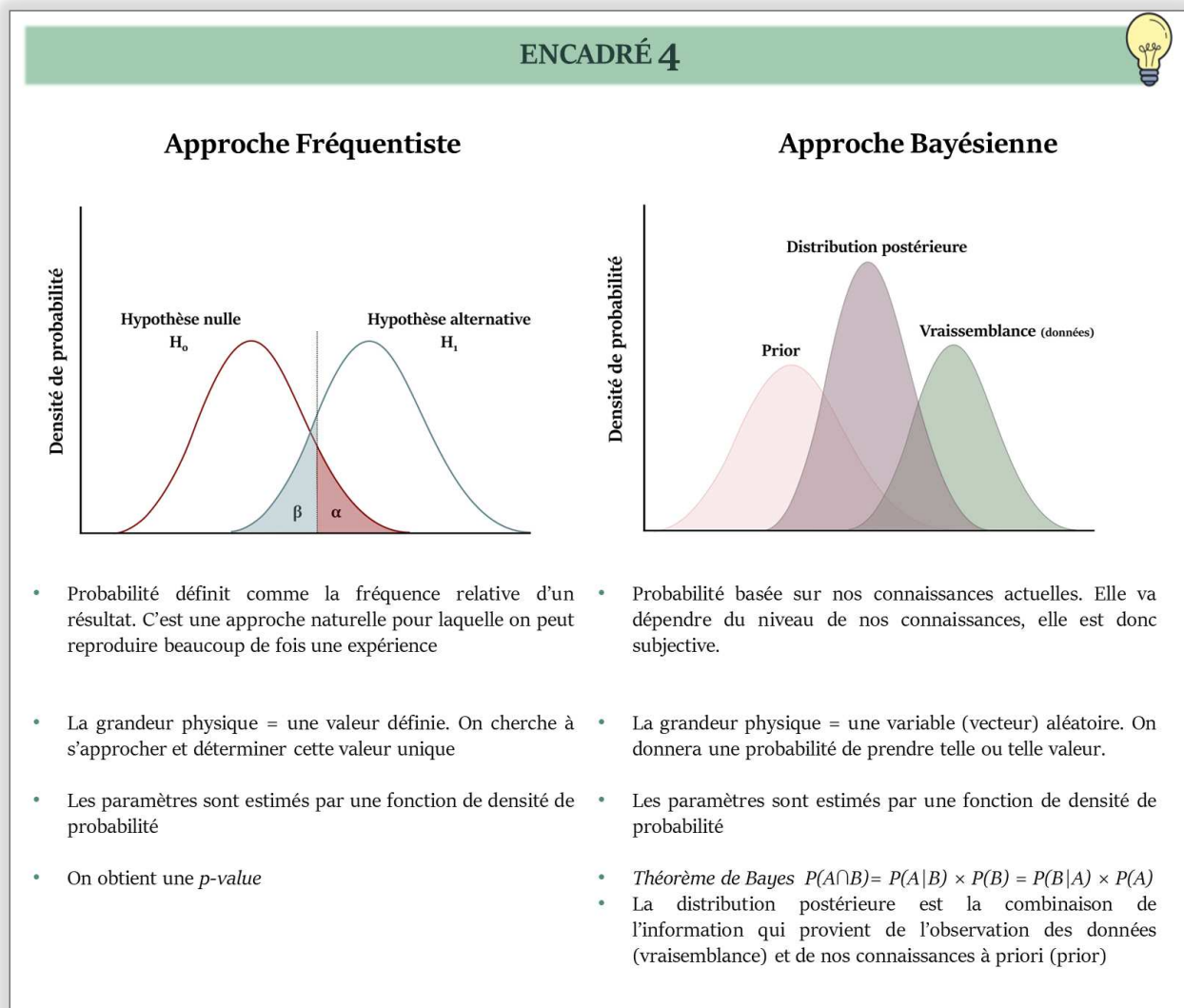


Figure 5 | Exemple des sorties des modèles PIC. **A)** Arbre des 11 espèces aviaires montrant des contrastes phylogénétiquement indépendants de $\log(\text{masse corporelle})$ et $\log(\text{consommation d'O}_2)$, en haut et en bas, respectivement. **B)** Graphique des 10 paires de contrastes issues de **A)**

Une autre méthode fréquentiste, prenant en compte la phylogénie est celle des moindres carrés généralisés (Phylogenetic Generalized Least Squares – PGLS). Les PGLS sont équivalents à la méthode PIC mais contiennent également des limites similaires aux méthodes PIC, n'intégrant pas la totalité des individus mais seulement une moyenne par espèce.

b- Bienvenue en Bayésie !

La méthode statistique prenant en compte la phylogénie et la variabilité inter-individuelle est celle de l'inférence Bayésienne (**Encadré 4**) qui a été appliquée à mes données aviaires.



Construction de l'arbre

L'arbre phylogénétique (**Figure 6**) combinant les espèces aviaires étudiées a été obtenu à partir du site BirdTree.org (Jetz et al., 2012; Rubolini et al., 2015). La source de l'arbre utilisée est basée sur la séquence moléculaire « Hackett Sequenced Species » offrant un ensemble de 10 000 arbres avec 6 670 OTUs chacun (Hackett et al., 2008). Par la suite, 1 000 simulations ont été réalisées sur le site pour créer l'arbre le plus parcimonieux à partir du site, en format nexus. L'arbre phylogénétique des oiseaux a été résumé à l'aide du logiciel BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees - version v1.10.4, 2002-2018) pour créer un arbre cible

utilisable au format nexus dans la version R 4.2.1 (R Core Team 2022). BEAST est un programme multiplateforme pour l'analyse bayésienne des séquences moléculaires, comme celle de Hackett, à l'aide de la méthode MCMC (Monte Carlo Markov Chain), pour que chaque arbre soit pondéré proportionnellement à sa probabilité a posteriori. Les paramètres utilisés étaient les suivants : *burn-in* en tant que nombre d'arbres (100), arbre de crédibilité maximale des clades comme arbre cible, et hauteurs des ancêtres communs.

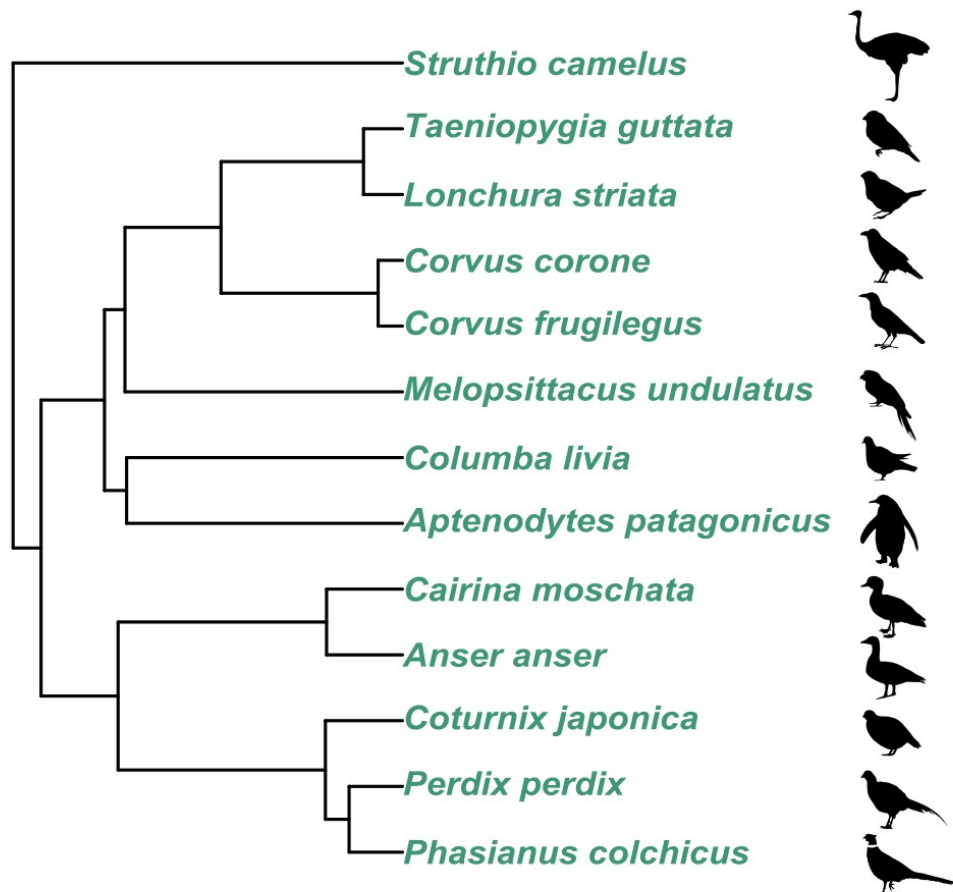


Figure 6 | Arbre phylogénétique regroupant les 13 espèces d'oiseaux étudiées dans l'étude allométrique sur la bioénergétique mitochondriale musculaire. L'arbre provient d'une phylogénie moléculaire, à ma connaissance la plus complète encore aujourd'hui, des 9 993 espèces d'oiseaux considérées en 2012 (BirdTree, Jetz et al., 2012). La séquence choisie provient de Hackett et al., 2008, examinant ~32 kilobases de séquences d'ADN nucléaire alignées à partir de 19 loci indépendants pour 169 espèces d'oiseaux.

Modèles phylogénétiques

Les modèles ont été ajustés en utilisant des modèles phylogénétiques mixtes bayésiens à partir du package MCMCglmm (Hadfield, 2010).

Globalement comment ça marche ? L'algorithme MCMCglmm utilise une approche d'estimation numérique de la distribution postérieure des paramètres par chaîne de Markov Monte Carlo (MCMC). Elle tient compte de la non-indépendance entre les espèces étroitement apparentées en incluant les relations phylogénétiques entre les espèces en tant que variable aléatoire.

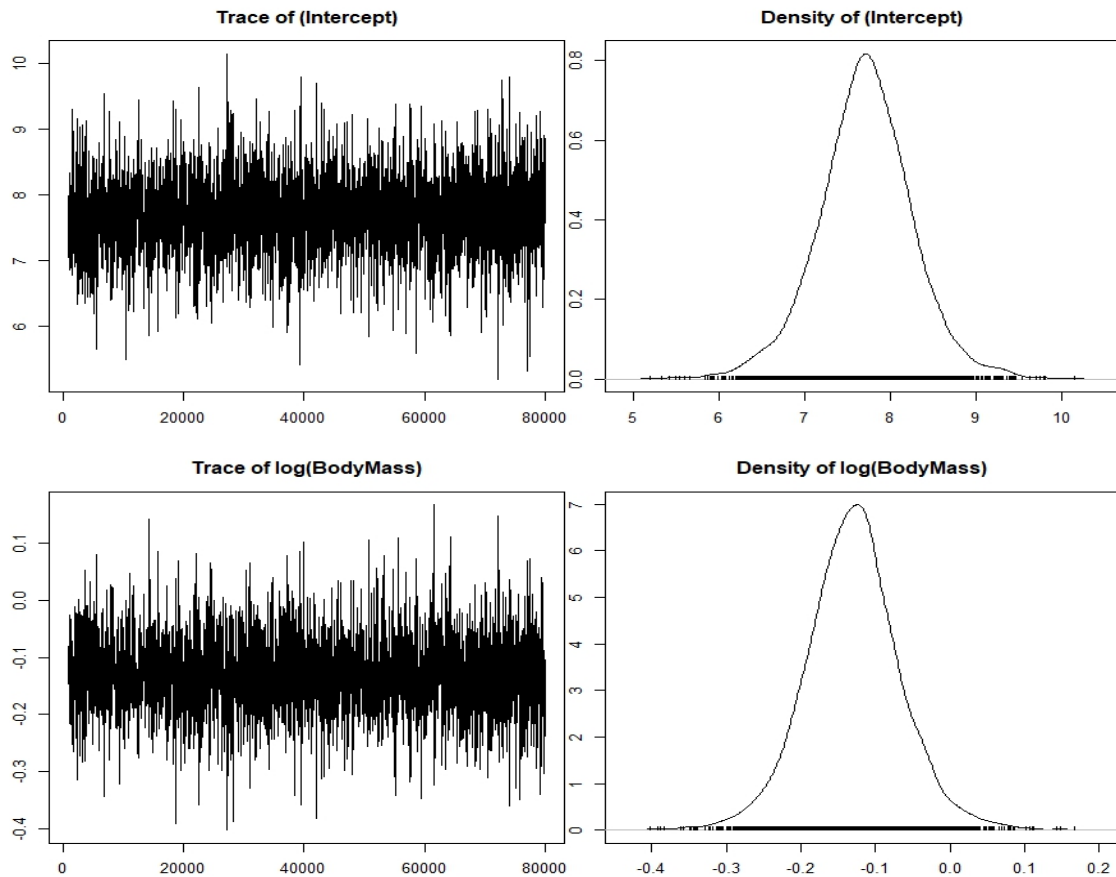


Figure 7 | Exemples des sorties graphiques des résultats MCMC. À droite sont représentées les estimations des distributions postérieures pour chacune des composantes du modèle (intercept, masse corporelle, effet aléatoire...). À gauche sont représentées les traces, c'est-à-dire l'évolution des valeurs échantillonnées au cours des itérations = valeurs de la chaîne. Cela nous permet de vérifier la convergence. Une façon de s'assurer de la convergence des chaînes est l'absence de tendance dans la trace.

Et plus précisément ? On a une équation dont les paramètres sont plus ou moins connus, pour une distribution (gaussienne par exemple), que l'on souhaite échantillonner. On définit un prior, qui est estimé à partir de notre niveau de connaissance. C'est ce que l'on sait ou en tout cas ce que l'on pense savoir, à quoi va ressembler la distribution postérieure des paramètres.

L'algorithme MCMC permet ensuite de lancer la chaîne de Markov⁷ sur la distribution postérieure, et le prior donne un point de départ à la chaîne. La chaîne se « balade » au niveau de cette distribution jusqu'à convergence, générant des valeurs qui sont corrélées entre elles, puisque la position de la valeur actuelle dépend de la précédente (**Figure 7**).

Les conditions pour qu'il y ait convergence :

- Un prior plus ou moins informatif.
- Le nombre de tirages (itération – *nitt*), doit être suffisamment grand.
- Parfois, la chaîne a du mal à se lancer au début ou explore dans un environnement loin du point de convergence. Elle génère alors des valeurs qu'il va falloir écarter. C'est ce que l'on nomme le *burn-in*.
- Puisque les valeurs sont corrélées entre elles, on génère un sous-échantillonnage, pour lequel on ne prend que 1 valeur sur 10, 100... de façon à les avoir décorréliées en les espaçant suffisamment. C'est ce qu'on nomme le pas ou le « *thin* ». Les modèles linéaires mixtes sont donc générés, avec une syntaxe plutôt classique (*Masse corporelle ~ Paramètre mitochondrial*), en précisant donc les effets fixes et les effets aléatoires (espèce, saison, statut nutritionnel...) et les arguments décrits précédemment (*prior*, *nitt*, *burn-in*, *thin*...). La phylogénie est prise en compte dans ces modèles mixtes bayésiens en associant le modèle à une matrice inversée provenant de l'arbre phylogénétique (ultramétrique) de nos espèces d'oiseaux.

Plusieurs modèles ont été testés et la fonction DIC (Deviance Information Criterion) a été utilisée pour la sélection de modèle, s'apparentant à l'AIC fréquentiste (avec des propriétés différentes). Nous obtenons une moyenne postérieure de la distribution postérieure correspondant à l'intercept et à la pente (exposant allométrique). Ces paramètres sont encadrés par des limites inférieure et supérieure de l'intervalle crédible à 95 % (c'est-à-dire que la vraie valeur du paramètre a une probabilité postérieure de 0,95 de se situer dans cet intervalle). Au contraire de l'approche fréquentiste qui nous donne une p-value, on obtient une p_{MCMC} . Cette dernière fournit un degré de signification pour le paramètre s'éloignant de zéro. Il ne s'agit pas

⁷Marche aléatoire dans un espace à n dimension. La chaîne de Markov est une chaîne « sans mémoire » car l'évolution de la chaîne ne dépend que de l'état actuel. La probabilité de position du point ne dépend que de la probabilité du point précédent.

exactement d'une p-value, mais elle fournit le même type d'information. Si la p_{MCMC} est faible, cela indique une forte significativité loin de zéro.

c- Validité des deux approches

Dans la communauté scientifique, l'approche Bayésienne et notamment la méthode MCMCglmm est assez bien appréhendée pour les questions écologiques (Zhang et al., 2011; Zapata-Cuartas et al., 2012; Healy et al., 2014; Shrimpton et al., 2021) ou théorique et utilisant des méta-analyses (Giancarli et al., 2023). Les études, dont les outils physiologiques sont principalement utilisés privilégient encore l'approche fréquentiste mais quelques publications récentes et notamment sur le lien entre masse corporelle et métabolisme, émergent petit à petit (Dunn et al., 2018; Naya et al., 2018; White et al., 2019; Giancarli et al., 2023).

Bien que les deux approches s'affrontent assez régulièrement, dans mon travail de thèse il n'est pas question de prendre parti pour l'une des deux écoles. Les deux approches (Fréquentiste : PIC / Bayésien : MCMCglmm) sont totalement viables et apportent chacune leurs avantages et inconvénients (**Encadré 4**). Nous avons seulement fait un choix en fonction de nos données et des contraintes statistiques que générerait la variabilité de nos modèles biologiques aviaires.

L'approche fréquentiste est une approche naturelle si on peut reproduire un nombre important de fois une expérience, le problème survient si le nombre est limité. Les jeux de données concernant nos espèces aviaires représentent un effort échantillonnage (N) non négligeable mais malheureusement les études allométriques nécessitent souvent un échantillonnage considérable avec lesquelles les outils physiologiques et éthiques se confrontent (White and Seymour, 2005). L'approche Bayésienne est alors une alternative à cela et apporte en plus une solution à la prise en compte de la variabilité intra-espèce.



RÉSULTATS

CHAPITRE 1 - Patterns allométriques mitochondriaux chez les oiseaux

Article n° 1 | L'effet de la masse sur l'efficacité mitochondriale des oiseaux est dépendant du tissu : Comparaison entre le muscle squelettique et le cœur

J.Barbe , J.Watson, D.Roussel et Y.Voituron
En révision dans Journal of Experimental Biology

CONTEXTE & OBJECTIFS

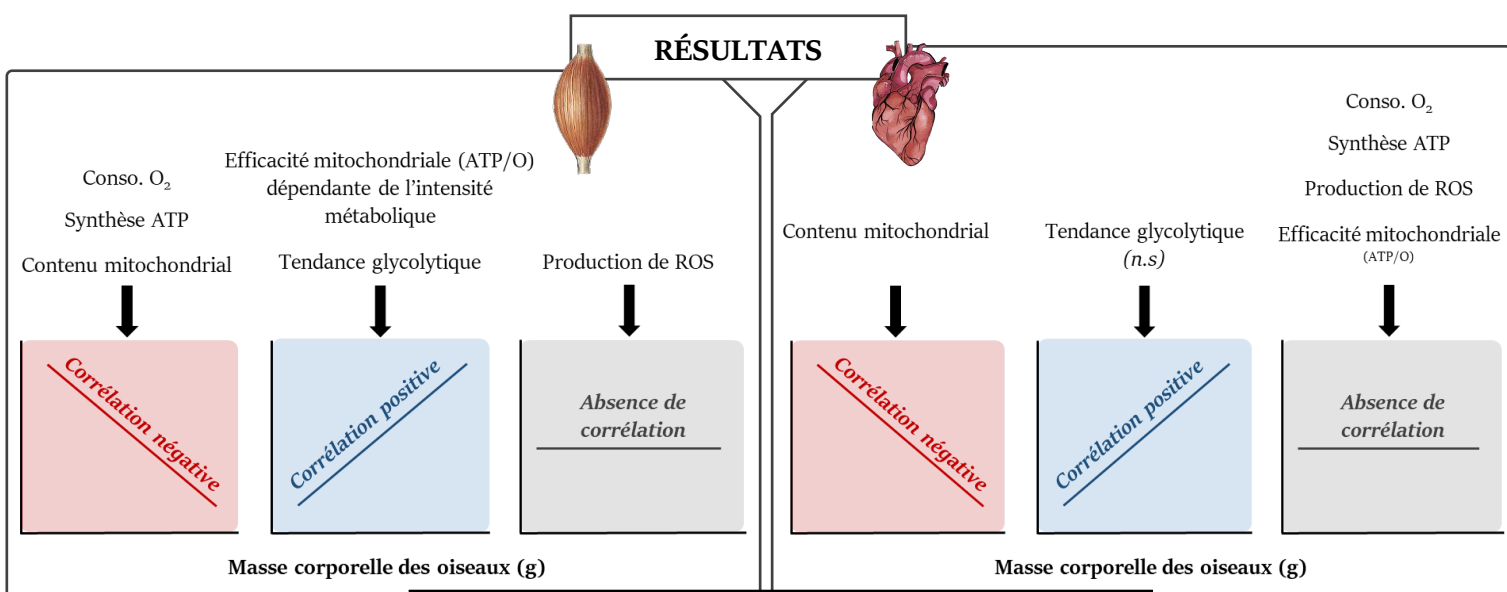
La masse corporelle est l'un des éléments les plus fondamentaux et les plus significatifs caractérisant les propriétés d'un organisme. Les études allométriques reliant l'effet de la masse corporelle et les taux métaboliques de base (échelle de l'organisme) ont été intensivement explorés alors que l'efficacité de la transduction de l'énergie (rapport mitochondrial ATP/O) est peu comprise et a seulement fait l'objet d'une étude sur les mammifères par notre laboratoire en 2019.

L'objectif de cette étude a été d'investiguer les patterns allométriques concernant la bioénergétique mitochondriale chez les oiseaux. Un second objectif a été de comparer les patterns allométriques mitochondriaux, dans différents tissus musculaires : muscles squelettique et cardiaque, dont les besoins énergétiques et les intensités métaboliques de fonctionnement diffèrent.

MÉTHODES

Les mitochondries ont été isolées à partir de muscles squelettique et cardiaque de 13 espèces d'oiseaux, dont la masse corporelle variait entre 15 g et 160 kg. Les paramètres mitochondriaux : synthèse d'ATP, consommation d'O₂, production de ROS, efficacité de couplage mitochondriale (ATP/O) et des activités enzymatiques ont été mesurés selon le protocole présenté dans la section « Matériels et Méthodes » de la thèse et dans l'article suivant.

RÉSULTATS



**L'EFFET DE LA MASSE CORPORELLE DES OISEAUX
SUR LA BIOÉNERGÉTIQUE MITOCHONDRIALE EST
DÉPENDANT DU TISSU MUSCULAIRE**

Research article:

The allometry of mitochondrial efficiency is tissue-dependent: A comparison between skeletal and cardiac muscles of birds

Jessica Barbe^{1*}, Julia Watson¹, Damien Roussel^{1#}, and Yann Voituron^{1#}

¹ Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69622, Villeurbanne, France

*Author for correspondence (jessica.barbe@univ-lyon1.fr)

These authors equally contributed to this work

Abstract

Body mass is known to be a fundamental driver of many biological traits, including metabolism. However, the effect of body mass on mitochondrial energy transduction is still poorly understood and has mainly been described in mammals. Using 13 species of birds ranging from 15 g (finches) to 160 kg (ostrich), we report here that the mitochondrial production of ATP, and corresponding oxygen consumption are negatively dependent on body mass in skeletal muscles but not in the heart. Results also showed that mitochondrial efficiency was positively correlated to body mass at sub-maximal phosphorylating states in the skeletal muscle, but not in the heart. This difference between muscle tissues is potentially linked to the difference in energetic demand expandability and the heavy involvement of skeletal muscle in thermoregulation.

Keywords: Bioenergetics, endotherms, ATP/O, body mass, metabolic scope, phylogeny

Introduction

Body mass (BM) is certainly one of the most fundamental and significant elements that characterize an organism's morphological, behavioural, physiological, and ecological properties (Calder, 1984; Demetrius, 2006; Peters, 1983). Allometry, or the biology of scaling to body mass, is particularly useful in comparative biology and has been extensively explored across the full domain of life (Peters, 1983; West and Brown, 2004b; West and Brown, 2005; Hulbert et al., 2007; White et al., 2019; Hatton et al., 2019). Metabolism sustains life by processing energy intakes from the environment into usable cellular energy that an organism can ultimately allocate to various functions depending on biological/ecological constraints (Glazier, 2015; Koch et al., 2021). The equation describing the influence of body mass on basal and standard metabolism is $Metabolic\ Rate = aBM^b$, where a is the normalizing coefficient and b is the scaling exponent depending on metabolic activity and phylogenetic status (Demetrius, 2006; Glazier, 2015, 2022). Studies focused on the subcellular level have reported that interspecific variation in body mass impacts numerical aspects of mitochondrial bioenergetics, such as oxidative and phosphorylation capacities, membrane proton conductance, and reactive oxygen species (ROS) production (Porter and Brand, 1993; Emmett and Hochachka, 1981; Porter and Brand, 1995; Porter et al., 1996; Darveau et al., 2002; Hulbert et al., 2002b; Brand et al., 2003; Else et al., 2004; Turner et al., 2005; Turner et al., 2006; Roussel et al., 2015; Boël et al., 2019; Voituron et al., 2020).

Mitochondria have a central role in global energy modulation, consuming approximately 90% of the oxygen inhaled by the organism to create a proton gradient across the inner mitochondrial membrane. Maintenance of this gradient of proton involves the transfer of electrons through a series of complexes in which some electrons can leak to react with molecular oxygen and form incompletely reduced superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and other downstream ROS. The proton gradient is used by the ATP synthase to generate ATP, a molecule that fuels nearly all of the physiological processes supporting the survival and performance of the organism. However, part of the proton gradient can also be dissipated by proton leak pathways, which divert energy away from ATP synthesis into heat production (Porter and Brand, 1993; Porter and Brand, 1995; Rolfe and Brown, 1997; Brand, 2000; Brand et al., 2005). The consequence of the proton leak is an alteration of the amount of ATP molecules synthesized by mitochondria for each oxygen atom consumed, i.e., the mitochondrial coupling efficiency (ATP/O ratio), and a reduction of the net ROS production. Therefore, mitochondrial coupling efficiency appears to be a key parameter of energy transduction, and variation in the efficiency of ATP production may have important consequences on individual performances (Salin et al., 2015; Koch et al., 2021).

In an allometric context, studies have shown that mitochondrial efficiency correlates positively with body mass in skeletal muscles of mammals but this correlation depends on the metabolic intensity (Boël et al., 2019). Indeed, when the rate of ATP synthesis was reduced 40-fold, the mitochondrial efficiency dropped by 20-fold in the smallest mammals and by only 7-fold in the largest ones. Such a reduction of the coupling efficiency may favor heat generation, and thus help compensate for heat loss in small mammals, especially at rest. However, extending such “activation” dependence to other tissues is still an open question. Here, we have hence focused on mitochondrial bioenergetics of skeletal and cardiac muscles, as both tissues are significant contributors to the standard metabolism of endotherms (Field 2nd et al., 1939; Konarzewski and Diamond, 1995; Raichlen et al., 2010) but exhibit different energetic requirements and metabolic scopes. Indeed, the skeletal muscle is regularly subjected to different metabolic intensities since it can switch from a resting state to a maximal state to ensure the locomotor function, whereas the heart muscle is always in an active state. We, therefore, investigated mitochondrial efficiency flexibility as a function of body mass in two muscle tissues that are contrasted in their range of activities. The aim of the present study was to explore mitochondrial bioenergetics (i.e., the triad of O_2 consumption, ATP synthesis, and ROS generation) in addition to certain key enzyme

activities of metabolic pathways (citrate synthase and lactate dehydrogenase) in the avian clade, through 13 bird species ranging from 15 g to 160 kg.

Materials and Methods

Animals and tissue sampling

All experiments were conducted in accordance with the animal care guidelines of the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. We complied with Article R. 427-6 of the Environmental Code regarding wildlife species.

We selected 13 species of birds ranging from 15 g (zebra finch) to 160 kg (ostrich). Muscle tissues (skeletal muscle and heart) were acquired fresh and used for mitochondrial extraction. Ostriches (*Struthio camelus*), Geese (*Anser anser*), Ducks (*Cairina moschata*), Pheasants (*Phasianus colchicum*), Partridges (*Perdix perdix*), and Quails (*Coturnix japonica*) were obtained from local breeders or slaughterhouses. Pigeons (*Columba livia*), Rooks (*Corvus frugilegus*), and Carrion crows (*Corvus corone*) were obtained from certified trappers (Associations des Piégeurs Agréés de l'Ain et du Rhône). Zebra finches (*Taeniopygia guttata*), Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*), and Bengali finches (*Lonchura striata*) obtained from local providers were killed by cervical dislocation. King penguins (*Aptenodytes patagonicus*) were captured during one austral summer campaign at the French Alfred Faure Station, Crozet archipelago (Possession Island, 46°25'S, 51°45'E). According to the Agreed Measures for the Preservation of Antarctic and Sub-Antarctic Fauna and the ethical approval from the French Committee for Polar Research (IPEV program 131), superficial pectoralis muscle was surgically biopsied under general isoflurane anesthesia (heart was not sampled in this species). After surgery, the birds were allowed to recover in an outside enclosure for 4–7 days and then released at the site of their capture.

Mitochondrial isolation

Pectoralis and heart muscle samples (approx. 2 g) were collected, kept on ice-cold isolation buffer, and used within two hours for mitochondrial preparation. The ostrich is a flightless bird for which we therefore collected the gastrocnemius instead of the pectoralis, as was the case in all other flying and swimming species. Indeed, in the ostrich, the gastrocnemius is a primary

locomotion muscle, i.e., running, and exhibits a relative proportional distribution muscle fibers type with a slight predominance of FG fibers (Velotto and Crasto, 2004; Kohn et al., 2023). Skeletal muscle and heart mitochondrial populations were isolated in ice-cold isolation buffer (100 mM sucrose, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, and 50 mM Tris-base, pH 7.4), following a standard extraction protocol, using a Potter–Elvehjem homogenizer, protease digestion, and differential centrifugation, all steps at 4 °C. Briefly, muscle tissues were finely cut up, homogenized with a Potter–Elvehjem homogenizer (five passages), and centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min. The supernatant containing subsarcolemmal mitochondria was conserved in an ice bath and the pellet containing intermyofibrillar mitochondria was suspended in isolation buffer and treated with protease from *Bacillus licheniformis* ($1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ muscle wet mass) for 5 min in an ice bath. The homogenate was diluted (1:2) using the supernatant from the first centrifugation, and the mixture was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min. The resulting supernatant was filtered and centrifuged at $8700 \times g$ for 10 min to pellet the mitochondria. The mitochondrial pellet was then resuspended in isolation buffer and centrifuged at $8700 \times g$ for 10 min, and this wash step was repeated once. Protein concentrations were determined in the mitochondrial suspension using the BCA protein assay (Pierce, ThermoFisher Scientific, France) with bovine serum albumin as the standard.

Mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency

The mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency was assessed at 40 °C by measuring the rates of oxygen consumption (Clark oxygen electrode, Rank Brothers Ltd, UK) and ATP synthesis from the same mitochondrial aliquots. For *Aptenodytes patagonicus*, mitochondrial parameters were assayed at 38 °C, and the values were recalculated to 40 °C using a Q_{10} of 3.5 for oxygen consumption and 2.9 for the ATP synthesis rate (D. Roussel personal data). Mitochondria were incubated in respiratory buffer (120 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 3 mM HEPES, and 0.3% BSA, pH 7.4) supplemented with an ADP-regenerating system consisting of 20 mM glucose and $2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ hexokinase. Respiration was initiated by adding a mixture of respiratory substrates comprising 5 mM pyruvate, 2.5 mM malate, and 5 mM succinate. After initial oxygen consumption was monitored, the active state of respiration was initiated by the addition of different amounts of ADP (5, 10, 20, 100, and 500 μM) describing different steady-state rates of phosphorylation. Alongside, the basal non-phosphorylating respiration rate was

obtained by the addition of $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ oligomycin, an inhibitor of ATP synthase. Then, aliquots of mitochondrial suspension were withdrawn every minute and quenched in a perchloric acid solution (10% HClO_4 , 25 mM EDTA). The denatured proteins were centrifuged at $21,000 \times g$ for 5 min at $4\ ^\circ\text{C}$ and the resulting supernatant was neutralized with a KOH solution (2 M KOH, 0.3 M Mops) and centrifuged at $21,000 \times g$ for 5 min ($4\ ^\circ\text{C}$). The ATP production was determined from the glucose-6-phosphate content of samples, as described previously (Teulier et al., 2010). Briefly, the supernatant was incubated in reaction buffer (50 mM triethanolamine-HCl, 7.5 mM MgCl_2 , and 3.75 mM EDTA, pH 7.4, at room temperature) supplemented with 0.5 mM NAD and assayed spectrophotometrically by monitoring the production of NADH in the presence of 0.5 U glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* at 340 nm. The rate of ATP production was calculated from the slope of the linear accumulation of glucose-6-phosphate over the sampling time interval (1 min). It is important to note that the ATP synthesis was also determined in the basal non-phosphorylating respiration rates in the presence of $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ oligomycin to ensure that the measured rates were specific to the mitochondrial ATP synthase activity. These values were taken into account to calculate the rate of mitochondrial ATP synthesis. The mitochondrial coupling efficiency of oxidative phosphorylation, i.e., the ATP/O ratio was determined by dividing the ATP synthesis rate by the oxygen consumption rate during state 3 respiration. The respiratory control ratio (RCR) was determined by dividing the maximum phosphorylating respiration measured in the presence of 500 μM ADP by the basal non-phosphorylating respiration measured in the presence of $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ oligomycin.

Mitochondrial reactive oxygen species generation

The rate of H_2O_2 released by skeletal muscle and heart mitochondria was measured in respiratory buffer supplemented with 5 U/mL horseradish peroxidase and 1 μM Amplex® Red fluorescent dye at $40\ ^\circ\text{C}$ using a fluorometer at excitation and emission wavelengths of 560 nm and 584 nm, respectively. The rates of H_2O_2 generation were recorded in the presence of substrates alone (5 mM pyruvate/2.5 mM malate/5 mM succinate - basal state) and after the addition of 500 μM ADP (active state). The fluorescent signal was finally calibrated using a standard curve obtained after successive addition of H_2O_2 .

Enzyme activities

Sub-samples (20–40 mg) of frozen skeletal muscle and heart were thawed and homogenized in ice-cold 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. Homogenization was carried out using a 2010 Geno/Grinder® tissue homogenizer (3x 30 s, 20 s rest). Homogenized samples were diluted 1/11 in 100 mM phosphate buffer containing 0.02% BSA and then centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatant containing citrate synthase (CS) and lactate dehydrogenase (LDH) was collected, and enzyme activities were assayed spectrophotometrically at 40 °C. LDH activity was measured at 340 nm in a medium containing 20 mM imidazole, 0.02% BSA, and 280 μ M NADH (pH 7.4), and the reaction was initiated with 5 mM pyruvate. CS activity was measured at 412 nm in medium containing 100 mM TRIS buffer, 300 μ M acetyl-CoA, and 100 μ M DTNB (pH 8), and the reaction was initiated by the addition of oxaloacetate (400 μ M). The mitochondrial content of muscle tissues (milligrams of mitochondrial protein per milligram of tissue) was estimated by the ratio of CS activity measured in muscle tissue to that measured in isolated mitochondria. The LDH/CS ratio was calculated as an index of glycolytic capacity.

Statistical analyses

The phylogenetic tree of the bird species included in the study, as well as the method of acquisition, are presented in the *Supplementary Material*. All analyses were performed in R version 4.2.1 (R Core Team 2022). We fitted our models using Bayesian phylogenetic mixed models from the MCMCglmm package (Hadfield, 2010). MCMCglmm uses a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) estimation approach and accounts for non-independence among closely related species by including the phylogenetic relationships among species as a random variable. We determined the number of iterations, thinning, and burn-in period for each model run across the Hackett sequenced species phylogenetic tree (Hackett et al., 2008). Standard MCMCglmm diagnostic checks were performed for all models. We used a weakly informative prior with a set of parameters: $\nu = 0.002$ and $V = 1$. Variations in these parameters did not affect the results. We included the random effect of species, individuals, season, and bird status (domesticated or wild) and calculated the deviance information criteria (DIC) for each model. The model with only “species” as a random effect had a much lower DIC value, and the inclusion of the other random effects was, therefore, not statistically justifiable. All the data were log₁₀ transformed to represent allometric relationships between body mass and mitochondrial parameters. The data

were also translated into standard normal distribution to compare skeletal muscle and heart slopes. The coefficient of correlation r^2 was calculated by as described previously (Nakagawa et al., 2017). We estimated the phylogenetic signal for each model and individual mitochondrial bioenergetics (*Supplementary Material*) as an application condition for phylogenetic regressions. Posterior mean estimates (slopes; b) are presented with their 95% lower and upper credible intervals (CIs). p_{mcmc} with a very low values indicates strong significance of the coefficient away from zero, and $p_{mcmc} < 0.05$ was considered significant in this study.

Results

Bioenergetic measurements were conducted on a total of 83 birds representing 13 species of 8 families and 7 orders (Struthioniformes, Sphenisciformes, Anseriformes, Galliformes, Columbiformes, Psittaciformes, and Passeriformes). The body mass of the smallest species (finch) differed by a factor of 10^4 from the largest species (ostrich).

Table 1 | Effect of body mass on mitochondrial parameters.

	Skeletal muscle		Heart muscle	
	Post.mean [Lower; Upper 95% CIs]	P_{mcmc}	Post.mean [Lower; Upper 95% CIs]	P_{mcmc}
Oxygen consumption rate (nmol O. min⁻¹. mg⁻¹ protein)				
Active state	-0.573 [-1.02; -0.09]	0.02	-0.269 [-1.00; 0.45]	0.40
Basal state	-0.652 [-1.13; -0.18]	0.01	-0.163 [-1.01; 0.73]	0.69
ATP synthesis rate (nmol ATP. min⁻¹. mg⁻¹ protein)				
Active state	-0.459 [-0.97; 0.01]	0.06	-0.233 [-1.06; 0.56]	0.53
H₂O₂ generation rate (pmol H₂O₂. min⁻¹. mg⁻¹ protein)				
Active State	-0.020 [-1.20; 1.37]	0.84	-0.409 [-2.16; 1.22]	0.65
Basal state	-0.459 [-0.97; 0.01]	0.10	-0.662 [-1.50; 0.08]	0.06
Ratios				
ATP/O _{eff400}	0.545 [0.21; 0.89]	< 0.01	0.372 [-0.47; 1.17]	0.34
ATP/O _{eff200}	0.619 [0.21; 1.02]	< 0.01	0.383 [-0.51; 1.20]	0.37
ATP/O _{eff100}	0.648 [0.26; 1.11]	< 0.01	0.355 [-0.58; 1.34]	0.42
ATP/O _{eff50}	0.649 [0.21; 1.11]	< 0.01	0.309 [-0.50; 1.18]	0.47
ATP/O _{eff10}	0.649 [0.18; 1.09]	0.01	0.218 [-0.50; 1.28]	0.48
RCR	-0.003 [-0.04; 0.06]	0.89	-0.022 [-0.10; 0.06]	0.54

The mitochondrial ATP synthesis, oxygen consumption, and the H₂O₂ production rates were measured in skeletal muscle (n=68) and heart (n=47) mitochondria fuelled with pyruvate/malate/succinate (basal state) or with ADP (active state). The mitochondrial coupling efficiency (ATP/O_{eff}) was measured at a given rate of ATP synthesis (400, 200, 100, 50, or 10 nmol ATP.min⁻¹.mg⁻¹ protein). The RCR values, calculated as the ratio between the maximal phosphorylating respiration and the basal non-phosphorylating respiration. The posterior mean represents the estimated slope (b) under the standard normal distribution of the allometric equation with lower and upper 95% credible intervals.

Mitochondrial oxygen consumption, ATP synthesis, and ROS production

Hypoallometric scaling (slope < 1, negative allometry) between bird body mass and oxygen consumption, ATP synthesis, and H₂O₂ production rates (see Table 1; Figs. 1 and 2) was detected in both tissues. In skeletal muscle mitochondria, the rates of oxygen consumption (at both basal non-phosphorylating and phosphorylating (active) states) and the rate of ATP synthesis were negatively related to body mass, whereas the rates of mitochondrial H₂O₂ generation were not (Table 1; Fig. 1). In heart mitochondria, the allometric relationships were not significant, except for the generation of H₂O₂ in the basal and active states (Table 1; Fig. 2). Some species were not sampled for ROS production measurements in both tissues, particularly small species (finches) in regard to the cardiac muscle. This requires careful interpretation of the relationship between bird body mass and ROS production in both muscle tissues. The RCR values, calculated as the ratio between the maximal phosphorylating respiration and the basal non-phosphorylating respiration, were independent of bird body mass in both tissues (Table 1). On the whole, the mean RCR value calculated for mitochondria isolated from skeletal muscles was 4.49 ± 0.26 SEM and 4.70 ± 0.39 SEM for those from the heart.

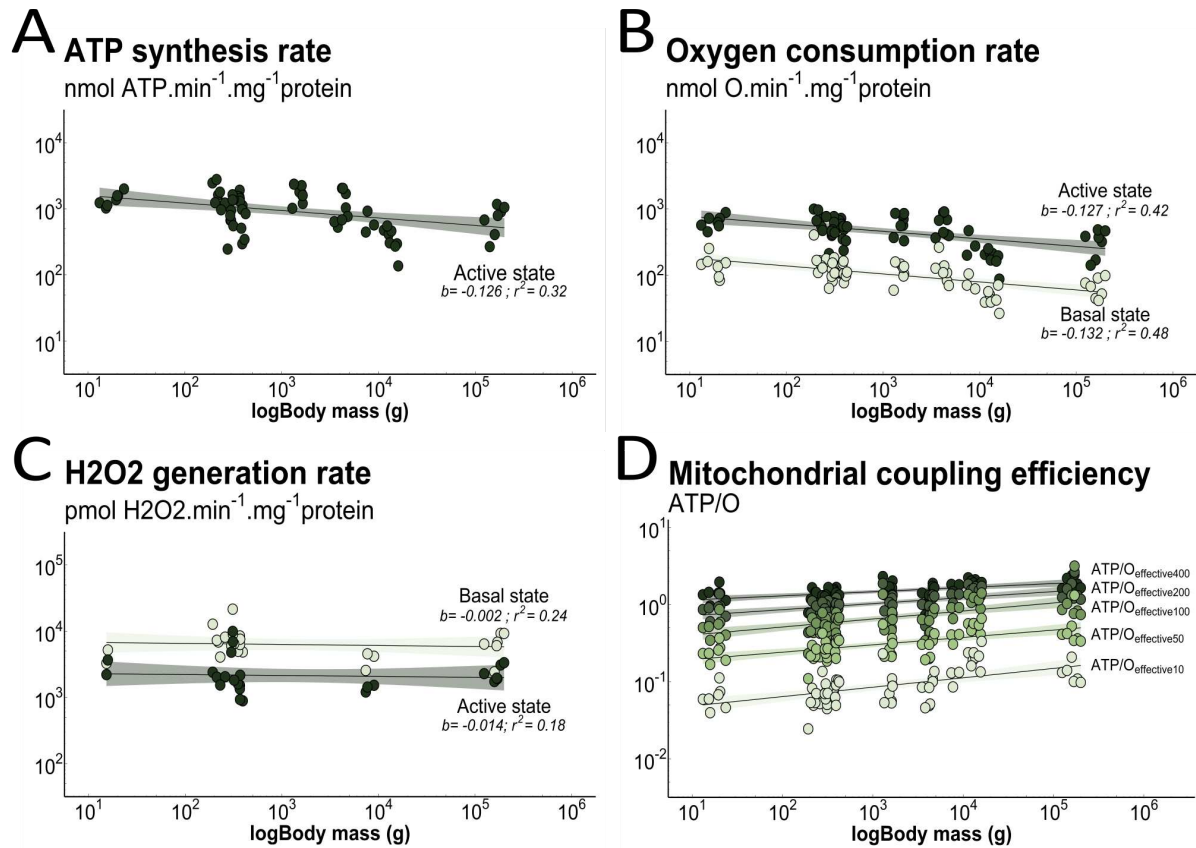


Fig. 1 | Relationships between body mass and mitochondrial fluxes and efficiency in the skeletal muscle. (A) Allometric relationships for ATP synthesis in mitochondria respiring on pyruvate/malate/succinate in the presence of 500 μ M ADP (active state). (B) Allometric relationships for oxygen consumption in mitochondria respiring on pyruvate/malate/succinate in the presence of oligomycin (basal non-phosphorylating state) or after the addition of 500 μ M ADP (active state). (C) Allometric relationships for H_2O_2 production rates in basal (respiratory substrates alone) or active states. (D) Relationships for mitochondrial effective coupling efficiencies (ATP/O_{eff}) calculated at a given rate of ATP synthesis (400, 200, 100, 50, or 10 $nmol\ ATP \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}\ protein$). Data were collected from 68 individuals from 11 bird species, except for the H_2O_2 production rate, for which only 27 individuals from 6 bird species were assayed.

Mitochondrial coupling efficiency

Mitochondrial efficiencies were measured at different steady states of phosphorylation and thus at different metabolic levels (Figs. 1D and 2D). The data show positive allometry (slope > 1) for the mitochondrial coupling efficiency only in skeletal muscle (Table 1) and at all metabolic intensities. For both the unstandardized and the standardized values, we found higher slopes corresponding to low metabolic intensities ($Slope_{eff400} = 0.054$; CIs= 0.015 to 0.091; $Slope_{eff200} = 0.078$; CIs= 0.023 to 0.125; $Slope_{eff100} = 0.093$; CIs= 0.025 to 0.158; $Slope_{eff50} = 0.099$; CIs= 0.035 to 0.179; and $Slope_{eff10} = 0.135$; CIs= 0.029 to 0.229). Of note, the relationships between efficiency (ATP/O) and body mass for the highest intensities exhibited the strongest r^2 ($r^2_{eff400} = 0.57$; $r^2_{eff200} = 0.56$; $r^2_{eff100} = 0.53$; $r^2_{eff50} = 0.50$; $r^2_{eff10} = 0.49$), indicating that the data were well explained by the model and displayed less dispersion than for the lowest metabolic intensities.

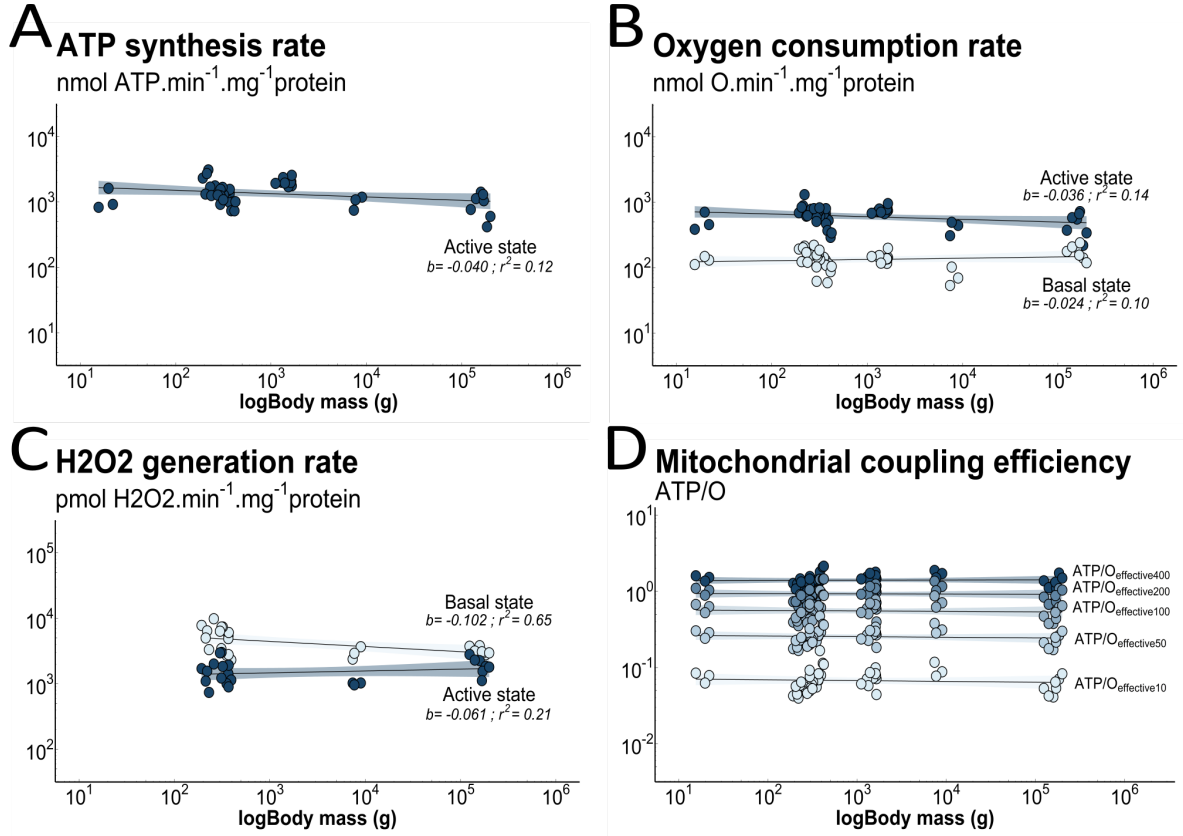


Fig. 2 | Relationships between body mass and mitochondrial fluxes and efficiency in the cardiac muscle. (A) Allometric relationships for ATP synthesis in mitochondria respiring on pyruvate/malate/succinate in the presence of 500 μ M ADP (active state). (B) Allometric relationships for oxygen consumption in mitochondria respiring on pyruvate/malate/succinate in the presence of oligomycin (basal non-phosphorylating state) or after the addition of 500 μ M ADP (active state). (C) Allometric relationships for H_2O_2 production rates in basal (respiratory substrates alone) or active states. (D) Relationships for mitochondrial effective coupling efficiencies (ATP/O_{eff}) calculated at a given rate of ATP synthesis (400, 200, 100, 50, or 10 $nmol\ ATP \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}\ protein$). Data were collected from 47 individuals from 9 bird species, except for the H_2O_2 production rate, for which only 24 individuals from 5 bird species were assayed.

Interestingly, the dynamic transition from the basal to the maximal oxidative phosphorylation state occurred to a different extent in small versus large species. To evaluate this flexibility, we calculated the mitochondrial efficiency channelling factor (mtEC) by fitting the relationships between ATP/O ratios and the rates of ATP synthesis with a mono-exponential function [$ATP/O = P/O_{max} \times (1 - e^{-mtEC \times J_{ATP}})$], where J_{ATP} is the ATP synthesis rate and “mtEC” is the gradient of the non-linear curve (Boël et al., 2019). A strong and significant positive dependence of the mtEC factor on body mass was found in birds (Fig. 3), indicating that larger birds reach their maximum coupling efficiency faster than smaller birds. In heart mitochondria, the coupling efficiency was not dependent on metabolic levels and did not exhibit a significant relationship with body mass (Table 1; Fig. 2D). The mtEC factor values were also not related to body mass in heart mitochondria (Fig. 3).

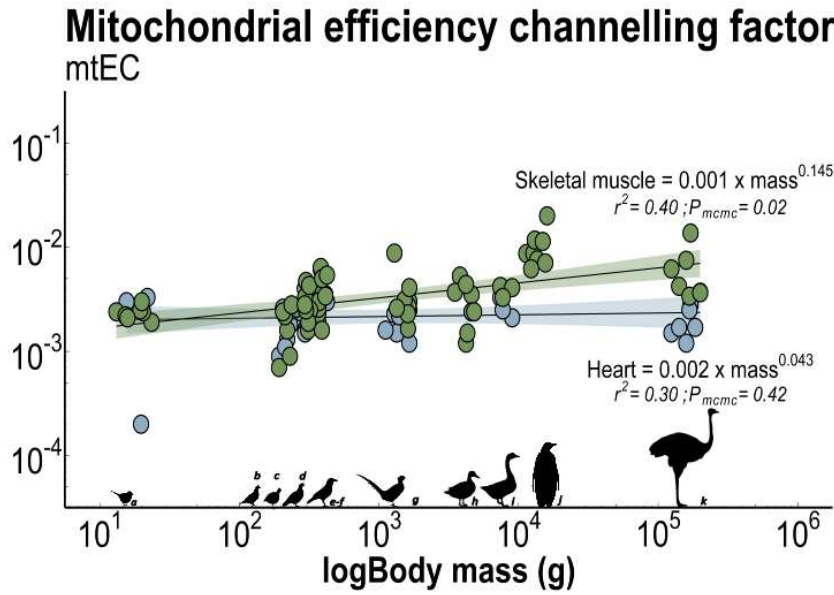


Fig. 3 | Relationship between body mass and mitochondrial efficiency channelling factor (mtEC) in skeletal and cardiac muscles. Allometric equations are represented for the heart (blue circles) and skeletal muscle (green circles). Data were calculated (see Results section for more details) in 67 individuals from 11 bird species for skeletal muscles and in 47 individuals from 9 bird species for the heart. The silhouettes at the bottom illustrated the eleven species, which were (a) *Taeniopygia guttata*, zebra finch; (b) *Coturnix japonica*, quail; (c) *Columba livia*, pigeon; (d) *Perdix*

perdix, partridge; (e) *Corvus frugilegus*, rook; (f) *Corvus corone*, carrion crow; (g) *Phasianus colchicum*, pheasant; (h) *Cairina moschata*, duck; (i) *Anser anser*, goose; (j) *Aptenodytes patagonicus*, king penguin; and (k) *Struthio camelus*, ostrich.

Enzyme activities and mitochondrial content

On the whole, CS activities were negatively correlated with bird body mass in both muscle tissues, with a strong and significant relationship in the heart (post. mean = -0.101; CIs= -0.159 to -0.035; $r^2 = 0.56$; $p_{mcmc} = 0.01$), and a loose relationship in skeletal muscle (post. mean = -0.204; CIs= -0.433 to 0.062; $r^2 = 0.24$; $p_{mcmc} = 0.12$). Similarly, mitochondrial CS activity appeared to scale negatively with body mass, showing a strong significant relationship in skeletal muscle (post. mean = -0.078; CIs= -0.137 to -0.017; $r^2 = 0.65$; $p_{mcmc} = 0.02$) that was not found in the heart (post. mean = -0.035; CIs= -0.106 to 0.034; $r^2 = 0.15$; $p_{mcmc} = 0.28$). LDH activities were positively related to body mass in both tissues (skeletal muscle: post. mean_{skeletal muscle} = 0.156; CIs= -0.006 to 0.318; $r^2 = 0.32$; $p_{mcmc} = 0.059$ and heart: post. mean_{heart} = 0.068; CIs= -0.09 to 0.22; $r^2 = 0.12$; $p_{mcmc} = 0.39$). The positive relationship between the LDH/CS ratio and body mass was significant in skeletal muscles but not in the heart (Fig. 4A). The mitochondrial content showed a negative correlation with body mass in both skeletal and heart muscles (Fig. 4B).

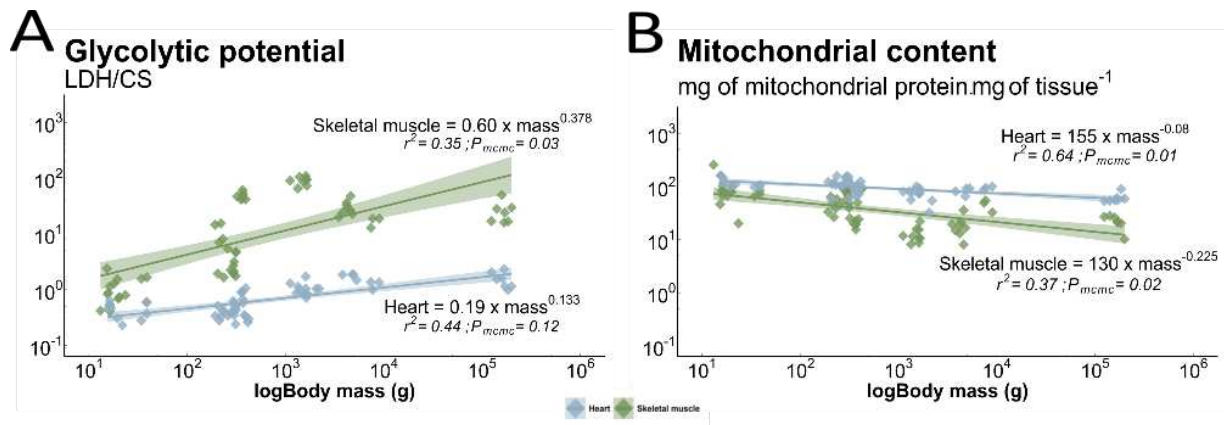


Fig. 4 | Body mass dependence of glycolytic potential and mitochondrial content in the skeletal and cardiac muscles. (A) Allometric relationships for the glycolytic potential, calculated as the ratio between the activities of lactate dehydrogenase and citrate synthase (LDH/CS ratio). (B) Allometric relationships for the mitochondrial content (mg protein.mg⁻¹ tissue). Data are from 73 individuals representing 12 bird species. Allometric equations are represented for the heart (blue diamonds) and skeletal muscle (green diamonds)

Discussion

The aim of this study was to highlight interspecific allometric relationships between bird body mass and various mitochondrial bioenergetics, including efficiency in two of the body's most metabolically active tissues, namely the skeletal and cardiac muscles. The data show for the first time a tissue-dependence of the body mass effect on mitochondrial ATP production and ATP/O, as significant allometric patterns were detected only in skeletal muscles. However, we also found a negative relationship between mitochondrial protein content and body mass in both skeletal muscles and the heart, meaning that smaller birds exhibit higher amount of mitochondria in their muscles than larger ones. This implies that the effect of body mass on mitochondrial fluxes (oxygen consumption and ATP synthesis) will be exacerbated at the level of the tissue, resulting in a stronger negative allometric relationship in the skeletal muscle and to a lesser extent, in the heart. In terms of sub-cellular O₂ consumption, these results are congruent with previous studies that separately examined allometric relationships from different tissues of different species (Hochachka et al., 1988; Brand et al., 2003; Turner et al., 2005; Turner et al., 2006), thus providing evidence that the allometric relationships between body mass and sub-cellular bioenergetics are not uniformly present in every tissue and/or do not present with the same scaling exponent. In addition, it appeared that the allometric pattern is dependent upon metabolic intensities, in skeletal muscles, exhibiting a different degree of energetic flexibility between smaller and larger birds.

We collected pectoralis muscle tissue for each bird species (except for ostrich, for which we collected limb muscles) constituted of mixed glycolytic and oxidative muscle fibers, which resulted in samples with heterogeneously distributed fiber types. The pectoral muscle allows the wing to be folded down, but depending on the species, it is associated with different flight performances. Small birds, who have a high wing flapping frequency, have a pectoral muscle composed mainly of fast oxidative glycolytic (FOG) fibers (Marquez et al., 2005; Welch and Altshuler, 2009), while larger, soaring, or flightless birds have more heterogeneously distributed fiber types, with pectoral muscles also composed of slow oxidative (SO) and fast glycolytic (FG) fibers (Rosser and George, 1986; Rosser et al., 1993; Rosser et al., 1996). In the present study, we reported that body mass is positively related to the ratios of LDH/CS and negatively related to the mitochondrial content of the skeletal muscle, indicating a greater oxidative potential of skeletal muscles in smaller species than in larger birds. This scaling of oxidative/glycolytic enzyme activities or mitochondrial content has also been reported in mammals, indicating that the larger the endotherm the higher the glycolytic potential of its skeletal muscles (Emmett and Hochachka, 1981; Else and Hulbert, 1985). In turn, these data may suggest differences in fiber type composition of skeletal muscles between small and larger species. Even though small (less than 30%) fiber type differences for mitochondrial respiratory activity have been reported for complex I- and/or complex-II respiratory substrates (Duchamp et al., 1991; Jackman and Willis, 1996; Bottje et al., 2002; Gueguen et al., 2005; Mogensen and Sahlin, 2005; Picard et al., 2012), we cannot rule out that differences in fiber composition could explain part of the allometric scaling of mitochondrial activities reported in the present study. This hypothesis is reinforced by the absence of an allometric pattern in the heart muscle. However, other mitochondrial parameters remain to be investigated, such as the surface area as well as the fatty acids and protein composition of the mitochondrial inner membrane, which may also contribute to the observed results (Hulbert et al., 2002b; Brand et al., 2003; Brand et al., 2005; Hulbert et al., 2006).

In both skeletal muscles and heart tissue, mitochondria exhibited a higher coupling efficiency at high oxidative phosphorylation activity than at low mitochondrial activity (Fig. 1D, 2D). This increase in mitochondrial coupling efficiency with the intensity of mitochondrial fluxes is well explained by the intrinsic kinetic of the proton leakage across the inner membrane. Mitochondria consume oxygen to build up a proton motive force, which is then used by the ATP

synthase to synthesize ATP. However, part of this proton motive force, as well as the associated oxygen consumption, is not coupled to ATP synthesis and is instead consumed by non-productive proton leak pathways (Rolfe and Brown, 1997). As a consequence, the activity of proton leakage negatively controls the mitochondrial coupling efficiency (Brand et al., 1993). Since the ATP synthase and proton leak pathways compete for the same driving force, the highest the phosphorylating activity is, the lowest the proton leakage across the inner membrane would be, resulting in the highest coupling efficiency at maximal oxidative phosphorylation activity (Brand et al., 1993; Teulier et al., 2010; Boël et al., 2019). *In situ*, it has been reported that mitochondrial proton leakage contributes to a larger proportion of the oxygen consumed by perfused skeletal muscles in the resting state than in the working state, 50% versus 34%, respectively (Rolfe and Brand, 1996; Rolfe et al., 1999). The stronger decrease in coupling efficiency at low mitochondrial activity reported here in small birds may suggest a higher proton leakage than in larger birds. In turn, this suggests that mitochondrial proton conductance in skeletal muscles would depend negatively on body mass in birds, as previously shown for liver mitochondria (Brand et al., 2003). By comparison, proton leakage would contribute to a maximum of 13% of the oxygen consumed by the heart *in vivo* (Rolfe and Brown, 1997). This very low contribution of proton leak pathways to oxygen consumption in the heart could explain the absence of flexibility of the mitochondrial coupling efficiency in this organ. Nevertheless, further studies are needed to clarify this hypothesis.

The difference in the scaling of mitochondrial parameters between skeletal muscle and heart may also result from differences in the metabolic scope and/or physiological function between the two tissues. An important feature of skeletal muscle is the massive potential to support a wide range of activities, from basal activity to rapidly increasing the rate of energy demand and consumption (Westerblad et al., 2010). Although the heart also undergoes modulations and responds to external stimuli (i.e., circadian rhythms, locomotion), it cannot be in a state of total rest, contrary to skeletal muscle, because of the necessity to generate regular vital contractions. Therefore, the heart, often works at a relatively constant and high intensities to support its function regardless of body mass. Yet, allometric relationships have emerged in various avian studies (Grubb, 1983; Bishop, 1997) concerning morphological (i.e., heart mass) and physiological parameters (i.e., heartbeat frequency, output, and stroke volume). The present study further highlights the effect of bird body mass on the oxidative capacity (CS activity) and

mitochondrial content of the heart, which are higher in small birds than are in larger avian species. Nevertheless, we did not find allometric patterns of mitochondrial fluxes (ATP synthesis, oxygen consumption, and ROS production) and efficiency, suggesting that being a large bird has no more nor less energetic advantages compared to being a small bird for the mitochondria of heart tissues. In endotherms, the skeletal muscle is an important site of thermogenesis (Janský, 1973; Block, 1994; Rowland et al., 2015). In this context, it is interesting to note the similar allometric patterns of mitochondrial coupling efficiency reported in the skeletal muscle of birds (present study) and mammals (Boël et al., 2019), showing that coupling efficiency in small birds and mammals falls at low metabolic intensities. This similarity can be viewed as a bioenergetics lever that would facilitate heat production in small endotherms at rest. Indeed, due to their high surface-to-volume ratio, smaller endotherms have greater heat losses that necessitate compensatory increases in metabolic heat production to maintain the body temperature. This thermal constraint would be exacerbated at rest when activity is low. Therefore, it would be advantageous for smaller endotherms to uncouple further their skeletal muscle mitochondria in order to increase heat generation.

The thirteen bird species included in this study exhibited a wide range of body masses, thrived in different environments, and in some cases had physiological differences that were challenging to account for. In this context, we should discuss some of the study's methodological and conceptual shortcomings. First, to standardize the measurement between all bird species, the isolated mitochondria of both tissues were tested at a temperature of 40 °C. However, in the present study, the body temperature of large birds (ostriches and penguins) is generally lower than 40 °C, while small birds (finches) tend to have body temperatures higher than 40°C (McNab, 1966). Flying birds also appear to have a higher body temperature than flightless birds (ostriches and penguins). By measuring mitochondrial parameters at a common temperature, we may have miss-estimated the optimal mitochondrial functioning in small (underestimation) and large birds (overestimation), which in turn would underestimate the allometric patterns. Such a potential temperature effect cannot affect our conclusions, and instead would reinforce the outcomes of the present study. Another methodological limitation may be the use of body mass as the sole morphological variable. Indeed, the wingspan could constitute another more informative morphological proxy, especially when investigating flight muscle bioenergetics. It would be useful to generate Bayesian models similar to those presented in this study that

consider the wingspan as another morphological variable. Even though the wingspan displays a positive allometry ($b=1/3$) relative to body mass (Nudds, 2007), it exhibits a lower phylogenetic signal (~ 0.64) than the body mass does (see *Supplementary Material*), decreasing the phylogenetic dependence of the morphological variable. Consequently, the wingspan would be an important and interesting parameter in bird allometric studies, which could provide complementary information to the variation of some mitochondrial energetic parameters.

In conclusion, the present work highlights the tissue-dependent effect of bird body mass on mitochondrial bioenergetics. While the mitochondrial coupling efficiency in skeletal muscles correlated positively with bird body mass and depended on the metabolic intensity, the picture for cardiac muscles is simpler as there was no allometric pattern. As discussed above, the difference in the flexibility of the mitochondrial coupling efficiency between skeletal muscles and heart might be linked with the thermogenesis role of the skeletal muscle and the need for small endotherms to maintain heat generation at rest. Although, this thermoregulatory hypothesis is attractive, the reason for why coupling efficiency is more flexible in mitochondria from tissues with greater ranges of metabolic activity, such as skeletal muscles (present study, Boël et al., 2019), and less flexible in tissue with lower ranges of metabolic activity, such as the heart (present study) or liver (Boël et al., 2023), remains unknown. In perspective, it is interesting to note that cultured cells often show no allometry, suggesting that some systemic effect has been lost (Glazier, 2015). Thus, the tissue-dependent effect of bird body mass on mitochondrial bioenergetics suggests that scaling cellular properties with body mass would also be influenced by some systemic effects, which remains to be clarified. Such an hypothesis is in agreement with recent literature arguing that metabolism scaling explanations must extend beyond simple energetic or physical constraints and take into account other parameters like life-history traits (White et al., 2022; Giancarli et al., 2023).

Ethics. All experiments were conducted in accordance with the animal care guidelines of the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. We complied with Article R. 427-6 of the Environmental Code regarding wildlife species.

Data accessibility. Code and data are available from Zenodo: <https://doi.org/10.5281/zenodo.8355492>.

Authors' contributions. Conceptualization: D.R., Y.V.; Formal analysis: J.B.; Investigation: J.B., J.W., D.R., Y.V.; Methodology: J.B., D.R., Y.V.; Validation: J.B., D.R., Y.V.; Visualization: J.B., D.R., Y.V.; Writing – original draft: J.B.; Writing – review & editing: J.B., D.R., Y.V.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding. JB was supported by the French Government (Ph.D. grant: 2020–2023)

Acknowledgements. We thank certified trappers from UNAPAF association for providing pigeons and corvids and local providers and farmers for providing all the other birds in this study. We warmly thank the two reviewers for their constructive remarks and comments on the manuscript.

Footnotes. Electronic supplementary material will be available on the website.

References

- Bishop, C. M.** (1997). Heart mass and the maximum cardiac output of birds and mammals: implications for estimating the maximum aerobic power input of flying animals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **352**, 447–456.
- Block, B. A.** (1994). Thermogenesis in Muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 535–577.
- Boël, M., Romestaing, C., Voituron, Y. and Roussel, D.** (2019). Allometry of mitochondrial efficiency is set by metabolic intensity. *Proc. R. Soc. B* **286**, 20191693.
- Bottje, W., Iqbal, M., Tang, Z. X., Cawthon, D., Okimoto, R., Wing, T. and Cooper, M.** (2002). Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. *Poultry Science* **81**, 546–555.
- Brand, M. D.** (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology* **10**.
- Brand, M. D., Turner, N., Ocloo, A., Else, P. L. and Hulbert, A. J.** (2003). Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochemical Journal* **376**, 741–748.
- Brand, M. D., Pakay, J. L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D. C., Brookes, P. S. and Cornwall, E. J.** (2005). The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochemical Journal* **392**, 353–362.
- Calder, W. A.** (1984). *Size, Function, and Life History*. Courier Corporation.
- Darveau, C.-A., Suarez, R. K., Andrews, R. D. and Hochachka, P. W.** (2002). Allometric cascade as a unifying principle of body mass effects on metabolism. *Nature* **417**, 166–170.

- Demetrius, L.** (2006). The origin of allometric scaling laws in biology. *Journal of Theoretical Biology* **243**, 455–467.
- Duchamp, C., Barre, H., Rouanet, J. L., Lanni, A., Cohen-Adad, F., Berne, G. and Brebion, P.** (1991). Nonshivering thermogenesis in king penguin chicks. I. Role of skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **261**, R1438–R1445.
- Else, P. L. and Hulbert, A. J.** (1985). An allometric comparison of the mitochondria of mammalian and reptilian tissues: The implications for the evolution of endothermy. *Journal of Comparative Physiology B* **156**, 3–11.
- Else, P. L., Brand, M. D., Turner, N. and Hulbert, A. J.** (2004). Respiration rate of hepatocytes varies with body mass in birds. *Journal of Experimental Biology* **207**, 2305–2311.
- Emmett, B. and Hochachka, P. W.** (1981). Scaling of oxidative and glycolytic enzymes in mammals. *Respiration Physiology* **45**, 261–272.
- Field 2nd, J., Belding, H. S. and Martin, A. W.** (1939). An analysis of the relation between basal metabolism and summated tissue respiration in the rat. I. The post-pubertal albino rat. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **14**, 143–157.
- Giancarli, S. M., Dunham, A. E. and O'Connor, M. P.** (2023). Clade-Specific Allometries in Avian Basal Metabolic Rate Demand a Broader Theory of Allometry. *Physiological and Biochemical Zoology* **96**, 216–232.
- Glazier, D. S.** (2015). Is metabolic rate a universal ‘pacemaker’ for biological processes? *Biological Reviews* **90**, 377–407.
- Grubb, B. R.** (1983). Allometric relations of cardiovascular function in birds. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **245**, H567–H572.
- Gueguen, N., Lefaucheur, L., Fillaut, M. and Herpin, P.** (2005). Muscle fiber contractile type influences the regulation of mitochondrial function. *Mol Cell Biochem* **276**, 15–20.
- Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K.-L., Harshman, J., et al.** (2008). A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science* **320**, 1763–1768.
- Hadfield, J. D.** (2010). MCMC Methods for Multi-Response Generalized Linear Mixed Models: The **MCMCglmm** R Package. *Journal of Statistical Software*. **33**
- Hatton, I. A., Dobson, A. P., Storch, D., Galbraith, E. D. and Loreau, M.** (2019). Linking scaling laws across eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**, 21616–21622.
- Hochachka, P. W., Emmett, B. and Suarez, R. K.** (1988). Limits and constraints in the scaling of oxidative and glycolytic enzymes in homeotherms. *Canadian Journal of Zoology* **66**, 1128–1138.

- Hulbert, A. J., Faulks, S., Buttemer, W. A. and Else, P. L.** (2002). Acyl composition of muscle membranes varies with body size in birds. *Journal of Experimental Biology* **205**, 3561–3569.
- Hulbert, A. J., Turner, N., Hinde, J., Else, P. and Guderley, H.** (2006). How might you compare mitochondria from different tissues and different species? *Journal of Comparative Physiology B* **176**, 93–105.
- Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R. and Buttemer, W. A.** (2007). Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiological Reviews* **87**, 1175–1213.
- Jackman, M. R. and Willis, W. T.** (1996). Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **270**, C673–C678.
- Janský, L.** (1973). Non-Shivering Thermogenesis and Its Thermoregulatory Significance. *Biological Reviews* **48**, 85–132.
- Koch, R. E., Buchanan, K. L., Casagrande, S., Crino, O., Dowling, D. K., Hill, G. E., Hood, W. R., McKenzie, M., Mariette, M. M., Noble, D. W. A., et al.** (2021). Integrating Mitochondrial Aerobic Metabolism into Ecology and Evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **36**, 321–332.
- Kohn, T. A., Anley, M. J., Magwaza, S. N., Adamson, L., Hoffman, L. C. and Brand, T. S.** (2023). Muscle fiber type and metabolic profiles of four muscles from the African black ostrich. *Meat Science* **200**, 109156.
- Konarzewski, M. and Diamond, J.** (1995). Evolution of Basal Metabolic Rate and Organ Masses in Laboratory Mice. *Evolution* **49**, 1239–1248.
- Marquez, J., Sweazea, K. L. and Braun, E. J.** (2005). Skeletal muscle fiber composition of the English sparrow (*Passer domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **143**, 126–131.
- McNab, B. K.** (1966). An Analysis of the Body Temperatures of Birds. *The Condor* **68**, 47–55.
- Mogensen, M. and Sahlin, K.** (2005). Mitochondrial efficiency in rat skeletal muscle: influence of respiration rate, substrate and muscle type. *Acta Physiologica Scandinavica* **185**, 229–236.
- Nakagawa, S., Johnson, P. C. D. and Schielzeth, H.** (2017). The coefficient of determination R^2 and intra-class correlation coefficient from generalized linear mixed-effects models revisited and expanded. *Journal of The Royal Society Interfacelibrary* **14**: 20170213.
- Nudds, R. L.** (2007). Wing-bone length allometry in birds. *Journal of Avian Biology* **38**, 515–519.
- Peters, R. H.** (1983). *The Ecological Implications of Body Size*. Cambridge University Press.
- Picard, M., Hepple, R. T. and Burelle, Y.** (2012). Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **302**, C629–C641.

- Porter, R. K. and Brand, M. D.** (1993). Body mass dependence of H⁺ leak in mitochondria and its relevance to metabolic rate. *Nature* **362**, 628–630.
- Porter, R. K. and Brand, M. D.** (1995). Causes of differences in respiration rate of hepatocytes from mammals of different body mass. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **269**, R1213–R1224.
- Porter, R. K., Hulbert, A. J. and Brand, M. D.** (1996). Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **271**, R1550–R1560.
- Raichlen, D. A., Gordon, A. D., Muchlinski, M. N. and Snodgrass, J. J.** (2010). Causes and significance of variation in mammalian basal metabolism. *Journal of Comparative Physiology B* **180**, 301–311.
- Rolfe, D. F. and Brown, G. C.** (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews* **77**, 731–758.
- Rosser, B. W. C. and George, J. C.** (1986). The avian pectoralis: histochemical characterization and distribution of muscle fiber types. *Canadian Journal of Zoology* **64**, 1174–1185.
- Rosser, B. W. C., Waldbillig, D. M., Wick, M. and Bandman, E.** (1993). Muscle Fiber Types in the Pectoralis of the White Pelican, a Soaring Bird. *Acta Zoologica* **75**, 329–336.
- Rosser, B. W. C., Waldbillig, D. M., Wick, M. and Bandman, E.** (1996). Heterogeneity of myosin heavy-chain expression in fast-twitch fiber types of mature avian pectoralis muscle. *Biochemistry and Cell Biology* **74**, 715–728.
- Roussel, D., Salin, K., Dumet, A., Romestaing, C., Rey, B. and Voituron, Y.** (2015). Oxidative phosphorylation efficiency, proton conductance and reactive oxygen species production of liver mitochondria correlates with body mass in frogs. *Journal of Experimental Biology* **218**, 3222–3228.
- Rowland, L. A., Bal, N. C. and Periasamy, M.** (2015). The role of skeletal-muscle-based thermogenic mechanisms in vertebrate endothermy. *Biological Reviews* **90**, 1279–1297.
- Salin, K., Auer, S. K., Rey, B., Selman, C. and Metcalfe, N. B.** (2015). Variation in the link between oxygen consumption and ATP production, and its relevance for animal performance. *Proc. R. Soc. B.* **282**, 20151028.
- Teulier, L., Rouanet, J.-L., Letexier, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rey, B., Duchamp, C. and Roussel, D.** (2010). Cold-acclimation-induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency. *Journal of Experimental Biology* **213**, 2476–2482.
- Turner, N., Haga, K. L., Hulbert, A. J. and Else, P. L.** (2005). Relationship between body size, Na⁺/K⁺/ATPase activity, and membrane lipid composition in mammal and bird kidney. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **288**, R301–R310.

- Turner, N., Haga, K. L., Else, P. L. and Hulbert, A. J.** (2006). Scaling of Na^+ , K^+ -ATPase Molecular Activity and Membrane Fatty Acid Composition in Mammalian and Avian Hearts. *Physiological and Biochemical Zoology* **79**, 522–533.
- Velotto, S. and Crasto, A.** (2004). Histochemical and Morphometrical Characterization and Distribution of Fibre Types in Four Muscles of Ostrich (*Struthio camelus*). *Anatomia, Histologia, Embryologia* **33**, 251–256.
- Voituron, Y., Boël, M. and Roussel, D.** (2020). Mitochondrial threshold for H_2O_2 release in skeletal muscle of mammals. *Mitochondrion* **54**, 85–91.
- Welch, K. C. and Altshuler, D. L.** (2009). Fiber type homogeneity of the flight musculature in small birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **152**, 324–331.
- West, G. B. and Brown, J. H.** (2004). Life's Universal Scaling Laws. *Physics Today* **57**, 36–42.
- West, G. B. and Brown, J. H.** (2005). The origin of allometric scaling laws in biology from genomes to ecosystems: towards a quantitative unifying theory of biological structure and organization. *Journal of Experimental Biology* **208**, 1575–1592.
- Westerblad, H., Bruton, J. D. and Katz, A.** (2010). Skeletal muscle: Energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Experimental Cell Research* **316**, 3093–3099.
- White, C. R., Marshall, D. J., Alton, L. A., Arnold, P. A., Beaman, J. E., Bywater, C. L., Condon, C., Crispin, T. S., Janetzki, A., Pirtle, E., et al.** (2019). The origin and maintenance of metabolic allometry in animals. *Nature Ecology & Evolution* **3**, 598–603.
- White, C. R., Alton, L. A., Bywater, C. L., Lombardi, E. J. and Marshall, D. J.** (2022). Metabolic scaling is the product of life-history optimization. *Science* **377**, 834–839.

Supporting Online Material for

The allometry of mitochondrial efficiency is tissue-dependent: A comparison between skeletal and cardiac muscles of birds

Jessica Barbe^{1*}, Julia Watson¹, Damien Roussel¹ and Yann Voituron¹

¹ Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69622, Villeurbanne, France

*Author for correspondence (jessica.barbe@univ-lyon1.fr)

This PDF file includes:

Methods and supplementary results

Figs. S1 to S2

References

Methods and supplementary results

Phylogenetic tree

The phylogenetic tree (S1) combining the 13 species studied was obtained from the BirdTree.org website (Rubolini et al., 2015). The tree source used was Hackett Sequenced Species: a set of 10 000 trees with 6670 OTUs each (Hackett et al., 2008). We performed 1000 simulations to create the most parsimonious tree. The avian tree was summarized using BEAST platform (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees- v1.10.4, 2002-2018) to create a target tree usable in nexus format in R version 4.2.1 (R Core Team 2022). The parameters used were: burnin as a number of trees (100), maximum clade credibility tree as target tree type, and common ancestor heights.

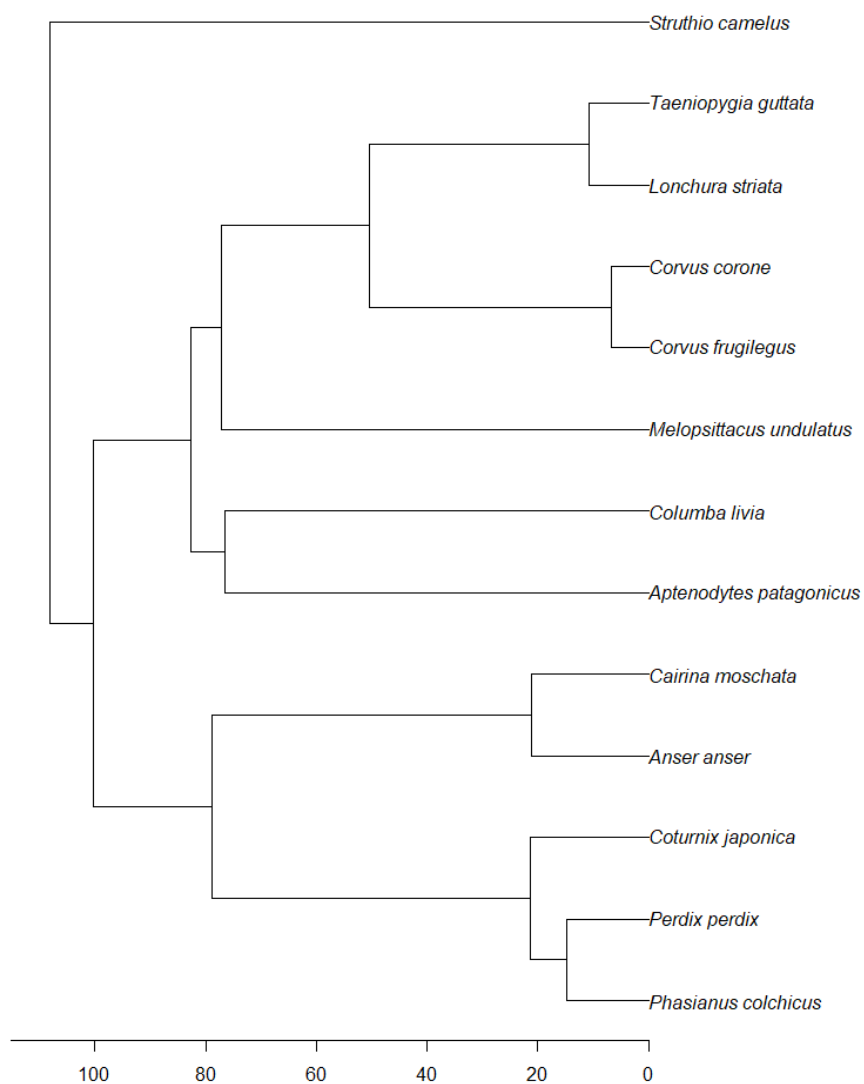


Figure S1. Avian phylogeny of studied birds, with species names.

Phylogenetic signal of mitochondrial allometric models

The phylogenetic signal can be defined as the tendency for related species to resemble each other more than those drawn randomly from a phylogenetic tree (Blomberg et al., 2003). Moreover, the phylogenetic signal can be considered a measure of phylogenetic heritability (h^2) with a value that lies between 0 and 1. We obtained an estimate of the heritability by applying the basic formula from (de Villemereuil, 2019):

$$h^2 = \frac{V_{\text{Additive variance}}}{V_{\text{Additive variance}} + V_{\text{Random effect variance}} + V_{\text{Residual variance}}}$$

A value close to zero indicates phylogenetic independence and a value close to 1 indicates species' traits are distributed as expected under the Brownian motion model. Although h^2 was estimated using high likelihood (95% CI lies between lower and upper credible interval) we did not test whether h^2 was significantly different from zero (i.e., there was no phylogenetic signal) but were able to estimate the strength of the correlation between certain mitochondrial traits and bird body mass and how the phylogeny affected the error structure of the data. Body mass exhibited a strong phylogenetic signal ($h^2 = 0.997$; CI = 0.995 to 0.999). In the allometric models, the phylogenetic signal of the different mitochondrial parameters relative to body mass or wingspan was generally > 0 , indicating a non-negligible phylogenetic signal. The allometric relationships exhibited in this paper must be considered in conjunction with the phylogenetic signal specific to mitochondrial parameters. Heritability values estimated for each parameter are generally greater than 0.50 and represent a relatively strong phylogenetic signal (S2). It could then be that there is auto-collinearity between the different traits and that the significant relationships between the body mass and the mitochondrial parameter are partly due to the phylogenetic factor.

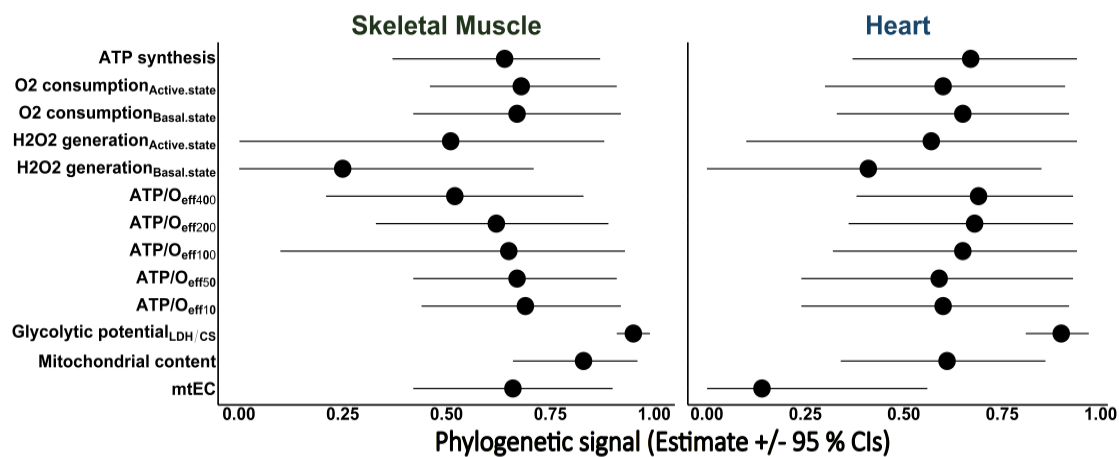


Figure S2. Phylogenetic signal of mitochondrial allometric models for the avian skeletal and heart muscles, considering body mass as the variable.

References

- Blomberg, S. P., Garland, T. and Ives, A. R.** (2003). Testing for Phylogenetic Signal in Comparative Data: Behavioral Traits Are More Labile. *Evolution* **57**, 717–745.
- de Villemereuil, P.** (2019). On the relevance of Bayesian statistics and MCMC for animal models. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **136**, 339–340.
- Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K.-L., Harshman, J., et al.** (2008). A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science* **320**, 1763–1768.
- Rubolini, D., Liker, A., Garamszegi, L. Z., Møller, A. P. and Saino, N.** (2015). Using the BirdTree.org website to obtain robust phylogenies for avian comparative studies: A primer. *Current Zoology* **61**, 959–965.

Article n° 2 | Masse corporelle et respiration mitochondriale des érythrocytes aviaires

J.Barbe, B.Rey , Y.Voituron et D.Roussel

En cours d'écriture - Présentation des résultats préliminaires

CONTEXTE & OBJECTIFS

Les globules rouges (érythrocytes) sont, de loin, le type de cellule le plus abondant dans le sang (Bryk and Wiśniewski, 2017). Au contraire des mammifères et de certaines espèces de reptiles, les érythrocytes matures de presque toutes les espèces de poissons, d'amphibiens, de reptiles et d'oiseaux conservent leur noyau pendant la maturation et possèdent donc des mitochondries fonctionnelles (Bratosin et al., 2004; Harris and Brown, 1971; Ogo et al., 1993; Picard et al., 2012; Stier et al., 2013; Stier et al., 2017).

Pour étudier le métabolisme aérobie et le fonctionnement mitochondrial, notamment chez les oiseaux, le prélèvement sanguin peut être utilisé. Il est considéré comme une méthode relativement peu invasive sur le développement des oiseaux sauvages (Sheldon et al., 2008) même si des améliorations doivent être entreprises pour affiner l'échantillonnage sur le terrain (Voss et al., 2010). C'est une alternative intéressante permettant de contourner les problèmes d'échantillonnage des autres tissus, qui demandent souvent de sacrifier les petits animaux pour obtenir un échantillon de taille suffisante (Suarez et al., 1991; Hulbert et al., 2002b; Brand et al., 2003; Else et al., 2004) ou d'imposer des procédures chirurgicales lourdes chez les animaux de plus grandes tailles (Talbot et al., 2004; Rey et al., 2008; Teulier et al., 2012; Monternier et al., 2014).

La recherche d'une similarité dans le fonctionnement mitochondriale des cellules sanguines avec d'autres tissus a été particulièrement bien alimentée par les études biomédicales (Zhang et al., 2011; Delhay et al., 2016). Elles concernent cependant, majoritairement les cellules immunitaires du sang (monocytes, plaquettes). En effet, plusieurs études sur les primates non-humains, ont révélé des associations positives, modérées entre les mesures du métabolisme aérobie mitochondrial des cellules mononucléaires du sang (et des plaquettes) avec celles de tissus musculaires (Tyrrell et al., 2016) ou de cerveau (Tyrrell et al., 2017). Cependant, d'autres

études humaines montraient que le fonctionnement bioénergétique dans ces cellules sanguines ne pouvait pas résumer ou refléter la fonction mitochondriale musculaire (Hedges et al., 2019; Rose et al., 2019). Depuis peu, l'investigation mitochondriale sur d'autres cellules sanguines comme les érythrocytes commence à se répandre dans les études écologiques sur animaux sauvages ou non-conventionnels. Récemment une étude sur le manchot royal (Stier et al., 2017) a montré des corrélations positives, plus ou moins significatives, entre la fonction mitochondriale des érythrocytes et du muscle pectoral issu de biopsie sur les mêmes individus. Ainsi, le fait que les érythrocytes des oiseaux possèdent des mitochondries fonctionnelles nous force à repenser nos méthodologies de prélèvement tissulaire et à déterminer si le fonctionnement mitochondrial des érythrocytes jouerait un rôle de miroir à celui des mitochondries provenant de tissus musculaires (par exemple pour les muscles squelettique et cardiaque dans l'étude précédente).

La masse corporelle est un élément déterminant chez les animaux, influençant de nombreux paramètres physiologiques. De ce fait, et considérant la relation phylogénétique qui lie les espèces entre elles, il peut être intéressant de déterminer dans un contexte allométrique, le fonctionnement mitochondrial érythrocytaires aviaires à travers plusieurs espèces d'oiseaux de masses corporelles différentes. En adoptant une approche comparative pour rechercher des signatures évolutives mitochondriales, cette étude avait pour but : 1) de comparer chez plusieurs espèces d'oiseaux (en captivité au Parc des oiseaux), les mesures d'activités mitochondriales érythrocytaires c'est-à-dire leurs capacités oxydatives 2) de déterminer si, comme dans le muscle squelettique (**Article 1**), il existe une variation du fonctionnement mitochondrial érythrocytaire avec une variation de la masse corporelle des oiseaux du parc et dans quelle direction celle-ci évolue.

MATÉRIEL & MÉTHODES

Les mesures de respiration sur les érythrocytes ont été menées sur **18 espèces d'oiseaux** (**Figure 1**) provenant du parc des oiseaux de Villars les Dombes, de masse corporelle allant de 482 g (Martin chasseur géant) à 10 kg (Vautour fauve). Pour le protocole complet de prélèvement, de préparation des échantillons ainsi que des mesures de la respiration mitochondriale sur Oroboros, se reporter à la section « Matériels et Méthodes, I.2 ; II.2 ; III.1.b). Les relations entre

la consommation d'oxygène des érythrocytes et la masse corporelle ont été transformées en relations linéaires log-log puis analysées suivant les analyses comparatives phylogénétiques présentées dans la section « Matériels et Méthodes, V).

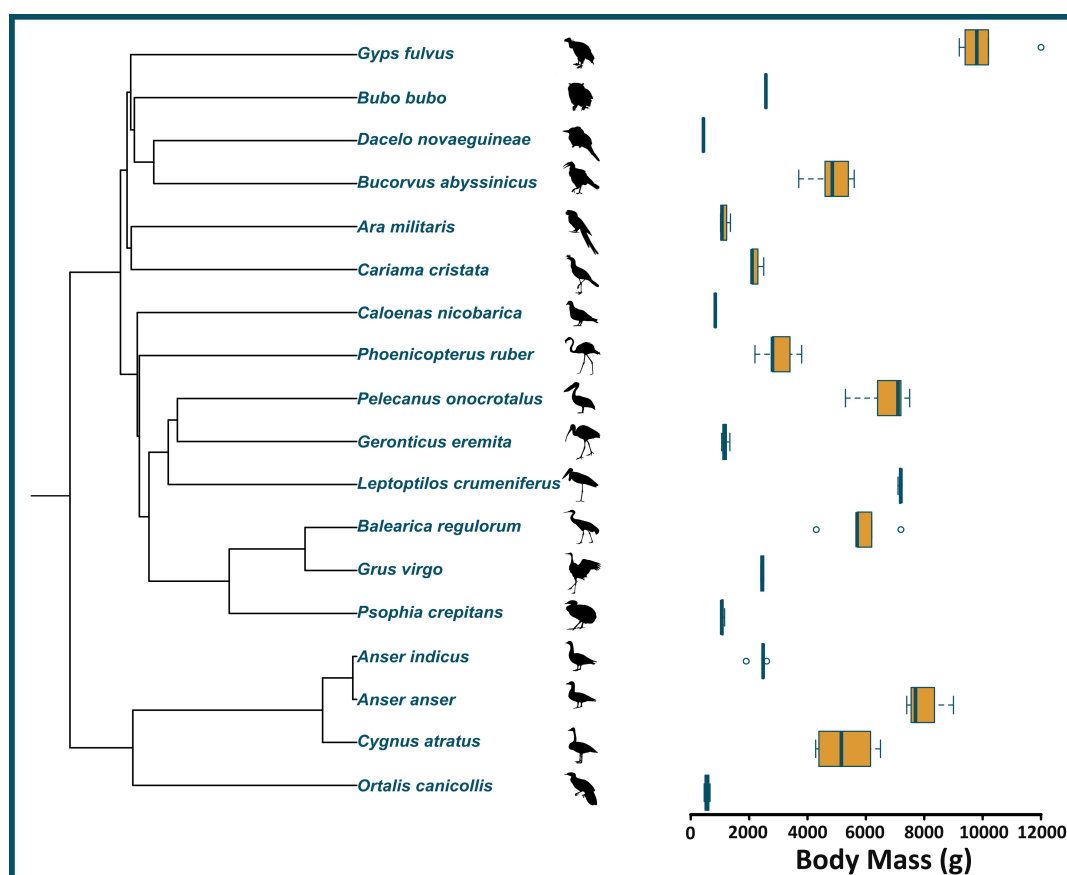


Figure 1 | Arbre phylogénétique des 18 espèces d'oiseaux étudiées provenant du parc des oiseaux de Villars les Dombes (01, France) et répartition de leur masse corporelle selon la phylogénie.

Les dossiers « d'identités » des oiseaux fournis par le Parc des oiseaux, nous donnaient accès à la masse, l'âge et le sexe de chaque individu. Des informations complémentaires comme l'âge à maturité sexuelle et la longévité maximale (en captivité) de chaque individu ont également été reportées à partir de deux bases de données aviaires : [Avibase](#), et [AnAge](#), (De Magalhães et Costa, 2009 ; Xia et Møller, 2021) permettant de créer de nouvelles variables comme une variable catégorielle Adulte/Juvenile et une variable continue de l'âge relative de l'oiseau (rapport entre l'âge de l'oiseau au moment du prélèvement et sa longévité maximale en captivité).

RÉSULTATS

Au total, 11 modèles linéaires ont été testés correspondant aux états respiratoires induits par les différents effecteurs mitochondriaux ajoutés pour initier ou inhiber la respiration mitochondriale. À noter que la consommation d'oxygène au niveau des cellules sanguines dans cette étude a été exprimée en $\text{pmol O/s.mg protein}$. Globalement, la respiration mitochondriale détectée sur mitochondries isolées est environ 10^3 plus forte que la respiration au niveau cellulaire.

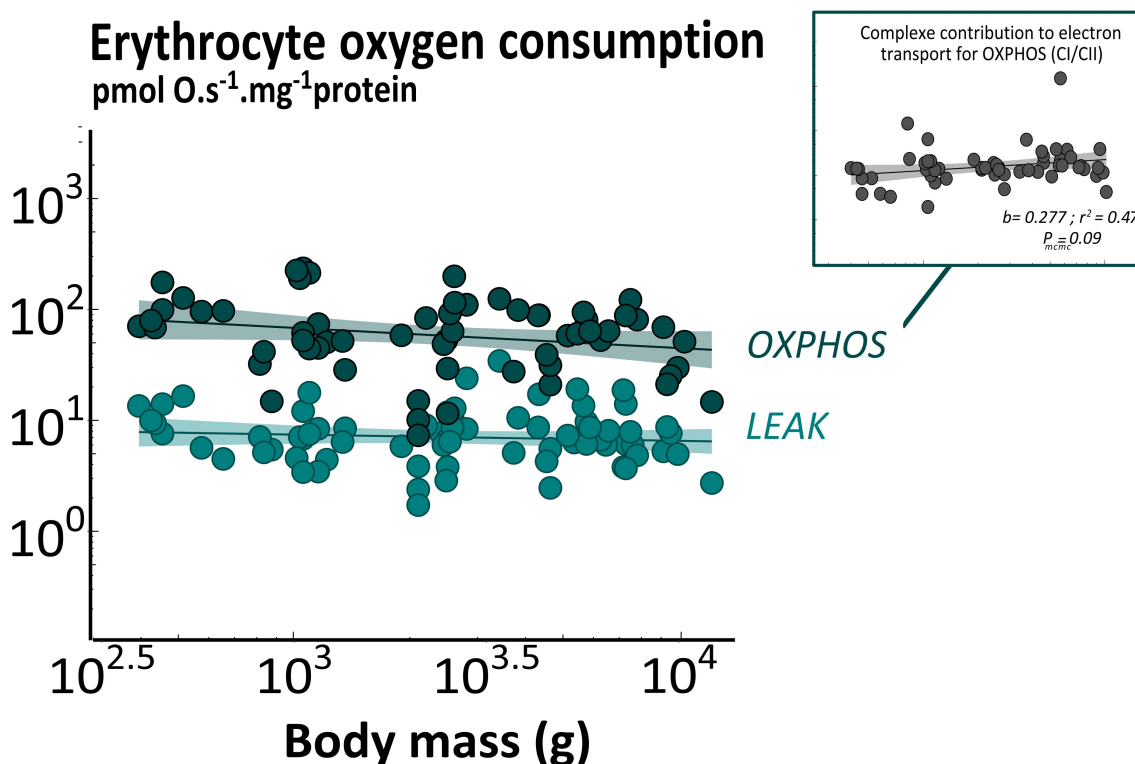


Figure 2 | Relations entre la masse corporelle et la consommation d'oxygène dans les cellules sanguines des oiseaux. La respiration mitochondriale des érythrocytes de 18 espèces d'oiseaux a été mesurée à 40°C (Oroboros®), et a été initiée par l'ajout de 5 mM Pyruvate/2.5 mM Malate (état 2). La phosphorylation oxydative (OXPHOS) a été initiée par l'ajout de 2 mM ADP (état 3 PM) puis 10 mM Succinate (état 3 PM+S) a été ajouté permettant l'entrée des électrons à partir des complexes I et II de la chaîne respiratoire. La respiration non-phosphorylante (LEAK) a été mesurée après par l'ajout de 2 µg/mL oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthétase. La respiration OXPHOS relative au complexe I (CI) a été divisée par la respiration relative au complexe II (CII) pour obtenir le rapport CI/CII correspondant à la contribution des complexes dans le transport des électrons pour la respiration.

La **figure 2** montre les relations allométriques correspondant à la respiration phosphorylante (OXPHOS) après l'ajout de Pyruvate/Malate et Succinate comme substrats énergétiques. La

corrélation est non significative avec une pente relativement faible : $b = -0.051$, $p_{mcmc} = 0.742$ et un coefficient de corrélation faible : $r^2 = 0.07$. Concernant la relation entre la masse corporelle et la respiration non phosphorylante (LEAK), elle est également non significative ($p_{mcmc} = 0.702$) avec un exposant allométrique/pente de $b = -0.049$ et un coefficient de corrélation de $r^2 = 0.61$. Au contraire de la relation allométrique OXPPOS, la relation allométrique LEAK est influencée par un effet sexe (mâle comme référence : $p_{mcmc} = 0.028$) pour lequel on retrouve une consommation d'oxygène pour les individus femelles plus élevée que pour les mâles lors de la respiration non-phosphorylante. En décomposant la part de la respiration associée à l'activité du complexe I et du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale, on observe un effet, toutefois léger, de la masse corporelle sur la contribution du complexe II sur la respiration ($b = -0.260$; $p_{mcmc} = 0.26$; $r^2 = 0.19$). Cette corrélation négative de la respiration associée au complexe II avec la masse corporelle n'est pas retrouvée au niveau du complexe I ($b = 0.03$; $p_{mcmc} = 0.80$; $r^2 = 0.054$). Ceci peut être résumé en déterminant le rapport entre la respiration spécifique au complexe I et au complexe II (**Figure 2**). On observe une corrélation positive entre le rapport CI/CII et la masse corporelle des oiseaux ($b = 0.277$; $p_{mcmc} = 0.09$; $r^2 = 0.47$), probablement conduite par l'effet allométrique sur le complexe II. En d'autres termes, le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale des plus petits oiseaux semble d'avantage supporté par l'activité du complexe II que les grands oiseaux. Aucun effet sexe n'est présent sur ces dernières relations allométriques.

DISCUSSION & CONCLUSION

Le rôle principal des érythrocytes est de transporter l'oxygène jusqu'aux tissus demandeurs et consommateurs de ce même oxygène. Nos résultats préliminaires montrent que les érythrocytes aviaires « navettes de l'oxygène », consomment de manière non négligeable une partie de l'oxygène inspiré par l'animal mais que l'effet de la masse corporelle sur cette consommation n'est pas évident. Une étude longitudinale complétant nos données sur les oiseaux du parc, permettrait de suivre sur plusieurs années, l'évolution des caractéristiques individuelles des mitochondries érythrocytaires au cours du vieillissement, en fonction du sexe, des caractéristiques morphologiques (masse) et de l'effort de reproduction par exemple.

De plus, la présence de relation allométriques chez les oiseaux entre la masse corporelle et des paramètres cardiovasculaires : fréquence cardiaque, volume systolique, débit cardiaque, masse du cœur (Grubb, 1983) ainsi qu'avec le taux métabolique de base (Calder, 1984; Dodds et al., 2001; Peters, 1983; White et al., 2006), laissait suggérer la présence de relations allométriques également à l'échelle cellulaire/mitochondriale. Des 11 modèles testés, aucune des relations entre la masse corporelle et les flux respiratoires érythrocytaires ne s'est avérée particulièrement forte. Seule l'évolution de la respiration relative à l'activité du complexe II et le rapport CI/CII avait une tendance significative, au-dessus du seuil habituel fréquentiste mais tout à fait acceptable pour l'approche Bayésienne. L'évolution négative de la respiration mitochondriale des érythrocytes aviaires, oxydant le succinate, avec la masse corporelle rappelle celle retrouvée au niveau de l'organisme entier (Peters, 1983; Calder, 1984; Dodds et al., 2001; White et al., 2006) et à l'échelle mitochondriale dans le muscle squelettique des oiseaux de l'**Article 1** (cette étude utilisant un mixte de substrat : Pyruvate/Malate/Succinate). Cependant, l'effet de la masse corporelle reste faible et le fonctionnement mitochondrial des érythrocytes ne semble donc pas refléter en totalité le fonctionnement dans le muscle squelettique, tissu largement utilisé pour les études de bioénergétiques chez les oiseaux, entre autres. Néanmoins, tenter de faire un parallèle avec les relations retrouvées dans le muscle squelettique dont les espèces d'oiseaux diffèrent et ne couvrant pas le même intervalle de masse corporelle, peut plausiblement complexifier le message.

En conclusion, la perspective de trouver des patterns allométriques mitochondriaux similaires entre les globules rouges et le muscle squelettique naît d'une volonté de réduire l'utilisation de méthodologies invasives chez les oiseaux, et ce dans le but d'investiguer l'effet de la masse corporelle (mais également d'autres facteurs) sur la bioénergétique mitochondriale. Cependant, l'effet de la masse sur le fonctionnement mitochondrial érythrocytaire chez les 18 espèces d'oiseaux captives du Parc aux oiseaux s'est vu nul ou faible. Il semble également que les patterns allométriques mitochondriaux dépendent des tissus considérés et soient à la fois similaires (cœur- érythrocytes) et distincts (muscle squelettique-érythrocytes).

RÉFÉRENCES

- Brand, M. D., Turner, N., Ocloo, A., Else, P. L. and Hulbert, A. J.** (2003). Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochemical Journal* **376**, 741–748.
- Bratosin, D., Estaquier, J., Slomianny, C., Tissier, J.-P., Quatannens, B., Bulai, T., Mitrofan, L., Marinescu, A., Trandaburu, I., Ameisen, J.-C., et al.** (2004). On the evolution of erythrocyte programmed cell death: apoptosis of *Rana esculenta* nucleated red blood cells involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Biochimie* **86**, 183–192.
- Bryk, A. H. and Wiśniewski, J. R.** (2017). Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome. *Journal of Proteome Research*. **16**, 2752–2761.
- Calder, W. A.** (1984). *Size, Function, and Life History*. Courier Corporation.
- Delhaye, J., Salamin, N., Roulin, A., Criscuolo, F., Bize, P. and Christe, P.** (2016). Interspecific correlation between red blood cell mitochondrial ROS production, cardiolipin content and longevity in birds. *Age (Dordr)* **38**, 433–443.
- Dodds, P. S., Rothman, D. H. and Weitz, J. S.** (2001). Re-examination of the “3/4-law” of Metabolism. *Journal of Theoretical Biology* **209**, 9–27.
- Else, P. L., Brand, M. D., Turner, N. and Hulbert, A. J.** (2004). Respiration rate of hepatocytes varies with body mass in birds. *Journal of Experimental Biology* **207**, 2305–2311.
- Grubb, B. R.** (1983). Allometric relations of cardiovascular function in birds. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **245**, H567–H572.
- Harris, J. R. and Brown, J. N.** (1971). Fractionation of the avian erythrocyte: An ultrastructural study. *Journal of Ultrastructure Research* **36**, 8–23.
- Hedges, C. P., Woodhead, J. S. T., Wang, H. W., Mitchell, C. J., Cameron-Smith, D., Hickey, A. J. R. and Merry, T. L.** (2019). Peripheral blood mononuclear cells do not reflect skeletal muscle mitochondrial function or adaptation to high-intensity interval training in healthy young men. *Journal of Applied Physiology* **126**, 454–461.
- Hulbert, A. J., Faulks, S., Buttemer, W. A. and Else, P. L.** (2002). Acyl composition of muscle membranes varies with body size in birds. *Journal of Experimental Biology* **205**, 3561–3569.
- Monternier, P.-A., Marmillot, V., Rouanet, J.-L. and Roussel, D.** (2014). Mitochondrial phenotypic flexibility enhances energy savings during winter fast in king penguin chicks. *Journal of Experimental Biology* **217**, 2691–2697.
- Ogo, S. H., Bernardes, C. F., Glass, M. L., Torsoni, M. A. and Vercesi, A. E.** (1993). Functional mitochondria in snake *Bothrops alternatus* erythrocytes and modulation of HbO₂ affinity by mitochondrial ATP. *Journal of Comparative Physiology B* **163**, 614–619.

- Peters, R. H.** (1983). *The Ecological Implications of Body Size*. Cambridge University Press.
- Picard, M., Hepple, R. T. and Burelle, Y.** (2012). Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **302**, C629–C641.
- Rey, B., Halsey, L. G., Dolmazon, V., Rouanet, J.-L., Roussel, D., Handrich, Y., Butler, P. J. and Duchamp, C.** (2008). Long-term fasting decreases mitochondrial avian UCP-mediated oxygen consumption in hypometabolic king penguins. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **295**, R92–R100.
- Rose, S., Carvalho, E., Diaz, E. C., Cotter, M., Bennuri, S. C., Azhar, G., Frye, R. E., Adams, S. H. and Børsheim, E.** (2019). A comparative study of mitochondrial respiration in circulating blood cells and skeletal muscle fibers in women. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **317**, E503–E512.
- Sheldon, L. D., Chin, E. H., Gill, S. A., Schmaltz, G., Newman, A. E. M. and Soma, K. K.** (2008). Effects of blood collection on wild birds: an update. *Journal of Avian Biology* **39**, 369–378.
- Stier, A., Bize, P., Schull, Q., Zoll, J., Singh, F., Geny, B., Gros, F., Royer, C., Massemin, S. and Criscuolo, F.** (2013). Avian erythrocytes have functional mitochondria, opening novel perspectives for birds as animal models in the study of ageing. *Frontiers in Zoology* **10**, 33.
- Stier, A., Romestaing, C., Schull, Q., Lefol, E., Robin, J.-P., Roussel, D. and Bize, P.** (2017). How to measure mitochondrial function in birds using red blood cells: a case study in the king penguin and perspectives in ecology and evolution. *Methods in Ecology and Evolution* **8**, 1172–1182.
- Suarez, R. K., Lighton, J. R., Brown, G. S. and Mathieu-Costello, O.** (1991). Mitochondrial respiration in hummingbird flight muscles. *PNAS* **88**, 4870–4873.
- Talbot, D. A., Duchamp, C., Rey, B., Hanuise, N., Rouanet, J. L., Sibille, B. and Brand, M. D.** (2004). Uncoupling protein and ATP/ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins. *The Journal of Physiology* **558**, 123–135.
- Teulier, L., Degletagne, C., Rey, B., Tornos, J., Keime, C., de Dinechin, M., Raccurt, M., Rouanet, J.-L., Roussel, D. and Duchamp, C.** (2012). Selective upregulation of lipid metabolism in skeletal muscle of foraging juvenile king penguins: an integrative study. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**, 2464–2472.
- Tyrrell, D. J., Bharadwaj, M. S., Jorgensen, M. J., Register, T. C. and Molina, A. J. A.** (2016). Blood cell respirometry is associated with skeletal and cardiac muscle bioenergetics: Implications for a minimally invasive biomarker of mitochondrial health. *Redox Biology* **10**, 65–77.
- Tyrrell, D. J., Bharadwaj, M. S., Jorgensen, M. J., Register, T. C., Shively, C., Andrews, R. N., Neth, B., Dirk Keene, C., Mintz, A., Craft, S., et al.** (2017). Blood-Based Bioenergetic

Profiling Reflects Differences in Brain Bioenergetics and Metabolism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, e7317251.

Voss, M., Shutler, D. and Werner, J. (2010). A Hard Look at Blood Sampling of Birds. *The Auk* **127**, 704–708.

White, C. R., Phillips, N. F. and Seymour, R. S. (2006). The scaling and temperature dependence of vertebrate metabolism. *Biology Letters*. **2**, 125–127.

Zhang, Z.-W., Cheng, J., Xu, F., Chen, Y.-E., Du, J.-B., Yuan, M., Zhu, F., Xu, X.-C. and Yuan, S. (2011). Red blood cell extrudes nucleus and mitochondria against oxidative stress. *IUBMB Life* **63**, 560–565.

Article n° 3 | Allométrie des activités enzymatiques et oxydases : approche multi-tissu chez les oiseaux

J.Barbe, D.Roussel et Y.Voituron

En cours d'écriture - Présentation des résultats préliminaires

CONTEXTE & OBJECTIFS

La première étape du métabolisme énergétique est la disponibilité, le transport et le catabolisme des substrats énergétiques (acides gras, glucose, acides aminés) dans la cellule (glycolyse) et dans les mitochondries (réaction de la pyruvate déshydrogénase, réactions du cycle de Krebs ou système de β -oxydation) permettant de fournir des équivalents réducteurs (NADH ou FADH₂) à la chaîne respiratoire (Rasmussen and Rasmussen, 2000). Il y a donc deux étapes clés dans la transduction d'énergie ; la première se déroulant en amont de la chaîne respiratoire et la deuxième au sein même de la chaîne respiratoire mitochondriale.

La première étape fait intervenir des enzymes spécifiques dans les différentes réactions de métabolisation des nutriments dont certaines sont particulièrement bien étudiées pour qualifier et caractériser les tendances glycolytiques ou oxydatives des tissus. Pour la deuxième étape, les capacités oxydatives de la chaîne mitochondriale sont généralement mesurées, *in vitro*, en mesurant la consommation d'oxygène en présence de substrats énergétiques et d'une concentration saturante d'ADP ou de molécules découplantes comme le FCCP, le CCCP ou le dinitrophénol. La capacité oxydative de la chaîne respiratoire mitochondriale peut être étudiée dans sa globalité ou être étudiée en décortiquant le fonctionnement de chacun des complexes la constituant. Chez les organismes eucaryotes, l'activité des différents complexes peut être augmentée ou réduite sous certaines conditions écologiques comme la saisonnalité (Zheng et al., 2008), la température (Jarmuszkiewicz et al., 2015; Mathers et al., 2017), la disponibilité en oxygène et l'altitude (Scott et al., 2009) ou encore se révéler différente entre espèces (Rasmussen et al., 2004). Ainsi l'activité variable de ces complexes mitochondriaux peut entraîner une toute autre contribution à la respiration mesurée, et être l'œuvre d'un seul complexe ou d'un groupe de complexes.

L'objectif de cette étude était de comprendre comment intervenait l'effet de la masse corporelle sur l'activité des enzymes clés du métabolisme oxydatif (citrate synthase) et glycolytique (lactate déshydrogénase) ainsi que dans le fonctionnement des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexes I, II, IV et le glycerol-3-phosphate déshydrogénase) de 9 à 12 espèces d'oiseaux, par l'intermédiaire de deux méthodes de mesures. Les mesures d'activités enzymatiques (enzymologie, dosage spectrophotométrique) et oxydases (oxygraphie) des complexes mitochondriaux ont été réalisées sur 3 tissus majoritairement impliqués dans le métabolisme de base que sont le muscle squelettique (pectoral ou gastrocnémien), le cœur et le foie.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Enzymologie

Les activités enzymatiques de la lactate déshydrogénase (LDH) et de la citrate synthase (CS) ont été mesurées par un dosage spectrophotométrique à 40°C, à partir d'homogénats de muscle squelettique, de cœur et de foie. Pour les protocoles complets sur les dosages enzymatique en spectrophotométrie, se reporter à la section « Matériels et Méthodes, III.4 ». L'activité de la CS a également été mesurée sur des mitochondries isolées de muscles squelettique et cardiaque. Le contenu mitochondrial des tissus musculaires (mg de protéines mitochondriales/mg de tissu musculaire) a été mesuré par le rapport entre l'activité CS mesurée dans le tissu et celle mesurée dans les mitochondries isolées. Le rapport LDH/CS tissulaire a été utilisé comme index du phénotype glycolytique du tissu. Les activités enzymatiques des complexes I (NADH ubiquinone oxydoréductase) et complexe II (Succinate ubiquinone oxydoreductase) de la chaîne respiratoire mitochondriale ont également été mesurées par dosage spectrophotométrique à 40°C, à partir d'échantillon de mitochondries isolées provenant du muscle squelettique et cardiaque.

Oxygraphie

Les activités oxydases du complexe I, du complexe II, de la Glycerol-3-Phosphate déshydrogénase (mGPDH) ainsi que de la Cytochrome c Oxydase (COX) ont été mesurées en cuve de respirométrie (Rank Brothers® LTD) dans un tampon de respiration à 40°C, à partir de mitochondries isolées de muscle squelettique et de cœur. La respiration mitochondriale ($\text{nmol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéine

mitochondriale) a été initié par l'ajout successif de différents effecteurs : 1 mM NADH + 12 μ M cytochrome c + 2 μ M roténone + 5 mM succinate + 10mM glycerol-3-P + 4 μ M antimycine + 4 mM ascorbate + 0.5 mM TMPD. Pour les protocoles complets sur les mesures de respiration mitochondriale, se reporter à la section « Matériel et Méthodes, III.1 ».

Les relations entre les activités enzymatiques ou oxydases et la masse corporelle des oiseaux ont été transformés en relations linéaires log-log puis analysés suivant les analyses comparatives phylogénétiques présentées dans la section « Matériels et Méthodes, IV).

RÉSULTATS & DISCUSSION

La citrate synthase (CS) est une enzyme se plaçant à l'intersection du catabolisme des nutriments et de l'entrée des métabolites dans le cycle Krebs. C'est donc une enzyme mitochondriale au carrefour métabolique des voies oxydatives et qui est couramment utilisée comme indice de la capacité aérobie maximale des tissus (Emmett and Hochachka, 1981; Hochachka et al., 1988) et pouvant être le reflet du contenu mitochondrial bien que cela ait été récemment discuté (McLaughlin et al., 2020). La lactate déshydrogénase (LDH) est quant à elle une enzyme cytoplasmique, présente dans presque tous les tissus, mais à des concentrations élevées dans les muscles, le foie et les reins. Son rôle est de convertir le produit de la glycolyse, le pyruvate, en lactate dans des conditions anaérobies (Farhana et Lappin, 2020). Ce sont sur ces deux enzymes clés du métabolisme glycolytique et oxydatif que nos mesures se sont portées.

Pour les trois tissus de notre étude, l'activité de la CS et de la LDH semblent respectivement évoluer négativement et positivement, avec la masse corporelle des oiseaux (Figure 1A, B). Le rapport LDH/CS était positivement corrélé avec la masse corporelle dans les trois tissus étudiés (Figure 1C). Il apparait ainsi que dans les trois tissus considérés, les plus petites espèces aviaires présentent ont un phénotype oxydatif plus important que les grandes espèces. Cependant, une corrélation significative n'était retrouvée que dans le muscle squelettique. Ces résultats sur les oiseaux rejoignent une étude menée sur des espèces de mammifères et d'une espèce de colibri (Emmett & Hochachka, 1981) montrant que l'activité de certaines enzymes glycolytiques (lactate déshydrogénase et pyruvate kinase) évoluait positivement avec la masse corporelle tandis que l'activité des enzymes oxydatives (citrate

synthase et β - hydroxybutyryl CoA déshydrogénase) augmentait inversement à la masse corporelle dans le muscle gastrocnémien et cardiaque. Dans le tissu hépatique, on retrouve également une évolution négative de l'activité de la CS avec la masse corporelle chez différentes espèces mammaliennes (Boël et al., 2023). On aurait alors un dessin métabolique commun aux endothermes concernant l'évolution des activités enzymatiques glycolytiques et oxydatives en fonction de la variation de la masse corporelle. Chez les oiseaux, cette relation négative dans le

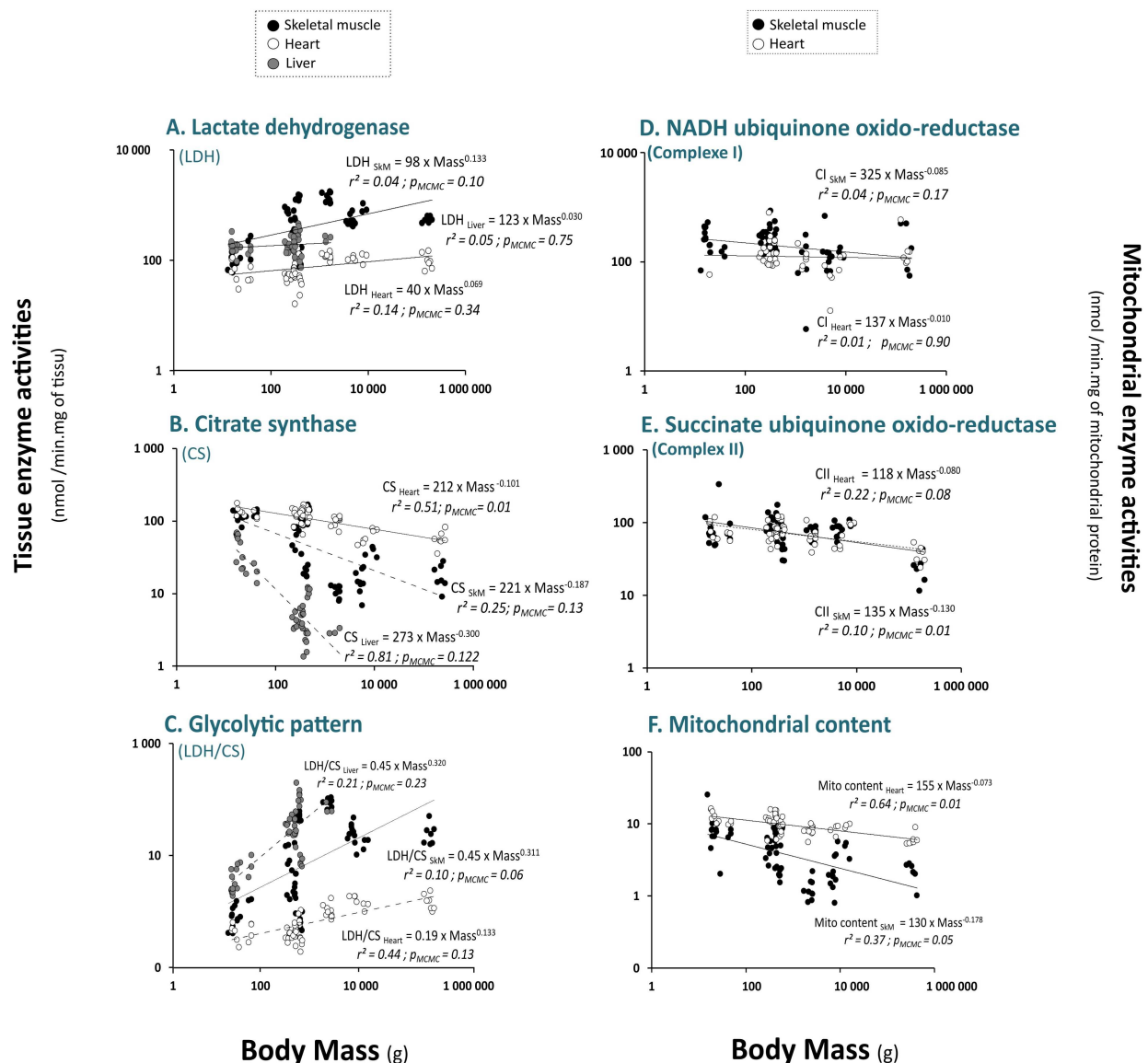


Figure 1 | Effet de la masse corporelle sur les activités enzymatiques tissulaires et mitochondriales chez les oiseaux. L'application de modèles phylogénétiques mixtes bayésiens a permis de caractériser l'évolution de la relation entre les différentes activités enzymatiques et la masse corporelle des oiseaux pour les différents tissus étudiés : muscle squelettique (12 espèces aviaires, cercles noirs) ; cœur (12 espèces aviaires, cercles blancs) et foie (9 espèces aviaires, cercles gris). Les droites en trait plein sont désignées pour une corrélation significative ($p_{MCMC} < 0.05$) alors que les droites en pointillés sont désignées pour une corrélation non significative statistiquement.

muscle mais également dans le cœur est expliquée en partie par un contenu mitochondrial plus élevée chez les petites espèces que chez les grandes (Figure 1F).

L'activité enzymatique mitochondriale du complexe I (NADH oxydo-reductase) et du complexe II (Succinate ubiquinone oxydo-reductase) de la chaîne respiratoire mitochondriale du muscle squelettique et du cœur des oiseaux montrent des corrélations négatives pour le complexe II et plus faible, non significative l'activité du complexe I (Figure 1D, E). La masse corporelle n'aurait pas le même niveau d'impact sur l'activité enzymatique des deux complexes, correspondant aux deux portes d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. Ainsi, le complexe II montre une activité enzymatique plus importante chez les petites espèces que chez les grandes, et notamment dans le muscle squelettique.

En s'intéressant aux activités oxydases (par la méthode oxygraphique) des différents complexes de la chaîne (Figure 2), nous obtenons une information parfois différente à celle obtenue avec les activités enzymatiques dosées en spectrophotométrie (Figure 1). L'activité oxydase, qui implique les complexes I, III, IV de la chaîne respiratoire, est négativement et significativement corrélée avec la masse corporelle, dans les deux tissus musculaires (Figure 2A). En revanche, les corrélations de l'activité succinate oxydase, qui implique les complexes II, III, IV de la chaîne respiratoire, avec la masse corporelle étaient soit légèrement négative dans le muscle squelettique, soit au contraire positive dans le cœur (Figure 2B).

Il semble alors que l'effet de la masse corporelle sur les activités enzymatiques et oxydases ne varient pas toujours dans le même sens en fonction du nombre de complexes impliqués dans la réaction.

La glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale (mGPDH) est une enzyme de 74 kDa, dépendante du FAD, située sur la face externe de la membrane mitochondriale interne (Mráček et al., 2013; Mráček et al., 2013). Bien que la mGPDH soit très peu incluse dans les schémas traditionnels de la chaîne respiratoire, elle constitue un élément important du métabolisme intermédiaire car en tant que composant mitochondrial de la navette glycérophosphate, elle relie la glycolyse aux processus de phosphorylation oxydative (OXPHOS) de la chaîne respiratoire mitochondriale. La teneur mitochondriale en mGPDH varie considérablement entre les différents tissus des mammifères (Ratner et al., 1981; Koza et al., 1996) alors que chez les oiseaux cela reste, à notre connaissance, encore à déterminer.

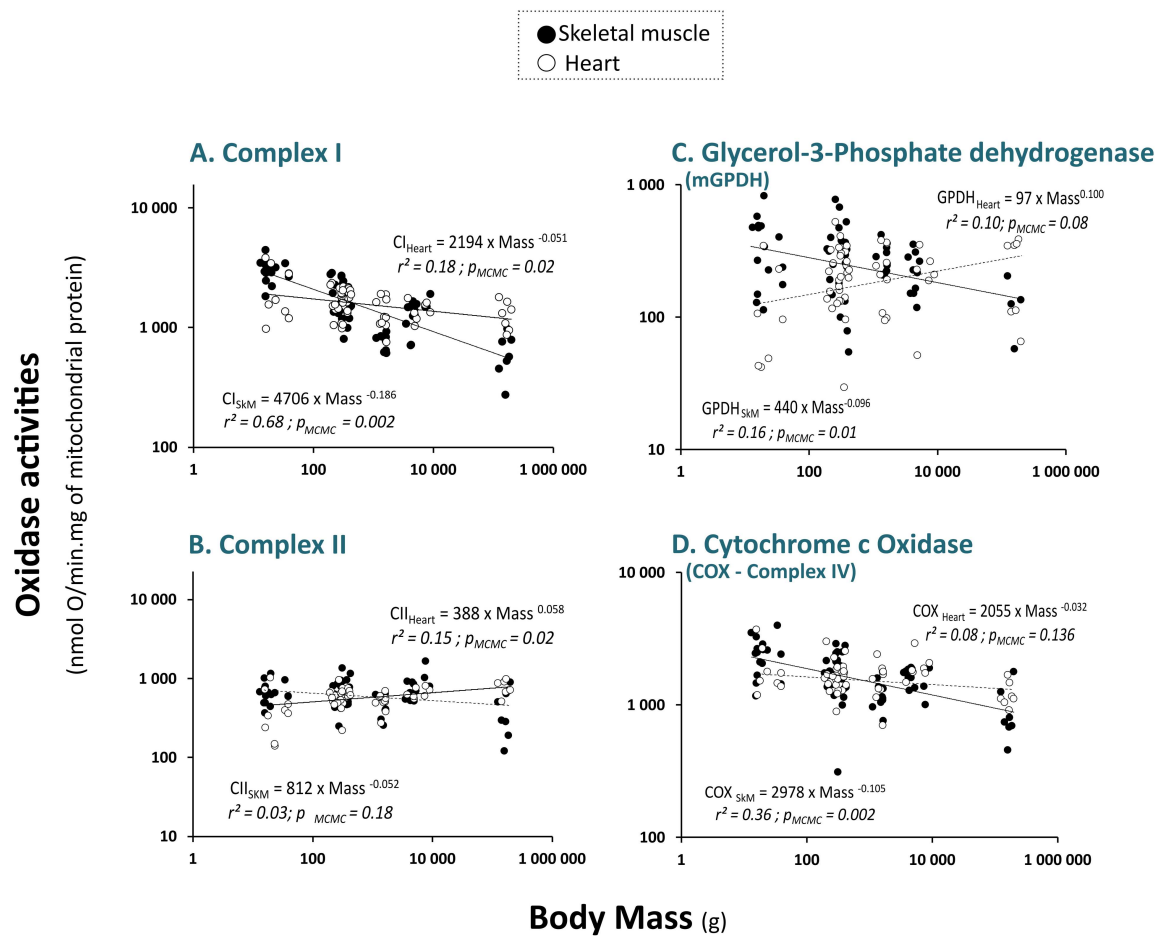


Figure 2 | Effet de la masse corporelle sur les activités oxydases mitochondriales chez les oiseaux. L'application de modèles phylogénétiques mixtes bayésiens a permis de caractériser l'évolution de la relation entre les différentes activités oxydases et la masse corporelle des oiseaux : muscle squelettique (12 espèces aviaires, cercles noirs) ; cœur (12 espèces aviaires, cercles blancs). Les droites en trait plein sont désignées pour une corrélation significative ($p_{MCMC} < 0.05$) alors que les droites en pointillés ne sont pas désignées pour une corrélation statistiquement non significative.

De plus, une faible partie de la littérature s'est intéressée à la contribution de cet élément mitochondriale à générer des ROS chez les oiseaux et les mammifères (Mráček et al., 2009; Kikusato and Toyomizu, 2015) mais très peu d'information existe sur sa contribution à la consommation d'oxygène mitochondriale, et encore moins dans un contexte allométrique. Dans notre étude, les patterns allométriques de l'activité oxydase de la mGPDH diffèrent en fonction du tissu musculaire (Figure 2C). En effet, on observe une corrélation négative significative avec la masse corporelle des oiseaux dans le muscle squelettique alors que dans le cœur, l'évolution de l'activité est positive. Si comme chez les mammifères, l'activité et l'expression en mGPDH sont élevées pour les muscles squelettiques alors qu'elle est plutôt faible dans le muscle cardiaque (Koza et al., 1996), cela pourrait expliquer la différence de tendance allométrique dans les deux

tissus. Enfin, la Figure 2D montre une corrélation négative significative entre l'activité de la COX avec la masse corporelle dans le muscle squelettique. Avec l'activité CS présentée ci-dessus, ce résultat confirme que les petites espèces d'oiseaux auraient alors une capacité oxydative maximale plus importante que les grandes espèces.

Pour conclure, les activités NADH et succinate oxydases dans le muscle squelettique montrent une corrélation négative avec la masse corporelle des oiseaux, similaire à celles des activités du complexe I et II mesurées par dosage spectrophotométrique. En revanche, les deux types de mesures ne semblent pas donner de conclusions analogues dans le cœur. Ainsi, l'évolution des patterns allométriques retrouvés semblent 1) dépendante des tissus musculaires étudiés et 2) également dépendante des méthodes de mesures utilisés (enzymologie vs oxygraphie). L'oxygraphie surpasse l'enzymologie en termes de sensibilité globale et offre un pouvoir discriminatoire beaucoup plus fort que l'enzymologie (Bird et al., 2019). Il est alors nécessaire, lorsque l'on étudie le système OXPHOS, de s'avoir quel type d'information l'on souhaite acquérir sur l'activité oxydative mitochondriale, d'autant plus lorsque l'on s'intéresse à différents tissus, de différentes espèces.

RÉFÉRENCES

Bird, M. J., Adant, I., Windmolders, P., Vander Elst, I., Felgueira, C., Altassan, R., Gruenert, S. C., Ghesquière, B., Witters, P., Cassiman, D., et al. (2019). Oxygraphy Versus Enzymology for the Biochemical Diagnosis of Primary Mitochondrial Disease. *Metabolites* **9**, 220.

Boël, M., Voituron, Y. and Roussel, D. (2023). Body mass dependence of oxidative phosphorylation efficiency in liver mitochondria from mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **284**, 111490.

Emmett, B. and Hochachka, P. W. (1981). Scaling of oxidative and glycolytic enzymes in mammals. *Respiration Physiology* **45**, 261–272.

Hochachka, P. W., Emmett, B. and Suarez, R. K. (1988). Limits and constraints in the scaling of oxidative and glycolytic enzymes in homeotherms. *Canadian Journal of Zoology* **66**, 1128–1138.

Jarmuszkiewicz, W., Woyda-Ploszczyca, A., Koziel, A., Majerczak, J. and Zoladz, J. A. (2015). Temperature controls oxidative phosphorylation and reactive oxygen species production through uncoupling in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* **83**, 12–20.

- Kikusato, M. and Toyomizu, M.** (2015). Moderate dependence of reactive oxygen species production on membrane potential in avian muscle mitochondria oxidizing glycerol 3-phosphate. *The Journal of Physiological Sciences* **65**, 555–559.
- Koza, R. A., Kozak, U. C., Brown, L. J., Leiter, E. H., Macdonald, M. J. and Kozak, L. P.** (1996). Sequence and Tissue-Dependent RNA Expression of Mouse FAD-Linked Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **336**, 97–104.
- Mathers, K. E., McFarlane, S. V., Zhao, L. and Staples, J. F.** (2017). Regulation of mitochondrial metabolism during hibernation by reversible suppression of electron transport system enzymes. *Journal of Comparative Physiology B* **87**, 227–234.
- McLaughlin, K. L., Hagen, J. T., Coalson, H. S., Nelson, M. A. M., Kew, K. A., Wooten, A. R. and Fisher-Wellman, K. H.** (2020). Novel approach to quantify mitochondrial content and intrinsic bioenergetic efficiency across organs. *Scientific Reports* **10**, 17599.
- Mráček, T., Pecinová, A., Vrbacký, M., Drahota, Z. and Houštěk, J.** (2009). High efficiency of ROS production by glycerophosphate dehydrogenase in mammalian mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **481**, 30–36.
- Mráček, T., Drahota, Z. and Houštěk, J.** (2013). The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1827**, 401–410.
- Rasmussen, U. F. and Rasmussen, H. N.** (2000). Human skeletal muscle mitochondrial capacity: Human skeletal muscle mitochondrial capacity. *Acta Physiologica Scandinavica* **168**, 473–480.
- Rasmussen, U. F., Vielwerth, S. E. and Rasmussen, H. N.** (2004). Skeletal muscle bioenergetics: a comparative study of mitochondria isolated from pigeon pectoralis, rat soleus, rat biceps brachii, pig biceps femoris and human quadriceps. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **137**, 435–446.
- Ratner, P. L., Fisher, M., Burkart, D., Cook, J. R. and Kozak, L. P.** (1981). The role of mRNA levels and cellular localization in controlling sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase expression in tissues of the mouse. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 3576–3579.
- Zheng, W.-H., Li, M., Liu, J.-S. and Shao, S.-L.** (2008). Seasonal acclimatization of metabolism in Eurasian tree sparrows (*Passer montanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **151**, 519–525.

**CHAPITRE 2 - Température musculaire, substrat et
bioénergétique mitochondriale : cas du couple
Pigeon/Rat**

Article n° 4 | Effet de l'hyperthermie physiologique sur la sélection du carburant mitochondrial dans le muscle squelettique des oiseaux et des mammifères

J.Barbe, D.Roussel et Y.Voituron

Publié dans *Journal of Thermal Biology* (2023)

CONTEXTE & OBJECTIFS

Les oiseaux et les mammifères ont d'importantes capacités thermogéniques leur permettant de maintenir des températures corporelles élevées, à savoir 37°C et 40°C en moyenne chez les mammifères et les oiseaux, respectivement. Cependant, pendant les périodes de forte activité locomotrice, l'énergie libérée lors de la contraction musculaire peut conduire à une température musculaire atteignant 43 à 44°C. Les mitochondries sont responsables de la production de la majorité de l'ATP via la respiration cellulaire en métabolisant différents substrats comme les glucides et les lipides. Un nombre limité d'études comparant des espèces aviaires et mammaliennes ont montré l'utilisation préférentielle de substrats spécifiques pour l'énergie mitochondriale à différentes intensités métaboliques, mais les auteurs ont toujours mesuré à la température du corps au repos. La présente étude a donc évalué les taux de respiration mitochondriale et l'efficacité de couplage OXPHOS à 37°C, 40°C et 43°C associés au pyruvate/malate (métabolisme glucidique) ou à la palmitoyl-carnitine/malate (métabolisme lipidique) comme substrats, chez des pigeons (*Columba livia*) et des rats (*Rattus norvegicus*), un couple oiseau/mammifère bien connu dans la littérature scientifique et présentant une masse corporelle similaire.

MÉTHODES

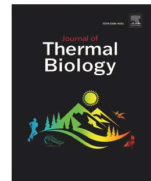
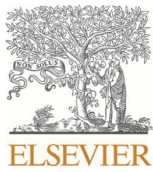
Les mitochondries ont été isolées à partir du muscle squelettique de la locomotion principale de pigeons (n=8) et de rats (n=8). La respiration mitochondriale a été initiée en ajoutant soit 5 mM de pyruvate / 2.5 mM de malate, soit 40 µM de palmitoyl-DL-carnitine / 2.5 mM malate, et mesurée à 37°C, 40°C et 43°C pour imiter *in vitro*, l'augmentation de la température musculaire.

RÉSULTATS

		
Sensibilité à l'élévation de la température	+	+++
Préférence substrat en hyperthermie physiologique (43°C)	Lipides	Glucides
Diminution de l'efficacité du couplage OXPHOS avec l'élévation de la température	+ glucides Ø lipides	+ glucides ++ lipides

Stratégies mitochondriales différentes des endothermes faisant face à des températures musculaires extrêmes pour répondre aux demandes énergétiques spécifiques.

→ DOIT ÊTRE PRIS EN COMPTE DANS LES ÉTUDES COMPARATIVES OISEAUX/MAMMIFÈRES



Effect of physiological hyperthermia on mitochondrial fuel selection in skeletal muscle of birds and mammals

Jessica Barbe^{*}, Damien Roussel, Yann Voituron

Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69622, Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Mitochondrial respiration
Muscular temperature
Substrates
Endotherms
Sensitivity

ABSTRACT

Both birds and mammals have important thermogenic capacities allowing them to maintain high body temperatures, i.e., 37 °C and 40 °C on average in mammals and birds, respectively. However, during periods of high locomotor activity, the energy released during muscular contraction can lead to muscle temperature reaching up to 43–44 °C. Mitochondria are responsible for producing the majority of ATP through cellular respiration and metabolizing different substrates, including carbohydrates and lipids, to generate ATP. A limited number of studies comparing avian and mammalian species showed preferential utilization of specific substrates for mitochondrial energy at different metabolic intensities, but authors always measured at body temperature. The present study evaluated mitochondrial respiration rates and OXPHOS coupling efficiencies at 37 °C, 40 °C and 43 °C associated with pyruvate/malate (carbohydrate metabolism) or palmitoyl-carnitine/malate (lipid metabolism) as substrates in pigeons (*Columba livia*) and rats (*Rattus norvegicus*), a well-known pair in scientific literature and for their similar body mass. The data show different hyperthermia-induced responses between the two species with (i) skeletal muscle mitochondria from rats being more sensitive to rising temperatures than in pigeons, and (ii) the two species having different substrate preferences during hyperthermia, with rats oxidizing preferentially carbohydrates and pigeons lipids. By analyzing the interplay between temperature and substrate utilization, we describe a means by which endotherms deal with extreme muscular temperatures to provide enough ATP to support energy demands.

1. Introduction

Mammals and birds are endothermic animals, meaning that their thermogenesis capacities allow them to maintain relatively high and constant internal body temperatures. Although the average temperature in placental mammals and birds is close to 37 °C and 41 °C respectively, substantial variation has been described in response to extrinsic factors, such as environmental temperature (Geiser, 2004; Krüger et al., 1982; McKechnie and Lovegrove, 2002) and fasting (Monternier et al., 2017; Severinsen and Munch, 1999) and intrinsic factors, such as gender, reproductive and locomotion activities (Fernández-Peña et al., 2023; Prinzinger et al., 1991). During active phases or high locomotor activity, the production of heat by muscular contraction triggers a rise in the body temperature reaching up to ~43–44 °C in birds (McNab, 1966) and mammals (Brooks et al., 1971a; Saltin et al., 1968). It is well known that an increase in temperature has the ability to increase biochemical reactions and cellular processes, at least until the denaturation of protein and destabilization of the cell membrane. Although an increase in

temperature can benefit muscle performance (contractile properties, velocity, mechanical power) (James, 2013; Ranatunga, 1998), it also affects the mitochondrial energy metabolism by increasing oxygen consumption, proton leakage, and membrane destabilization, resulting in a decrease in the mitochondrial coupling efficiency (Brooks et al., 1971b; Willis and Jackman, 1994; Jarmuszkiewicz et al., 2015; Roussel and Voituron, 2020; Thorat et al., 2023; Zoladz et al., 2016). The mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) system relies on a tight coupling between electron transport and ATP synthesis that provides the energy necessary for cellular processes. Thus, a decrease in the mitochondrial coupling efficiency (ATP/O ratio) indicates a loss of energy transfer between the electron transport and ATP synthesis, which could ultimately decrease ATP delivery and cell performance. As skeletal muscles are the main source of heat production during exercise, their mitochondria may be specifically affected by exercise-induced hyperthermia.

The first step of the OXPHOS metabolism is the ability of mitochondria to transport and oxidize respiratory substrates. Animals use

^{*} Corresponding author.

E-mail address: jessica.barbe@univ-lyon1.fr (J. Barbe).

carbohydrates and lipids to fuel mitochondrial oxidative phosphorylation (Rasmussen and Rasmussen, 2000). The management and utilization of fuel differ between birds and mammals when sustaining high metabolic intensity. In mammals, there is a general dependence on carbohydrate oxidation, particularly on muscle glycogen, which dominates at higher exercise intensities (Hargreaves and Spriet, 2020; Weber, 2011). On the contrary, birds are able to maintain a high lipid oxidation during intense skeletal muscle activity such as shivering or flight (Guglielmo, 2010; Vaillancourt and Weber, 2007). Fuel preferences have been observed at the mitochondrial level, with birds exhibiting higher oxidation of fatty acids relative to pyruvate (the end product of glycolysis and a central metabolite involved in the carbohydrate catabolism under aerobic conditions) compared with mammals (Kuzmiak et al., 2012; Kuzmiak-Glancy and Willis, 2014; Rasmussen et al., 2004).

In birds and mammals, the muscular thermal adjustment from resting metabolic activity to high metabolic activity (flying or running) does not occur with the same magnitude of temperature change. In fact, muscle temperature in mammals increases from a physiological body temperature of 37 °C to a physiological hyperthermia of 42 °C. The variation is similar in birds: from 40 °C (or even 38 °C for certain non-flying species) to an average of 44 °C (Prinzinger et al., 1991). Few comparative studies between these two clades consider the increase in muscle temperature during intense activity, and even fewer are coupled with a preference for the use of energy fuels (carbohydrate, lipid). Thus, the aim of this study is to assess how much physiological hyperthermia influences the mitochondrial fuel selection of skeletal muscle between these two endothermic clades. For this study, we used the most common mammal-bird comparison in the scientific literature, which is the rat-pigeon pair. Their similar body mass excludes an allometric effect on mitochondrial bioenergetics as described in endotherms (Boel et al., 2019; Brand et al., 2003; Emmett and Hochachka, 1981; Porter and Brand, 1993). To reproduce muscle temperatures within the typical range of metabolic intensity shift, mitochondria from the skeletal muscle supporting the main locomotion in birds (*pectoralis* muscle) and mammals (hindlimb muscles) were isolated and exposed to 3 assay temperatures (37 °C, 40 °C, and 43 °C). Both 37 and 40 °C represent physiological muscular temperatures during low metabolic activity (rest) and 43 °C represents the realistic hyperthermia in these two endotherms.

2. Material and methods

2.1. Animals

All experiments were conducted in accordance with the animal care guidelines of the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. We complied with Article R. 427-6 of the Environmental Code regarding wildlife species.

Wistar rats (*Rattus norvegicus*; $n = 8$; 276 ± 29 g) and domestic pigeons (*Columba livia*; $n = 8$; 293 ± 17 g) of equivalent body masses were selected for all the experiments. Body masses between pigeon and rat were not statistically different ($W = 34$, $p = 0.88$; $d = 0.25$, 95% CI: 0.76 to 1.27). Therefore, any variation in mitochondrial bioenergetics of the rat-pigeon pair should not be attributed to an effect of the body mass. Rats were collected from the laboratory animal platform (ASCED), and housed at 25 °C (12 h:12 h light:dark cycle). A certified trapper provided the pigeons recently captured and kept in outdoor aviaries (15 h:9 h light:dark cycle; 13–23 °C). Rats were killed under isoflurane-induced general anaesthesia, whereas pigeons were killed by cervical dislocation. Fresh skeletal muscle samples were obtained and used for the mitochondria isolation.

2.2. Tissue preparation and mitochondrial isolation

Pectoralis muscles from pigeons and hind-limb muscles

(gastrocnemius, quadriceps) from rats were excised and used for mitochondrial preparation. Mixed populations of skeletal muscle mitochondria were isolated in an ice-cold isolation buffer (100 mM sucrose, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, and 50 mM Tris-base, pH 7.4), following a standard extraction protocol, using a Potter-Elvehjem homogenizer, protease digestion, and differential centrifugation, all steps at 4 °C (Boel et al., 2019). Briefly, 2–3 g of skeletal muscle were cleared of adipose tissue, finely cut up, homogenized with a Potter-Elvehjem homogenizer (five passages), and centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min. The supernatant containing subsarcolemmal mitochondria was maintained in an ice bath and the pellet containing intermyofibrillar mitochondria was suspended in an isolation buffer and treated with protease from *Bacillus licheniformis* (1 mg g⁻¹ muscle wet mass) for 5 min in an ice bath. The homogenate was diluted (1:2) using the supernatant from the first centrifugation and the mixture was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min. The resulting supernatant was filtered and centrifuged at $8700 \times g$ for 10 min to pellet mitochondria. The mitochondrial pellet was resuspended in an isolation buffer and centrifuged at $8700 \times g$ for 10 min. This step was carried out a second time. Mitochondrial protein concentrations were determined using the biuret method with bovine serum albumin as standard.

2.3. Mitochondrial respiration and oxidative parameters

The mitochondrial respiration was assessed at 37 °C, 40 °C, and 43 °C by measuring oxygen consumption rates (Clark-type oxygen electrode, Rank Brothers Ltd, UK). The air-saturated medium was assumed to contain 406, 393, and 380 nmol of O₂/ml at 37 °C, 40 °C, and 43 °C respectively, according to Reynafarje et al. (1985). Isolated mitochondria were incubated in the respiratory buffer (120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 3 mM HEPES, and 0.3% BSA, pH 7.4) supplemented with 20 mM glucose and 2 U·ml⁻¹ hexokinase. Respiration was initiated by adding either 5 mM pyruvate/2.5 mM malate or 40 μM palmitoyl-DL-carnitine/2.5 mM malate. The rate of phosphorylating oxygen consumption was increased step-by-step by the sequential addition of 5, 10, 20, 100, and 500 μM ADP. Thus, intermediate steady-state rates of oxidative phosphorylation were recorded at the final concentration of 5, 15, 35, 135, and 635 μM ADP.

The basal non-phosphorylating respiration rates were measured in the presence of respiratory substrate alone in the absence of added ADP (state 2). The phosphorylating respiration (OXPHOS, P) was the maximal value of respiration rate measured in the presence of ADP.

The fuel selection index was calculated by dividing the maximal phosphorylating respiration rate associated with the oxidation of palmitoyl-carnitine/malate over that measured during the oxidation of pyruvate/malate (OXPHOS_{PCM}/OXPHOS_{PM} ratio). This ratio reflects the relative mitochondrial oxidation of lipid-over carbohydrate-derived substrate (Kuzmiak et al., 2012).

The control efficiency, the OXPHOS capacity (P) corrected for the basal non-phosphorylating respiration (Basal) was calculated as $1 - (\text{Basal}/\text{OXPHOS})$. This parameter describes the flux control of ADP on substrate oxidation, which can be viewed as an indicator of the OXPHOS coupling efficiency: a value approaching 1 indicates a maximally coupled respiration, and a value of 0 indicates a non-ADP controlled respiration (Gnaiger et al., 2020).

2.4. Statistical analysis

All analyses were performed in R version 4.2.1 (R Core Team, 2022). A paired two-tailed Wilcoxon test was performed to determine whether there was a difference in the body mass of the pigeons and rats, a requirement for the application of this study. The effect of species (pigeon or rat), respiratory substrates (Pyruvate/Malate, and Palmitoyl-carnitine/Malate), and assay temperature (37, 40 or 43 °C) on mitochondrial bioenergetics were evaluated using linear mixed models (LMMs, “lmer” function of the lme4 package) by fixing “individuals” as a

random factor for repeated measure analysis (effect of temperature within species). A stepwise procedure was applied to remove the non-significant interaction from the model involving the species effect. Data were tested for normality of the residuals (Shapiro-Wilk test), and Levene's test to assess the homoscedasticity, followed by Tukey's post hoc tests ("glht" function of the multcomp package). We assessed the magnitude of the quantitative relationship between variables to validate the observed differences and because we lacked statistical power due to small sample sizes. Thus, we estimated the effect sizes using Cohen's d (Cohen, 2013; Nakagawa and Cuthill, 2007) and the η^2 (η^2 and generalized η^2 for dependent variables) with their 95% CIs with "effsize" library (Torchiano, 2020) and "effectsize" library (Ben-Shachar et al., 2020) in R. To assess the magnitude of the effect, the following thresholds were used: "negligible" ($|d| < 0.2$ or $|\eta^2| < 0.10$); "small" ($|d| < 0.5$ or $|\eta^2| < 0.25$); "medium" ($|d| < 0.8$ or $|\eta^2| < 0.40$) and "large" beyond these values. The threshold for statistical significance for all analyses was $p < 0.05$ and all data are presented as means $\pm$ s. e.m.

3. Results and discussion

3.1. Effect of acute hyperthermia on mitochondrial oxidative activity

Following exposure to increasing assay temperature (37 °C, 40 °C, and 43 °C), isolated skeletal muscle mitochondria of both species showed distinct respiration patterns regarding the nature of the substrate (Fig. 1). Mitochondrial respiration in rats and pigeons for the pyruvate/malate did not display a significant dependence on increasing temperature (Fig. 1A; Pigeon $\chi^2 = 0.9141$, $df = 2$, $p = 0.6331$ with $\eta^2 = 0.03$, 95% CI [0.0, 1.00], and Fig. 1B; Rat $\chi^2 = 3.0911$, $df = 2$, $p = 0.2132$ with $\eta^2 = 0.09$, 95% CI [0.0, 1.00]), except for the rate of basal non-phosphorylating respiration (Basal) in rat (Table 1; $\chi^2 = 9.2301$, $df = 2$, $p < 0.01$ with $\eta^2 = 0.18$, 95% CI [0.0, 1.00]). Nonetheless, there was a large difference in the OXPHOS shift from the lowest temperature (37 °C) to the highest temperature (43 °C) between the two species, being nearly null in pigeons but 35% higher in rats (Table 1). The intensity to which OXPHOS and basal respiration increased with

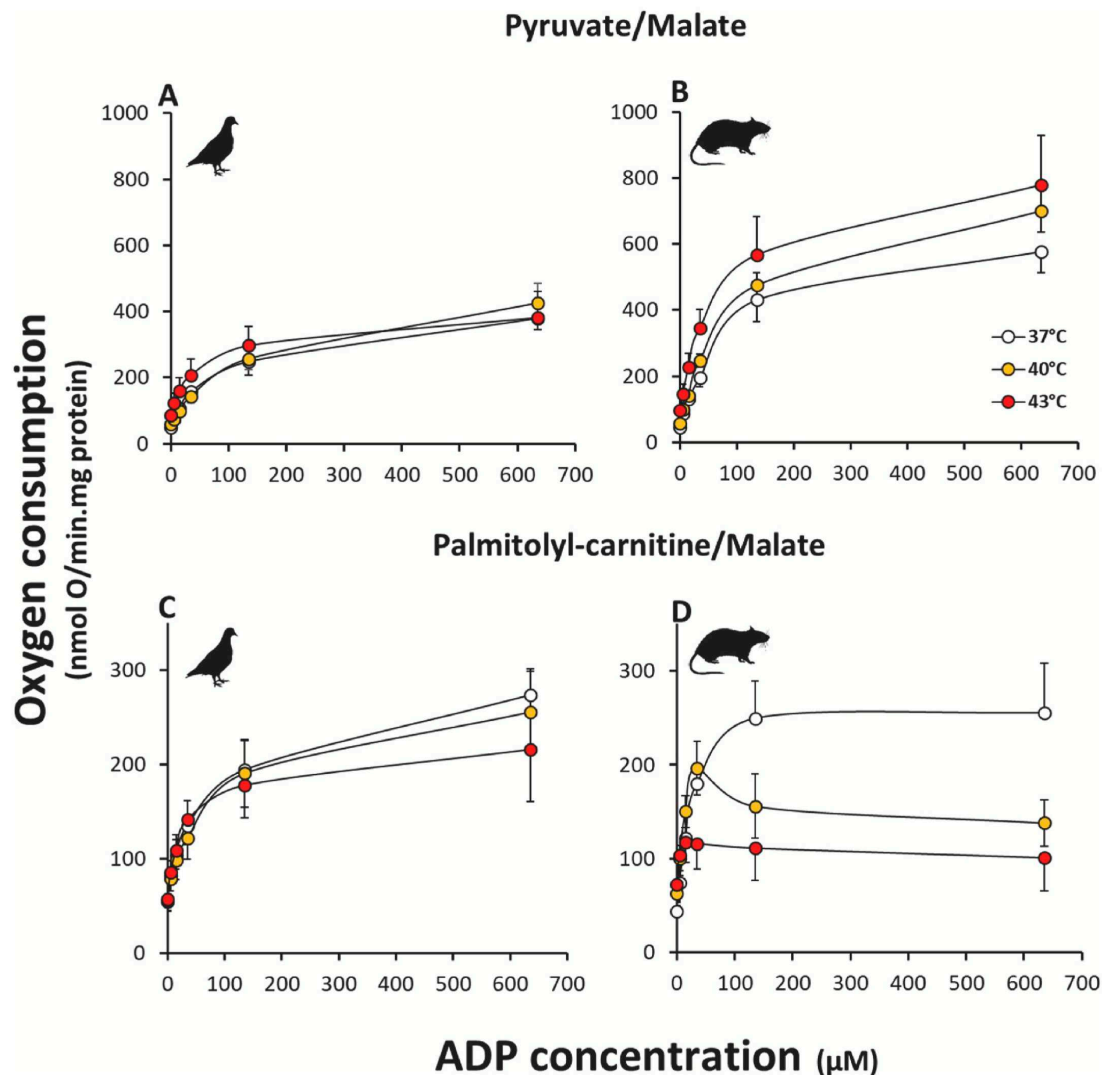


Fig. 1. Dependence of oxygen consumption rate on ADP concentration in isolated skeletal muscle mitochondria. Mitochondria were isolated from the skeletal muscle of pigeons (panels A, C) or rats (panels B, D). Mitochondrial respiration was measured at 37 °C, 40 °C, and 43 °C in the presence of 5 mM pyruvate/2.5 mM malate (panels A, B) or 40 μM palmitoyl-carnitine/2.5 mM malate (panels C, D). Values are means $\pm$ s. e.m. from $n = 8$ independent mitochondrial preparations, excepted $n = 6$ at 43 °C for panels C and D.

Table 1

Effects of temperature on mitochondrial respiration rates. Respiration rates were determined at 37, 40, and 43 °C for pigeons and rats in the presence of 5 mM pyruvate/2.5 mM malate or 40 μM palmitoyl-L-carnitine/2.5 mM malate. OXPHOS is the maximal value of respiration rate measured in the presence of ADP, and basal non-phosphorylating rate (Basal) measured in the presence of substrate alone. Values are means ± s.e.m for n = 8 animals; *n = 6 at 43 °C for mitochondria from pigeon and rat respiring on palmitoyl-carnitine/malate. Different lower-case letters denote significant differences ($p < 0.05$) within the same species. † $p < 0.05$ significantly different from pigeon within the same assay temperature.

Substrates	Respiration rates	Species	Assay temperature (°C)		
			37	40	43
Pyruvate/Malate	OXPHOS	Pigeon	379 ±	426 ±	383 ±
		Rat	35	59	79
		Pigeon	577 ±	700 ±	778 ±
		Rat	64	64	151 [†]
	Basal	Pigeon	50.5 ±	58.3 ±	85.3 ±
		Rat	7.7	6.9	23.8
		Pigeon	46.4 ±	57.4 ±	96.7 ±
		Rat	7.4 ^a	6.6 ^{ab}	22.5 ^b
Palmitoyl-Carnitine/Malate*	OXPHOS	Pigeon	273 ±	256 ±	242 ±
		Rat	28	43	52
		Pigeon	284 ±	222 ±	133 ±
		Rat	51 ^a	30 ^{ab}	32 ^b
	Basal	Pigeon	54.6 ±	55.7 ±	57.5 ±
		Rat	7.6	11.3	12.4
		Pigeon	43.9 ±	63.5 ±	72.3 ±
		Rat	6.7 ^a	10.2 ^b	17.1 ^b

increasing temperatures in rats is similar to previously reported results in skeletal muscle mitochondria respiring on pyruvate/malate (Brookes et al., 1971b; Jarmuszkiewicz et al., 2015; Zoladz et al., 2016). With a lipid-derived respiratory substrate, no significant effect of temperature on the ADP dependence of oxygen consumption appeared in pigeon mitochondria (Fig. 1C). The rates of OXPHOS ($\chi^2 = 2.8993$, $df = 2$, $p = 0.2347$ with $\eta^2 = 0.11$, 95% CI [0.0, 1.00]), and basal respiration ($\chi^2 = 0.9406$, $df = 2$, $p = 0.6248$ with $\eta^2 = 0.04$, 95% CI [0.0, 1.00]) were not significantly different between assay temperatures in pigeon mitochondria oxidizing palmitoyl-carnitine/malate (Table 1). Surprisingly, the kinetic pattern of lipid-derived oxidation was different in rats compared with pigeons (Fig. 1C and D). In rats, the rates of phosphorylating respiration were inhibited by the highest concentrations of ADP (135 and 635 μM) at 40 °C and 43 °C. It results that high temperatures had a significant negative impact on OXPHOS rates in rat mitochondria oxidizing palmitoyl-carnitine/malate ($\chi^2 = 6.8722$, $df = 2$, $p < 0.05$ with $\eta^2 = 0.21$, 95% CI [0.00, 1.00]), which was 2-fold lower at 43 °C compared to 37 °C (Table 1). This result contrasts with the study of (Zoladz et al., 2017) who reported an increased oxidative activity at high temperatures in rat skeletal muscle mitochondria respiring on palmitoyl-carnitine. The reason for this discrepancy is unknown, but it may be linked to methodological differences: i) the assay temperatures (35 and 42 °C in Zoladz et al., 2017 versus 37 and 43 °C in the present study); ii) the combination of the respiratory substrates (500 μM palmitoyl-carnitine with no malate in Zoladz et al., 2017 versus 40 μM palmitoyl-carnitine with 2.5 mM malate in the present study); and iii) the lower ADP concentration used to initiate OXPHOS (150 μM in Zoladz et al., 2017 versus 635 μM for the highest concentration in the present study). The effect of hyperthermia on the oxidation of lipid-derived substrate in skeletal muscle needs further investigation to be clarified.

In contrast, the oxidative activity in pigeon mitochondria was not affected at high temperatures. Yet, it has been reported in rat that the rates of OXPHOS in heart mitochondria were also not affected by increasing temperature, at least up to 43 °C (Power et al., 2014; Zukien et al., 2010). These data suggest that some mitochondrial phenotypes can be more or less sensitive to acute changes in temperature. The proportion of the long-chain polyunsaturated docosahexaenoic acid (C22:6 n-3) of the inner membrane, which is positively correlated to

mitochondrial membrane proton conductance (Brookes et al., 1998) and OXPHOS activity (Piquet et al., 2004), might be among characteristics acting on the temperature sensitivity of mitochondria. The rationale is that the higher contents of unsaturation would trigger a more rapid transition from molecular order to hyperfluidity (Park et al., 2005). The fact that the mitochondrial membrane of skeletal muscles in birds and the heart in mammals exhibit a lower C22:6 n-3 content than skeletal muscle mitochondria of rats (Montgomery et al., 2011) could explain part of the differential sensitivity of these mitochondria to hyperthermia. Although this hypothesis has yet to be tested, it remains that the molecular mechanisms of mitochondrial response to hyperthermia are obviously more complex, involving interactions between OXPHOS proteins and physical membrane properties.

3.2. Mitochondrial fuel preference

Mitochondria isolated from rats' skeletal muscle exhibited a greater preference for carbohydrate-derived substrates than skeletal muscle mitochondria from pigeons (Fig. 1). On the whole, the OXPHOS_{PM} rates of mitochondria respiring on pyruvate/malate were 50–60% higher in rats than in pigeons at 37 °C and 40 °C, becoming significantly different between the two species only at the highest temperature (Table 1; $\chi^2 = 9.9544$, $df = 1$, $p < 0.01$ with $\eta^2 = 0.42$, 95% CI [0.09, 1.00]). Similarly, mitochondrial pyruvate/malate oxidation has been reported to be 47% higher in rat biceps than in pigeon pectoralis (Rasmussen et al., 2004). These mitochondrial oxidative differences between rats and pigeons were less pronounced when succinate was used as a respiratory substrate (Montgomery et al., 2011; Rasmussen et al., 2004). The rates of OXPHOS_{PCM} (i.e., measured in the presence of palmitoyl-carnitine/malate) were not significantly different between the two species (Table 1; $\chi^2 = 0.3588$, $df = 1$, $p = 0.54918$ with $\eta^2 = 0.03$, 95% CI [0.00, 1.00]). This result contrasts with those reported by Kuzmiak and colleagues, who found a higher mitochondrial rate of lipid oxidation in sparrows than in rats (Kuzmiak et al., 2012). However, the authors compared a small bird (the house sparrow weighing 25 g on average) to rats 10 times heavier, weighing 250–300 g. Since the activity of mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscles correlates negatively with body mass (Boel et al., 2019), the reported differences in Kuzmiak et al. (2012) might be partly ascribed to an allometric effect. This is supported by the comparative study of Rasmussen et al. (2004) who reported a slightly higher, although not significant, rate of maximal phosphorylating respiration in muscle mitochondria respiring on palmitoyl-carnitine/malate between pigeons (pectoralis) and rats (soleus or biceps).

Notwithstanding the body mass, lipid oxidation preference can be calculated relative to pyruvate oxidation (the end product of carbohydrate catabolism), and it has been reported to be higher in birds than in mammals (Kuzmiak et al., 2012; Kuzmiak-Glancy and Willis, 2014; Rasmussen et al., 2004). In the present study, the relative oxidation of lipid-derived substrates over that of carbohydrate-derived substrates was significantly higher in pigeons than in rats (Fig. 2; $\chi^2 = 41.38$, $df = 1$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.53$, 95% CI [0.34, 1.00]). Fig. 2 also shows that this ratio greatly dropped with increasing temperatures in rats ($\chi^2 = 17.695$, $df = 2$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.45$, 95% CI [0.04, 1.00]), an effect that results from the combination of a significant downregulation of fatty acid oxidation and a substantial increase in the oxidation of carbohydrate-derived substrates at high temperatures (Table 1). On the contrary, these ratios were not significantly affected by temperature in pigeons (Fig. 2; $\chi^2 = 4.0874$, $df = 2$, $p = 0.1296$ with $\eta^2 = 0.18$, 95% CI [0.00, 1.00]). These data thus indicate that, relative to the capacity of skeletal muscle mitochondria to oxidize carbohydrate-derived substrates, pigeon mitochondria had a higher capacity to oxidize lipid-derived substrates than rat mitochondria, a “capacity for lipid oxidation” that is maintained at high temperature.

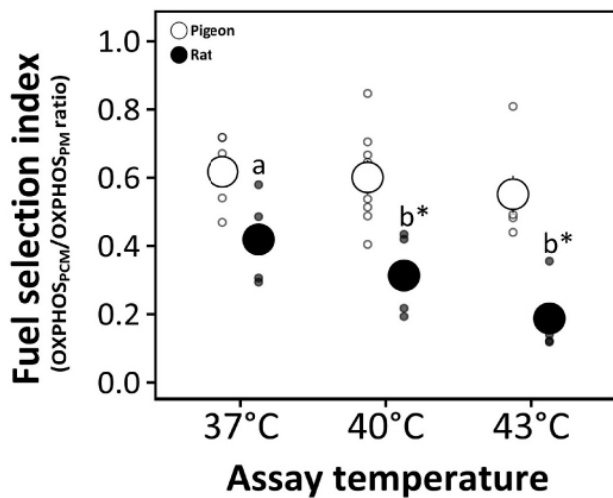


Fig. 2. Fuel selection index of skeletal muscle mitochondria from pigeon and rat. The fuel selection index refers to the relative oxidative phosphorylation capacity of skeletal muscle mitochondria for palmitoyl-carnitine/malate (OXPHOS_{PCM}) over that for pyruvate/malate (OXPHOS_{PM}). This ratio was calculated in pigeon (white bars) and rat (black bars) by dividing the maximal OXPHOS rate of mitochondria respiring on palmitoyl-carnitine/malate by the corresponding rate measured in the presence of pyruvate/malate (OXPHOS_{PCM}/OXPHOS_{PM}). See "Materials and Methods" section for more details. Values are means $\pm$ s. e.m. from $n = 8$ independent mitochondrial preparations, excepted $n = 6$ at 43°C . Different lower-case letters denote significant differences ($p < 0.05$) within the same species. * $p < 0.05$, significantly different from pigeons within the same temperature assay.

3.3. Mitochondrial coupling efficiency

Fig. 3 shows the flux control efficiency of ADP on pyruvate/malate-supported respiration (Fig. 3A), and palmitoyl-carnitine/malate-supported respiration (Fig. 3B). The values for carbohydrate-derived substrate were higher in rat than in pigeon, at the highest assay temperature (Fig. 3A; $\chi^2 = 17.545$, $df = 1$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.56$, 95% CI [0.23, 1.00]). The flux control efficiencies on pyruvate/malate-supported respiration were slightly affected by temperature in rats ($\chi^2 = 7.7025$, $df = 2$, $p < 0.05$ with $\eta^2 = 0.21$, 95% CI [0.00, 1.00]), and decreased significantly by 10% with increasing temperatures in pigeons (Fig. 3A; $\chi^2 = 7.7025$, $df = 2$, $p < 0.05$ with $\eta^2 = 0.27$, 95% CI [0.00, 1.00]). On the contrary, the flux control efficiencies on palmitoyl-carnitine/malate respiration were not affected by temperature in pigeons ($\chi^2 = 3.8253$, $df = 2$, $p = 0.1477$ with $\eta^2 = 0.16$, 95% CI [0.00, 1.00]), but decreased significantly with increasing temperature in rats ($\chi^2 = 18.425$, $df = 2$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.49$, 95% CI [0.08, 1.00]), becoming significantly lower in rats than in pigeons at 43°C (Fig. 3B; $\chi^2 = 10.288$, $df = 1$, $p < 0.01$ with $\eta^2 = 0.47$, 95% CI [0.15, 1.00]). This lower flux control efficiency of ADP on pyruvate/malate-supported respiration reported at the highest temperature is explained by a disproportionate increase in basal respiration (+110% in rats and +69% in pigeons compared with values at 37°C) compared with changes in OXPHOS respiration (Table 1). This is in line with the well-known primary effect of hyperthermia on mitochondrial respiration, which is the pronounced increase in inner mitochondrial membrane permeability, leak respiration, and subsequent decrease in coupling efficiency (Brooks et al., 1971b; Jarmuszkiewicz et al., 2015; Power et al., 2014). In contrast, the 2-fold decrease in the flux control efficiency of ADP at 43°C reported in rat mitochondria respiring on lipid-derived substrate results from the combination of the increase in basal respiration and the decrease in OXPHOS respiration. Altogether, these results clearly highlight that the mitochondrial activity and efficiency, and thus the ATP

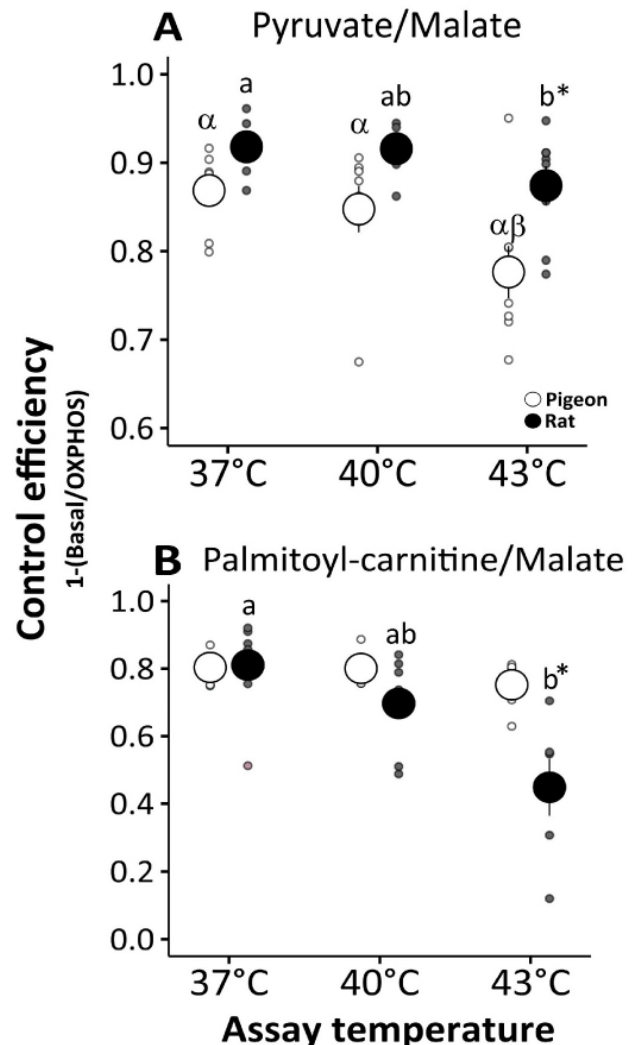


Fig. 3. Flux control efficiency of skeletal muscle mitochondria. Flux control efficiency of ADP on A) pyruvate/malate- and B) palmitoyl-carnitine/malate-supported respiration were calculated in pigeons (white bars) and rats (black bars). Values are means $\pm$ s. e.m. from $n = 8$ independent mitochondrial preparations, excepted $n = 6$ at 43°C for panel B. Different lower-case letters denote significant differences ($p < 0.05$) within the same species. * $p < 0.05$, significantly different from pigeons within the same temperature assay.

synthesis capacity, are compromised at 43°C in rat muscle mitochondria respiring on lipid-derived substrates but not in pigeons.

4. Conclusion

The fundamental finding of the present study is that skeletal muscle fuel selection occurs at the mitochondrial level during experimentally induced hyperthermia *in vitro*. Pigeon mitochondria maintain high lipid oxidation capacities relative to carbohydrate-derived substrates, whereas hyperthermia negatively impacts the capacity of mammalian mitochondria to oxidize fatty acids. In contrast, mammalian mitochondria primarily oxidize carbohydrate-derived substrates, maintaining this preference for pyruvate oxidation during hyperthermia.

Funding sources

This work was supported by the French Government (Ph.D. grant:

2020–2023)

CRedit authorship contribution statement

Jessica Barbe: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – review & editing. **Damien Roussel:** Conceptualization, Methodology, Data curation, Validation, Supervision, Writing – original draft. **Yann Voituren:** Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Data availability

The data and code source of this study are openly available in Zenodo at: <https://doi.org/10.5281/zenodo.8164745>.

Acknowledgements

We thank Annaëlle Benard for reviewing the English manuscript. We also thank the ASCED platform for taking care of rats before experiments and certified trappers from UNAPAF association for providing pigeons. We warmly thank two anonymous reviewers for their constructive remarks and comments on the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103719>.

References

- Ben-Shachar, M., Lüdtke, D., Makowski, D., 2020. Effectsize: estimation of effect size indices and standardized parameters. *J. Open Source Softw.* 5, 2815. <https://doi.org/10.21105/joss.02815>.
- Boel, M., Rostaing, C., Voituren, Y., Roussel, D., 2019. Allometry of mitochondrial efficiency is set by metabolic intensity. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 286, 20191693. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1693>.
- Brand, M.D., Turner, N., Ocloo, A., Else, P.L., Hulbert, A.J., 2003. Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem. J.* 376, 741–748. <https://doi.org/10.1042/bj20030984>.
- Brookes, P.S., Buckingham, J.A., Tenreiro, A.M., Hulbert, A.J., Brand, M.D., 1998. The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 119, 325–334. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00357-X](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00357-X).
- Brooks, G.A., Hittelman, K.J., Faulkner, J.A., Beyer, R.E., 1971a. Tissue temperatures and whole-animal oxygen consumption after exercise. *Am. J. Physiol.* 221, 427–431.
- Brooks, G., Hittelman, K., Faulkner, J., Beyer, R., 1971b. Temperature, skeletal muscle mitochondrial functions, and oxygen debt. *Am. J. Physiol.* 220, 1053–1059. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1971.220.4.1053>.
- Cohen, J., 2013. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Academic Press.
- Emmett, B., Hochachka, P.W., 1981. Scaling of oxidative and glycolytic enzymes in mammals. *Respir. Physiol.* 45, 261–272. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(81\)90010-4](https://doi.org/10.1016/0034-5687(81)90010-4).
- Fernández-Peña, C., Reimúndez, A., Viana, F., Arce, V.M., Señaís, R., 2023. Sex differences in thermoregulation in mammals: implications for energy homeostasis. *Front. Endocrinol.* 14, 1093376. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1093376>.
- Gnaiger, E., et al., 2020. Mitochondrial physiology. *Bioenerg. Commun.* 1, 1–44.
- Geiser, F., 2004. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 239–274. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.115105>.
- Guglielmo, C.G., 2010. Move that fatty acid: fuel selection and transport in migratory birds and bats. *Integr. Comp. Biol.* 50, 336–345. <https://doi.org/10.1093/icb/icq097>.
- Hargreaves, M., Spriet, L.L., 2020. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nat. Metab.* 2, 817–828. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0251-4>.
- James, R.S., 2013. A review of the thermal sensitivity of the mechanics of vertebrate skeletal muscle. *J. Comp. Physiol. B* 183, 723–733. <https://doi.org/10.1007/s00360-013-0748-1>.
- Jarmuszkiewicz, W., Woyda-Ploszczyca, A., Koziel, A., Majerczak, J., Zoladz, J.A., 2015. Temperature controls oxidative phosphorylation and reactive oxygen species production through uncoupling in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 83, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.012>.
- Krüger, K., Prinzing, R., Schuchmann, K.-L., 1982. Torpor and metabolism in hummingbirds. *Comp. Biochem. Physiol.* 73, 679–689. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(82\)90275-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90275-4).
- Kuzmiak, S., Glancy, B., Sweazea, K.L., Willis, W.T., 2012. Mitochondrial function in sparrow pectoralis muscle. *J. Exp. Biol.* 215, 2039–2050. <https://doi.org/10.1242/jeb.065094>.
- Kuzmiak-Glancy, S., Willis, W.T., 2014. Skeletal muscle fuel selection occurs at the mitochondrial level. *J. Exp. Biol.* 217, 1993–2003. <https://doi.org/10.1242/jeb.098863>.
- Mckechie, A.E., Lovegrove, B.G., 2002. Avian facultative hypothermic responses: a review. *Condor* 104, 705–772.
- McNab, B.K., 1966. An analysis of the body temperatures of birds. *Condor* 68, 47–55. <https://doi.org/10.2307/1365174>.
- Monterrier, P.-A., Teulier, L., Drai, J., Bourguignon, A., Collin-Chavagnac, D., Hervant, F., Rouanet, J.-L., Roussel, D., 2017. Mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency is upregulated during fasting in two major oxidative tissues of ducklings. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 212, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.06.018>.
- Montgomery, M.K., Hulbert, A.J., Buttemer, W.A., 2011. The long life of birds: the rat-pigeon comparison revisited. *PLoS One* 6, e24138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024138>.
- Nakagawa, S., Cuthill, I.C., 2007. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biol. Rev.* 82, 591–605. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00027.x>.
- Park, H.G., Han, S.I., Oh, S.Y., Kang, H.S., 2005. Cellular responses to mild heat stress. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 10–23. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4208-7>.
- Piquet, M.-A., Roulet, M., Nogueira, V., Filippi, C., Sibille, B., Hourmand-Ollivier, I., Pilet, M., Rouleau, V., Leverve, X.M., 2004. Polyunsaturated fatty acid deficiency reverses effects of alcohol on mitochondrial energy metabolism. *J. Hepatol.* 41, 721–729. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.07.002>.
- Porter, R.K., Brand, M.D., 1993. Body mass dependence of H⁺ leak in mitochondria and its relevance to metabolic rate. *Nature* 362, 628–630. <https://doi.org/10.1038/362628a0>.
- Power, A., Pearson, N., Pham, T., Cheung, C., Phillips, A., Hickey, A., 2014. Uncoupling of oxidative phosphorylation and ATP synthase reversal within the hyperthermic heart. *Phys. Rep.* 2, e12138. <https://doi.org/10.14814/phys2.12138>.
- Prinzing, P., Prebmar, A., Schleucher, E., 1991. Body temperature in birds. *Comp. Biochem. Physiol.* 99, 499–506.
- Ranatunga, K., 1998. Temperature dependence of mechanical power output in mammalian (rat) skeletal muscle. *Exp. Physiol.* 83, 371–376. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1998.sp004120>.
- Rasmussen, U.F., Rasmussen, H.N., 2000. Human skeletal muscle mitochondrial capacity: human skeletal muscle mitochondrial capacity. *Acta Physiol. Scand.* 168, 473–480. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2000.00699.x>.
- Rasmussen, U.F., Vielwerth, S.E., Rasmussen, H.N., 2004. Skeletal muscle bioenergetics: a comparative study of mitochondria isolated from pigeon pectoralis, rat soleus, rat biceps brachii, pig biceps femoris and human quadriceps. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 137, 435–446. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2003.11.002>.
- Reynafarje, B., Costa, L.E., Lehniger, A.L., 1985. O₂ solubility in aqueous media determined by a kinetic method. *Anal. Biochem.* 145, 406–418. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90381-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90381-1).
- Roussel, D., Voituren, Y., 2020. Mitochondrial costs of being hot: effects of acute thermal change on liver bioenergetics in toads (*Bufo bufo*). *Front. Physiol.* 11, 153. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00153>.
- Saltin, B., Gagge, A.P., Stolwijk, J.A., 1968. Muscle temperature during submaximal exercise in man. *J. Appl. Physiol.* 25, 679–688. <https://doi.org/10.1152/jappl.1968.25.6.679>.
- Severinsen, T., Munch, I.C., 1999. Body core temperature during food restriction in rats. *Acta Physiol. Scand.* 165, 299–305. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.1999.00488.x>.
- Torchiano, M., 2020. Package “effsize”. Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/effsize/effsize.pdf>. accessed on 18 July, 2023.
- Thoral, E., Roussel, D., Gasset, E., Dutto, G., Queiros, Q., McKenzie, D.J., Bourdeix, J.-H., Metral, L., Saraux, C., Teulier, L., 2023. Temperature-dependent metabolic consequences of food deprivation in the European sardine. *J. Exp. Biol.* 226, 244984. <https://doi.org/10.1242/jeb.244984>.
- Vaillancourt, E., Weber, J.-M., 2007. Lipid mobilization of long-distance migrant birds in vivo: the high lipolytic rate of ruff sandpipers is not stimulated during shivering. *J. Exp. Biol.* 210, 1161–1169. <https://doi.org/10.1242/jeb.003012>.
- Weber, J.-M., 2011. Metabolic fuels: regulating fluxes to select mix. *J. Exp. Biol.* 214, 286–294. <https://doi.org/10.1242/jeb.047050>.
- Willis, W.T., Jackman, M.R., 1994. Mitochondrial function during heavy exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26, 1347–1353.
- Zoladz, J.A., Koziel, A., Broniarek, I., Woyda-Ploszczyca, A.M., Ogrodna, K., Majerczak, J., Celichowski, J., Szkutnik, Z., Jarmuszkiewicz, W., 2017. Effect of temperature on fatty acid metabolism in skeletal muscle mitochondria of untrained and endurance-trained rats. *PLoS One* 12 (12), e0189456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189456>.
- Zoladz, J.A., Koziel, A., Woyda-Ploszczyca, A., Celichowski, J., Jarmuszkiewicz, W., 2016. Endurance training increases the efficiency of rat skeletal muscle mitochondria. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 468, 1709–1724. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1867-9>.
- Zukiene, R., Nauciene, Z., Ciapaitė, J., Mildaziene, V., 2010. Acute temperature resistance threshold in heart mitochondria: febrile temperature activates function

but exceeding it collapses the membrane barrier. *Int. J. Hyperther.* 26, 56–66.
<https://doi.org/10.3109/02656730903262140>.

Article n° 5 | Effet de la température musculaire sur l'efficacité mitochondriale : comparaison pigeon-rat

J.Barbe, D.Roussel et Y.Voituron

En cours d'écriture (1^{ère} version) - Soumission prévue dans *Journal of Comparative Physiology B*

CONTEXTE & OBJECTIFS

Malgré leur caractéristique endothermique commune, les oiseaux présentent un taux métabolique, une température corporelle ainsi qu'une longévité plus élevée que les mammifères de même masse corporelle. Les oiseaux semblent alors défier toute une série de théories écologiques, suggérant que les différences observées entre ces deux clades en matière de métabolisme et de processus de vieillissement pourraient résulter d'une fonction et d'une efficacité mitochondriale distincte. Dans le muscle squelettique, la phosphorylation oxydative est le principal processus responsable de la synthèse de l'ATP : l'énergie directement disponible pour les cellules et soutenant l'activité locomotrice. Il en résulte un rapport ATP/O qui est un indicateur clé du rendement énergétique, nous renseignant alors sur l'efficacité des mitochondries à fournir de l'énergie à l'organisme. Au repos, la température corporelle moyenne des oiseaux est en moyenne de 40°C et celle des mammifères de 37°C. Cependant, lors d'un exercice de haute intensité (vol/course), la température musculaire peut atteindre 42°C et 44°C chez les mammifères et les oiseaux, respectivement. Dans ces conditions et pour une masse corporelle similaire, le fait que les oiseaux aient des flux métaboliques plus importants, suggérerait une efficacité de couplage mitochondriale plus faible chez les oiseaux. L'objectif a été d'évaluer et de comparer la flexibilité de l'efficacité de couplage mitochondrial musculaire pour le couple pigeon-rat à différentes températures physiologiques.

MÉTHODES

Pour déterminer l'effet de l'augmentation de la température musculaire sur la bioénergétique mitochondriale : la consommation d'O₂, la synthèse d'ATP, l'efficacité du couplage mitochondrial (rapport ATP/O) et des activités enzymatiques ont été mesurées à trois températures *in vitro* (37°C, 40°C et 43°C) dans des mitochondries isolées de muscles squelettiques provenant de pigeons (n=8 ; *Columba livia*) et de rats (n=8 ; *Rattus norvegicus*). Au contraire de l'étude précédente « pigeon-rat », nous avons initié la respiration mitochondriale avec un mélange commun de substrat énergétique : 5 mM pyruvate / 2.5 mM malate / 5 mM succinate. Différentes intensités métaboliques ont été induites par l'ajout de différentes concentrations d'ADP.

RÉSULTATS

- Effet de la température seulement sur les flux d'O₂
- Les flux mitochondriaux (ATP et O₂) sont 2 fois plus élevés chez le rat que chez le pigeon
- L'efficacité mitochondriale diminue avec l'augmentation de la température chez les deux espèces
- Meilleure efficacité mitochondriale chez le pigeon, à intensité métabolique moyenne (entre le repos et l'état maximal)
- Activités enzymatiques du métabolisme oxydatif et du complexe I plus élevées chez le pigeon, pouvant être à l'origine d'une meilleure efficacité mitochondriale *in fine*.

Résultats surprenants démontrant une meilleure efficacité mitochondriale chez les pigeons à n'importe quelle température pour des intensités métaboliques modérées.

→ QUID DU STRESS OXYDATIF ?

Research article:

**Effects of muscle temperatures on the mitochondrial coupling efficiency: the
pigeon-rat comparison**

Jessica Barbe^{1*}, Yann Voituron^{1#}, and Damien Roussel[#]

¹Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69622,
Villeurbanne, France

*Author for correspondence (jessica.barbe@univ-lyon1.fr)

These authors equally contributed to this work

Abstract

Birds and mammals are endotherms that, through thermoregulatory mechanisms, maintain a high and relatively constant body temperature (36°-41°C). However, birds' singularity is to have a higher metabolic rate, body temperature, and longevity than mammals with similar body mass. Birds appear to defy various ecological theories, suggesting that the differences between these two clades in metabolism and ageing processes could result from a distinct mitochondrial function. In skeletal muscle, oxidative phosphorylation is the main process responsible for the synthesis of ATP: energy directly available to the cells and supporting locomotor activity. The ATP/O ratio is an indicator of the mitochondrial coupling efficiency and informs us about the mitochondria-sparing nature. At rest, the average body temperature of birds is ~ 41°C and of mammals ~ 37°C. Under these conditions and for similar body mass, the fact that birds have higher metabolic parameters suggests a lower mitochondrial efficiency in birds. However, during a high-intensity exercise (flying/running), muscle temperature can reach 44°C and 42°C in birds and mammals respectively. In this study, we compared isolated mitochondria from skeletal muscle at physiological temperature (37 vs. 40°C corresponding to the rest or 43°C in high intensities) from pigeons and rats. Our results showed that in both species oxygen consumption, mitochondrial coupling efficiency, and oxidase activities of the mitochondrial respiratory chain complexes were strongly impacted by increasing temperature. Unexpectedly, pigeon mitochondria appeared to be as or more efficient than rats for any temperature and at lower metabolic activities. This supports the paradoxical feature of birds and raises questions about oxidative stress associated with the use of different respiratory substrates.

Keywords: Birds, mammals, body temperature, mitochondrial coupling efficiency

Introduction

Endothermy in vertebrates evolved at least twice, in the clade leading to mammals and birds independently (Clarke and Pörtner, 2010; Hedrick and Hillman, 2016). The advantages of endothermy are fairly well known; allowing to maintain relatively high and constant body temperature through thermoregulation processes (Bennett and Ruben, 1979; Koteja, 2004; Mozo et al., 2005; Lovegrove, 2017). Some of the most significant benefits of endothermy for birds and

mammals include a high degree of thermal independence from environmental temperature, stability of enzymatic catalysis, high muscular power output, and sustained levels of activity (Bennett and Ruben, 1979; Hedrick and Hillman, 2016; Lovegrove, 2017). Moreover, high body temperature leads to continuing their daily activity at night, enabling them to occupy different under-used thermal niches (i.e., independence of timing daily activity). Endothermy, however, has a high maintenance cost since the associated high metabolic rates are energetically very expensive and require a great deal of food. As a result, when faced with a challenging environment or a specific metabolic requirement, body temperature can be subject to temporal and regional variations and is therefore not always high or constant. For example, endothermy may be temporarily interrupted during periods of torpor or hibernation (Geiser, 1988; McKechnie and Lovegrove, 2002; Geiser, 2004) and the body temperature of birds and mammals may exhibit circadian variability, for which the range of oscillation decreases with increasing body mass (Prinzinger et al., 1991; Refinetti, 1999; Angilletta, 2009). While the latter elements modifying temperature temporarily are generally species or taxa-dependent, the body temperature of endotherms also depends on their metabolic activities (Prinzinger et al., 1991). Indeed, endothermic body temperatures display lower values in the resting phase and higher values in the active phases or high activities due to the production of heat by muscular contraction. Whereas the average temperature of birds is $\sim 41^{\circ}\text{C}$ and placental mammals $\sim 37^{\circ}\text{C}$, it has been recorded to increase during active phases reaching $\sim 44^{\circ}\text{C}$ in birds (McNab, 1966; Prinzinger et al., 1991) and $\sim 42^{\circ}\text{C}$ in mammalian muscles during exercise (Brooks et al., 1971; Saltin et al., 1968). Thus, skeletal muscles, especially those supporting locomotion, can be exposed to considerable temperature changes, which can modify endotherms' behavioural, physiological, and bioenergetic flexibility to regulate their body temperature and ensure efficient locomotion.

It is known that the temperature has a direct exponential effect on the kinetics of biochemical reactions, cellular processes, and the whole organism metabolic rate of organisms (Gillooly et al., 2001; Brown et al., 2004; Clarke, 2006; Gillooly et al., 2006). Furthermore, the high metabolic rate of an organism, especially in endotherms, is inextricably linked to a key player in energy metabolism, namely the mitochondria: the main sites of oxygen consumption, energy transduction in the form of ATP, and for which a part of the energy is inherently lost as heat. Indeed, most of the oxygen consumed by the mitochondria is therefore used for oxidative phosphorylation (OXPHOS), but a significant proportion of the respiration, up to 20%, is used

to drive the proton leakage across the mitochondrial inner membrane (Nicholls, 1977; Brand et al., 1994; Brand, 2000). Thus, the ATP synthesis and the proton leakage compete for the same electrochemical proton gradient, imposing an energy trade-off for organisms and affecting the mitochondrial coupling efficiency (ATP/O ratio) a key parameter of energy transduction and cell performances. An increase in temperature can benefit muscle performances (contractile properties, velocity, mechanical power) (Ranatunga, 1998; James, 2013), it also affects the mitochondrial energy metabolism by increasing oxygen consumption, proton leakage, and membrane destabilization, resulting in a decrease in the mitochondrial coupling efficiency (Brooks et al., 1971; Jackman and Willis, 1996; Jarmuszkiewicz et al., 2015; Zoladz et al., 2016; Roussel and Voituron, 2020). As skeletal muscles are the main source of heat production during exercise, their mitochondria may be specifically affected by the temperature rise induced by the locomotor activity.

Few studies consider the effect of mitochondrial thermal environment induced by a modification of the metabolic activity in endotherms, and thus we follow up on the recent rat-pigeon comparative study (Barbe et al., 2023), showing that skeletal muscle mitochondria from rats being more sensitive to rising temperatures than in pigeons, for carbohydrate or lipid respiratory substrates. While the results of this study highlight that respiration control efficiency in rat-isolated mitochondria using lipid-derived substrates is compromised at 43°C (physiological hyperthermia) but not in pigeons, we propose to investigate this further by assessing the ATP synthesis corresponding to the specific oxygen consumption and allowing to determine the mitochondrial coupling efficiency (ATP/O ratio). To determine the effect of increasing muscular temperature on mitochondrial bioenergetics: oxygen consumption, ATP synthesis, the mitochondrial coupling efficiency (ATP/O ratio), and respiratory chain enzyme activities were measured at three assay temperatures (37°C, 40°C, and 43°C) in isolated skeletal muscle mitochondria from pigeons and rats, with pyruvate/malate/succinate as common respiratory substrate.

Materials and methods

Animals

All experiments were conducted in accordance with the animal care guidelines of the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. We complied with Article R. 427-6 of the Environmental Code regarding wildlife species.

Wistar rats (*Rattus norvegicus*; n=8; 276 ± 29 g) and pigeons (*Columba livia*; n=8; 293 ± 17 g) with equivalent body masses were selected for all the experiments. Body mass between pigeon and rat was not statistically different ($W = 34$, $p = 0.88$; $d=0.25$, 95% CI: -0.76 to 1.27). Therefore, any variation in mitochondrial bioenergetics of the rat-pigeon pair should not be attributed to a body mass effect. Rats were collected from the laboratory animal platform (ASCED) and housed at 25°C (12h:12h light:dark cycle). A certified trapper provided the pigeons recently captured and kept in outdoor aviaries (15h:9h light: dark cycle; 13-23°C). Rats were killed under isoflurane-induced general anaesthesia, whereas pigeons were killed by cervical dislocation. Fresh skeletal muscle samples were obtained and used for the mitochondria isolation.

Tissue preparation and mitochondrial isolation

Pectoralis muscle for pigeons and hind-limb muscles (gastrocnemius, quadriceps) for rats were excised and used for mitochondrial preparation. The mixed population of skeletal muscle mitochondria was isolated in an ice-cold isolation buffer (100 mM sucrose, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, and 50 mM Tris-base, pH 7.4), following a standard extraction protocol, using a Potter-Elvehjem homogenizer, protease digestion, and differential centrifugation, all steps at 4 °C (Boël et al., 2019). Briefly, 2-3 g of skeletal muscle were cleared of adipose tissue, finely cut up, homogenized with a Potter-Elvehjem homogenizer (five passages), and centrifuged at 1,000 × g for 10 min. The supernatant containing subsarcolemmal mitochondria was maintained in an ice bath and the pellet containing intermyofibrillar mitochondria was suspended in an isolation buffer and treated with protease from *Bacillus licheniformis* (1 mg.g⁻¹ muscle wet mass) for 5 min in an ice bath. The homogenate was diluted (1:2) using the supernatant from the first centrifugation and the mixture was centrifuged at 1,000 × g for 10 min. The resulting supernatant was filtered and centrifuged at 8,700 × g for 10 min to pellet mitochondria. The mitochondrial pellet was resuspended in an isolation buffer and centrifuged at 8,700 × g for 10 min. This step was carried out a second time. Mitochondrial protein concentrations were determined using the biuret method with bovine serum albumin (BSA) as standard.

Mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation efficiency

The mitochondrial respiration was assessed at 37°C, 40°C, and 43°C by measuring oxygen consumption rates (Clark-type oxygen electrode, Rank Brothers Ltd, UK). The air-saturated medium was assumed to contain 406, 393, and 380 nmol of O₂/ml at 37 °C, 40 °C, and 43°C respectively, according to Reynafarje et al., (1985). Isolated mitochondria from skeletal muscle were incubated in the respiratory buffer (120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 3 mM HEPES, and 0.3% BSA, pH 7.4) supplemented with 20 mM glucose and 2 U.ml⁻¹ hexokinase. Respiration was initiated by adding a mixture of respiratory substrates consisting of 5 mM pyruvate / 2.5 mM malate / 5 mM succinate. Different steady-state rates of phosphorylation were initiated by the addition of 5, 10, 20, 100, and 500 μM ADP. The phosphorylating respiration rates were recorded for 4 min. Then, aliquots of mitochondrial suspension were withdrawn every minute and quenched in a perchloric acid solution (10% HClO₄, 25 mM EDTA). The denatured proteins were centrifuged at 21,000 ×g for 5 min at 4 °C and the resulting supernatant was neutralized with a KOH solution (2 M KOH, 0.3 M Mops) and centrifuged at 21,000 × g for 5 min (4 °C). The ATP production was determined from the glucose-6-phosphate content of samples, as described previously (Teulier et al., 2010). Briefly, the supernatant was incubated in reaction buffer (50 mM triethanolamine-HCl, 7.5 mM MgCl₂, and 3.75 mM EDTA, pH 7.4, at room temperature) supplemented with 0.5 mM NAD and assayed spectrophotometrically by monitoring the production of NADH in the presence of 0.5 U glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* at 340 nm. The rate of ATP production was calculated from the slope of the linear accumulation of glucose-6-phosphate over the sampling time interval (1 min). It is important to note that the ATP synthesis was also determined in the basal non-phosphorylating respiration rates in the presence of 2 μg.mL⁻¹ oligomycin to ensure that the measured rates were specific to the mitochondrial ATP synthase activity. These values were taken into account to calculate the rate of mitochondrial ATP synthesis. The mitochondrial coupling efficiency of oxidative phosphorylation, i.e., the ATP/O ratio was determined by dividing the ATP synthesis rate by the oxygen consumption rate during state 3 respiration.

Alongside these measurements, classic mitochondrial respirations were carried out to provide a detailed breakdown of the respiratory chain functioning through the different complexes. The classic mitochondrial respiration was also assessed at 37°C, 40°C, and 43°C (Clark-type oxygen

electrode, Rank Brothers Ltd, UK). Initial oxygen consumption (state 2_{PM}) was initiated by adding 5 mM pyruvate and 2.5 mM malate (PM) and measured for 2 minutes. The active state of respiration (state 3_{PM}) relative to complex I was initiated by the addition of 500 µM ADP and measured for 2 min. In the same way, the active state of respiration (state 3_{PMS}) relative to complexes I + II was initiated by the addition of 5 mM succinate and measured for 2 min. To inhibit complex I, 5 µM rotenone was added and respiration rate relative to complex II was measured. The basal non-phosphorylating respiration rate (state 4_{oligo}) was obtained by the addition of 2 µg.ml⁻¹ of oligomycin, an inhibitor of ATP synthase. The basal non-phosphorylating respiration (state 4_{oligo}) is mostly linked to mitochondrial proton leak. Thereafter, the maximal uncoupled respiration (state 3_{uncoupled}) was initiated by the addition of 2 µM carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP).

To be able to estimate the substrate contribution (succinate) to mitochondrial respiration, the substrate contribution ratio (SCR) was calculated using the following formula:

$$SCR = \frac{State\ 3_{PMS} - State\ 3_{PM}}{State\ 3_{PMS}}$$

Enzyme activities

Citrate synthase (CS), NADH ubiquinone oxidoreductase (complex I), and succinate dehydrogenase (complex II) activities were measured spectrophotometrically in isolated mitochondria at 37, 40, and 43°C. Mitochondrial samples were diluted (1 :21 et 1 :42) in the isolation buffer (100 mM sucrose, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, and 50 mM Tris-base, pH 7.4). CS activity was measured at 412 nm in a reaction medium (100 mM TRIS buffer, 300 µM acetyl-CoA, 100 µM DTNB, pH 8), and the reaction was initiated by the addition of oxaloacetate (400 µM). The CS activity was quantified using an extinction coefficient set at 13 600 M⁻¹. cm⁻¹ and the mitochondrial citrate synthase activity was expressed in nmol.min⁻¹.mg⁻¹ of mitochondrial protein. Complex I activity was measured at 340 nm in a reaction medium (50 mM PO₄/EDTA, 100 µM decyl-ubiquinone, 3.75 g.L⁻¹ BSA, with and without 10 µM rotenone), and the reaction was initiated by the addition of NADH (3 mM). Complex I expressed in nmol.min⁻¹.mg⁻¹ protein was quantified using an extinction coefficient set at 6 220 M⁻¹. cm⁻¹. Complex II activity was measured at 600 nm in a reaction buffer (50 mM PO₄/EDTA, 100 µM DCPIP, 1mM KCN, 20mM

succinate et 2 g.L⁻¹ BSA) and the reaction was initiated by the addition of 0.1 mM decyl-ubiquinone. Complex II expressed in nmol.min⁻¹.mg⁻¹ protein was quantified using an extinction coefficient set at 19 000 M⁻¹. cm⁻¹.

The complex contribution to electron transport for respiration was determined by the ratio between complex I activity and complex II activity (CI/CII). This ratio is particularly interesting because these two complexes represent the main electron entry points into the mitochondrial electron transport chain.

Statistical analysis

All analyses were performed in R version 4.2.1 (R Core Team 2022). A paired two-tailed Wilcoxon test was performed to determine whether there was no difference in the body mass of the pigeons and rats, a requirement for the application of this study. The effect of species (pigeon or rat) and assay temperature (37, 40 or 43°C) on mitochondrial bioenergetics were evaluated using linear mixed models (LMMs, “lmer” function of the lme4 package) by fixing “individuals” as a random factor for repeated measure analysis (effect of temperature within species). A stepwise procedure was applied to remove the non-significant interaction from the model involving the species effect. Data were tested for normality of the residuals and the homogeneity of variances, followed by Tukey’s post hoc (“glht” function of the multcomp package). We assessed the magnitude of the quantitative relationship between variables to validate the observed differences and because we lacked statistical power due to small sample sizes. Thus, we estimated the effect sizes using *Cohen’s d* (Cohen, 2013; Nakagawa and Cuthill, 2007) and the η^2 (η^2 and generalized η^2 for dependent variables) with their 95% CIs with “effsize” library (Torchiano, 2020) and “effectsize” library (Ben-Shachar et al., 2020) in R. To assess the magnitude of the effect, the following thresholds were used: negligible $|d| < 0.2$ or $|\eta^2| < 0.10$; small $|d| < 0.5$ or $|\eta^2| < 0.25$; medium $|d| < 0.8$ or $|\eta^2| < 0.40$ and beyond large. The level of statistical significance for all analyses was $p < 0.05$ and all data are presented as means $\pm$ s.e.m.

Results

Effect of muscular temperature on the phosphorylating respiration

Linear relationships between mitochondrial ATP synthesis and oxygen consumption rates of both species studied were compared at 37°C, 40°C and 43°C (Fig.1). In pigeon and rat isolated mitochondria, the increasing assay temperatures have a significant effect on the increase of the phosphorylating respiration (Pigeon : $\chi^2 = 8.93$, $df = 2$, $p < 0.05$ with $\eta^2 = 0.20$, 95% CI [0.00, 1.00]; Rat: $\chi^2 = 25.48$, $df = 2$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.35$, 95% CI [0.00, 1.00]) and the basal non-phosphorylating respiration (Pigeon : $\chi^2 = 105.46$, $df = 2$, $p < 0.01$ with $\eta^2 = 0.75$, 95% CI [0.49, 1.00]; Rat: $\chi^2 = 115.44$, $df = 2$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.58$, 95% CI [0.22, 1.00]). While oxygen consumption rates are affected by increasing temperature, ATP synthesis is not in rat ($\chi^2 = 0.73$, $df = 2$, $p = 0.694$ with $\eta^2 = 0.02$, 95% CI [0.00, 1.00]) and pigeon mitochondria ($\chi^2 = 2.54$, $df = 2$, $p = 0.279$ with $\eta^2 = 0.10$, 95% CI [0.00, 1.00]).

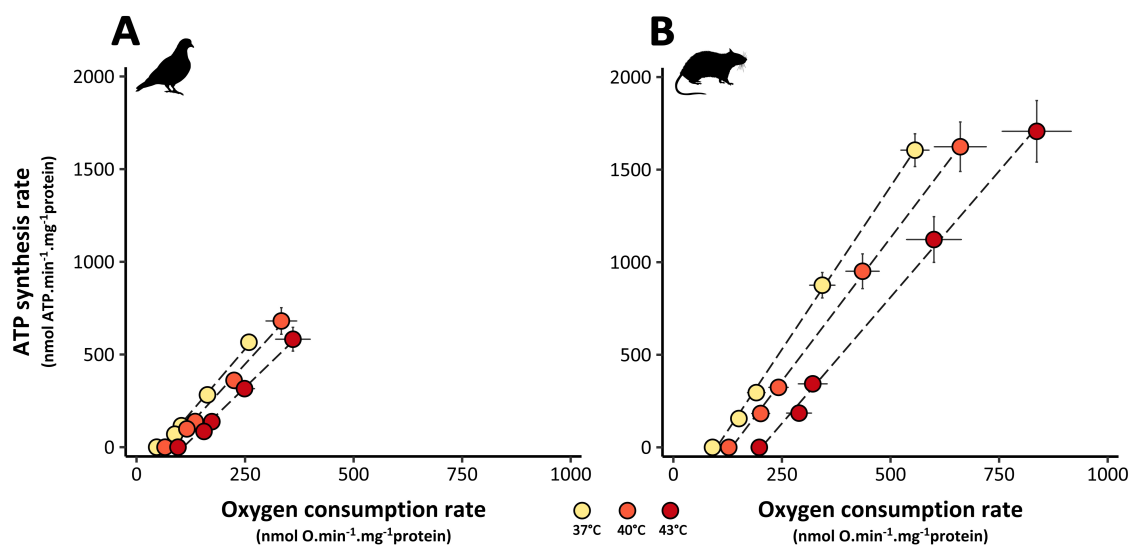


Figure 1. Effect of muscular temperature on mitochondrial oxidative phosphorylation activity. The linear relationships between ATP synthesis and oxygen consumption in skeletal muscle-isolated mitochondria are represented for pigeons (A, $n=8$) and for rats (B, $n=8$). For each of the linear relationships, steady states of phosphorylation were initiated by adding different amounts of ADP (5, 10, 20, 100, and 500 μM). Mitochondrial oxidative phosphorylation was determined in the presence of 5mM pyruvate, 2.5mM malate, and 5mM succinate at 37°C, 40°C, and 43°C. Values are mean $\pm$ s.e.m.

Thus, the linear relationships are shifted to the right in response to an increase in oxygen consumption rates with temperature, but the slopes associated with the linear relationships are different from each other (Pigeon : $\chi^2 = 48.40$, $df = 2$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.24$, 95% CI [0.00, 1.00]; Rat: $\chi^2 = 18.28$, $df = 2$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.35$, 95% CI [0.00, 1.00]) and indicate a

different stoichiometry of the mitochondrial respiratory chain when the temperature increases from 37°C to 43°C, in pigeon (Fig1.A) and rat (Fig1.B). A significant difference between the two species was found for the oxygen consumption rates and ATP synthesis rates. Regardless of temperature, rat mitochondria consumed about 2 times more mitochondrial oxygen (Active respiration: $\chi^2 = 83.87$, $df = 5$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.78$, 95% CI [0.61, 1.00]; Basal respiration: $\chi^2 = 260.41$, $df = 5$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.92$, 95% CI [0.85, 1.00]) and synthesized about 2.5 times more ATP ($\chi^2 = 78.04$, $df = 1$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.85$, 95% CI [0.69, 1.00]) than pigeon mitochondria.

Mitochondrial coupling efficiency

The effective ATP/O ratio is described as the oxygen atoms consumed to produce a certain amount of ATP. Regardless of temperature, it appears that mitochondrial coupling efficiency increases (non-linearly) with metabolic intensities and displays similar patterns in pigeons and rats (Fig. 2). Indeed, the higher the metabolic activity of the mitochondria, the greater the coupling efficiency until a maximum coupling efficiency is reached. In addition, the difference in mitochondrial coupling efficiency between the two species was dependent on the metabolic intensity but also on the temperature considered.

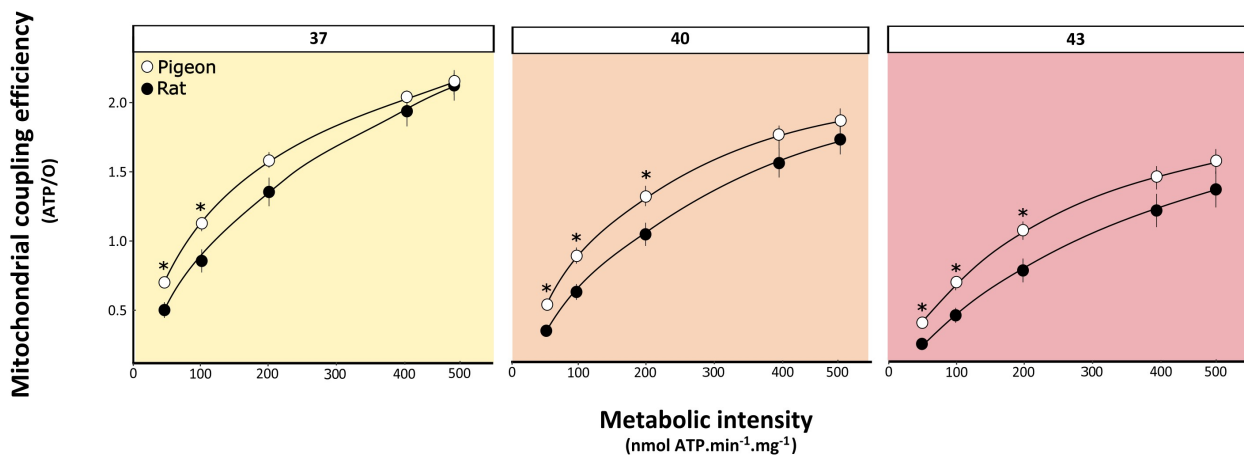


Figure 2. Non-linear relationships between mitochondrial coupling efficiency (ATP/O ratio) and the rate of ATP synthesis fixed representing the metabolic intensity, in skeletal muscle isolated mitochondria from pigeons (n=8, white circles) and from rats (n=8, black circles). Mitochondrial coupling efficiency was determined for different ATP synthesis rates common to both species, at 37°C, 40°C and 43°C. Values are mean $\pm$ s.e.m. * $p < 0.05$, significantly different from rats within the same metabolic level.

For a given amount of ATP synthesized, pigeon isolated mitochondria showed a higher ATP/O ratio than rat isolated mitochondria at 40°C ($\chi^2 = 4.21$, $df = 1$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.23$, 95% CI [0.00, 1.00]) and 43°C ($\chi^2 = 4.32$, $df = 1$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.24$, 95% CI [0.00, 1.00]) for the 3 lowest metabolic activities (50, 100 and 200 nmol ATP.min⁻¹.mg⁻¹protein) whereas at 37°C the ATP/O ratio of pigeon mitochondria was significantly higher ($\chi^2 = 3400.9$, $df = 9$, $p < 0.001$ with $\eta^2 = 0.89$, 95% CI [0.84, 1.00]) than rat only for 50 and 100 nmol ATP.min⁻¹.mg⁻¹protein. Considering the effect of assay temperature, for both species, increasing temperature results in a decrease in the ATP/O ratio (Pigeon: $\chi^2 = 3193.7$, $df = 14$, $p < 0.001$; Rat: $\chi^2 = 2480.6$, $df = 14$, $p < 0.001$). Thus, for the lowest assay temperature, both species were more efficient and thrifter in mitochondrial oxygen consumption to produce a certain amount of ATP.

Effect of temperature on the Substrate Contribution Ratio and enzyme activities

The contribution of succinate to oxygen consumption was computed for the two species where increasing temperatures had no effect (Fig. 3). As a result, the substrate contribution ratio for succinate remained constant throughout all assay temperatures (Pigeon: $\chi^2 = 0.49$, $df = 2$, $p = 0.7823$ with $\eta^2 = 0.03$, 95% CI [0.00, 1.00]; Rat: $\chi^2 = 2.58$, $df = 2$, $p = 0.2753$ with $\eta^2 = 0.14$, 95% CI [0.00, 1.00]). For pigeon mitochondria, succinate contributed just under 50 % of mitochondrial respiration at any temperature. For rats, as in pigeons, the contribution of succinate to respiration also remained under 50% for all three temperatures, difference in the contribution of succinate to respiration compared with pigeons at 40°C and 43°C ($\chi^2 = 6.56$, $df = 1$, $p < 0.05$; with $\eta^2 = 0.31$, 95% CI [0.03, 1.00]).

Figure 4A illustrates the mitochondrial CS activity measured in mitochondria isolated from pigeon and rat skeletal muscle and shows no significant change with increasing temperature (Pigeon: $\chi^2 = 5.85$, $df = 2$, $p = 0.053$ with $\eta^2 = 0.02$, 95% CI [0.00, 1.00]; Rat: $\chi^2 = 0.91$, $df = 2$, $p = 0.632$ with $\eta^2 = 0.005$, 95% CI [0.00, 1.00]). However, at 40°C and 43°C, CS activity was found to be more than 2-fold higher in pigeon mitochondria than those of rats at this specific assay temperature ($\chi^2 = 6.30$, $df = 1$, $p < 0.05$; with $\eta^2 = 0.31$, 95% CI [0.03, 1.00]).

The increase in temperature had no influence on the activity of complex I but showed a higher activity of this complex in pigeons than in rats, at the two extremes of the assay temperatures (37 and 43°C, data not shown). In contrast, the activity of complex II was significantly affected

by increasing temperature, with similar effects in both species (data not shown). In rats, the increase in temperature led to a 21 % increase in complex II activity, whereas in pigeons, the effect of temperature was more substantial, with a 31 % increase in complex II activity.

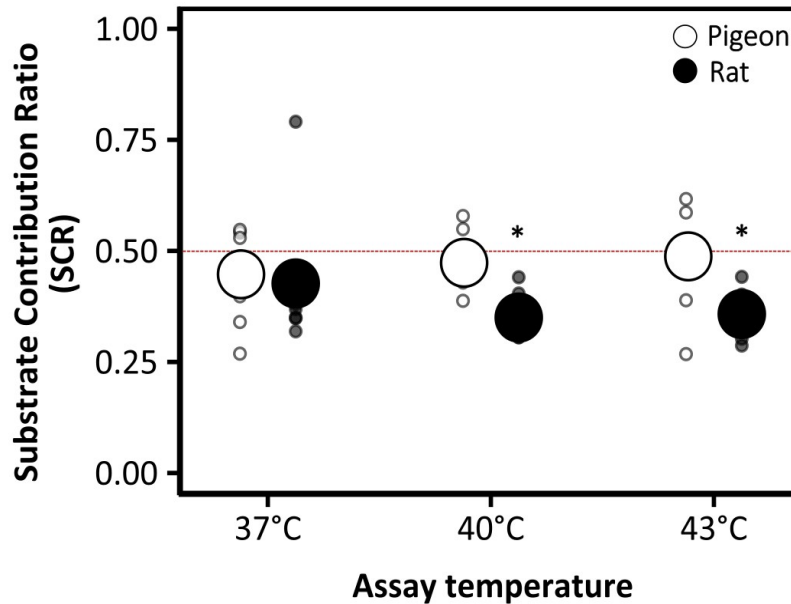


Figure 3. Substrate contribution ratio (SCR) for succinate calculated from oxygen consumption rates in skeletal muscle isolated mitochondria in pigeons ($n=7$, white circles) and rats ($n=6$, black circles). SCR for succinate were calculated as $SCR = (State\ 3_{PMS} - State\ 3_{PM}) / State\ 3_{PMS}$ where State 3 PM represents the oxygen consumption rate before the injection of succinate and State 3PMS represents the oxygen consumption rate after the succinate injection. Values are mean $\pm$ s.e.m. * $p < 0.05$, significantly different from pigeon within the same assay temperature.

Consequently, the CI/CII ratio was also determined in both species and showed a general pattern to decrease in both species with increasing temperature (Pigeon: $\chi^2 = 7.22$, $df = 2$, $p = 0.053$ with $\eta^2 = 0.17$, 95% CI [0.00, 1.00]; Rat: $\chi^2 = 6.97$, $df = 2$, $p < 0.05$ with $\eta^2 = 0.19$, 95% CI [0.00, 1.00]; Fig 4B). In addition, for each of the assay temperatures, the CI/CII ratio was significantly higher in pigeon mitochondria than in rats, suggesting that complex I contributes more to the electron transport in pigeons ($\chi^2 = 21.34$, $df = 1$, $p < 0.001$; with $\eta^2 = 0.60$, 95% CI [0.03, 1.00]).

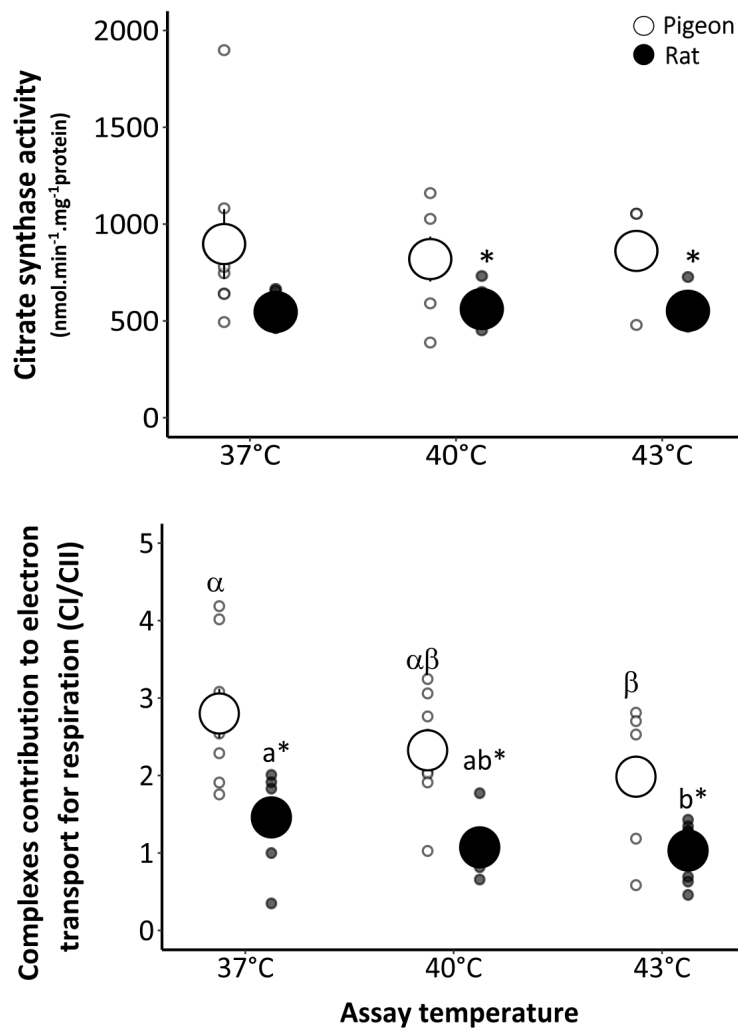


Figure 4. Dependence of temperature of the mitochondrial oxidative enzyme activities. A) Mitochondrial citrate synthase activity was measured in skeletal muscle mitochondria for pigeons (n=8) and rats (n=8). B) The CI/CII ratio was measured by dividing the activity of complex I to the activity of complex II. The mitochondrial enzyme activities were determined at 37°C, 40°C, and 43°C spectrophotometrically followed a specific protocol presented in the Materials and Methods section. Values are mean ± s.e.m. Different lower-case letters denote significant differences ($p < 0.05$) within the same species. * $p < 0.05$, significantly different from pigeons within the same assay temperature.

Discussion

The aim of this study was to evaluate and compare the flexibility of muscle mitochondrial coupling efficiency for the pigeon-rat pair at different physiological temperatures imitating, *in vitro*, clade-specific resting muscle temperature (37 or 40°C) up to the temperature rise during muscle contraction induced by locomotor activities (43°C) and using a common respiratory substrate allowing the identical electron delivery to the mitochondrial respiratory chain.

The present study shows that increasing the temperature of isolated mitochondria from the skeletal muscle of pigeons and rats induced an increase in the oxygen consumption in both species. These results are in accordance with the acute effect of temperature on the mitochondrial respiration reported in endothermic species (Brown et al., 2007; 2012; Monternier et al., 2014; Jarmuszkiewicz et al., 2015; Zoladz et al., 2016; Barbe et al., 2023). Regarding the effect of temperature on ATP synthesis, there was no effect of increasing temperature, in our study. Indeed, high temperatures also decrease the mitochondrial coupling efficiency (ATP/O) in both species. This result indicates that the effect of increasing temperature on oxygen consumption but not in ATP synthesis, is associated with an energy cost mediated by a loss of efficiency. These results indicate that the mitochondrial energy transduction system must consume more oxygen to oxidize more substrates to sustain the production of a given amount of ATP in rat and pigeon mitochondria. The negative impact of temperature on mitochondrial coupling efficiency is likely explained by a thermal effect on the fluidity of the inner membrane and a subsequent increase in proton permeability at high temperatures (Brown et al., 2007, 2012; Monternier et al., 2014; Jarmuszkiewicz et al., 2015; Zoladz et al., 2016). Regardless of the assay temperature, mitochondrial coupling efficiency (ATP/O ratio) was also found to be dependent on metabolic intensities in rat and pigeon isolated mitochondria. Our results show that mitochondrial efficiency is positively correlated with metabolic intensity. In other words, the greater the metabolic intensity of the mitochondria, the more efficient the mitochondrial coupling. The transition from lower metabolic intensity (low ATP demand) to higher metabolic intensity (high ATP demand) is accompanied by an increase in oxygen consumption and ATP synthesis, as well as a decrease in proton leakage. Because of the decrease in proton leakage, mitochondrial efficiency is improved during the increase in mitochondrial activity (Brand et al., 1994; Boël et al., 2019; Koch et al., 2021; Barbe et al., 2023; Boël et al., 2023).

In birds, resting body temperature differs by more than 2 degrees on average (McNab, 1966; Prinzinger et al., 1991). This is not the only metabolic difference between the two clades: for the same body mass, metabolic rates and longevity are higher in birds than in mammals (Barja et al., 1994; White et al., 2006; Hulbert et al., 2007). The higher metabolic rate of birds compared with mammals of the same body mass suggested that pigeons have a higher mitochondrial oxygen consumption than rats and that this, combined with a higher body temperature, would result in a lower mitochondrial coupling efficiency in birds. However, our

results show the reverse, namely that rats consume 2 times more oxygen at both, the basal non phosphorylating respiration and phosphorylating respiration, synthesising 2.5 times more ATP at any assay temperatures. These results are surprising in the light of the existing literature on bird/mammal comparative studies, most of which show higher oxygen consumption in pigeons than in rats (Rasmussen et al., 2004; Montgomery et al., 2011; Kuzmiak et al., 2012). These disparate results can possibly be attributed to the distinct protocols for mitochondrial respiration with differences concerning, for example, the tissue studied, the type of respiratory substrate and the imputation of a body mass effect. Thus, the rat's mitochondrial efficiency decreases and to synthesise the same amount of ATP as the pigeon, it must consume more oxygen. However, the difference in mitochondrial efficiency between the two species is only true for the lowest metabolic intensities, regardless of the assay temperature. For high metabolic activities, i.e., when ATP demand is high, rat mitochondria seem to reach a maximum mitochondrial efficiency plateau (Boël et al., 2019), which is the same as in pigeons. Only at 40 and 43°C is the difference in the ATP/O ratio attributed to a higher level of metabolic activity, probably due to the greater sensitivity of rat mitochondria to temperature increases (Barbe et al., 2023). The entry of electrons via complex I (Pyruvate, NADH) or complex II (Succinate, FADH₂) is important because the sequential transport of electrons by these two complexes does not have the same stoichiometry (Brand, 2005a). For example, the complete chain from NADH to oxygen allows the passage of 10 protons per oxygen atom consumed (10H⁺ /O), compared with (6H⁺ /O) for succinate. In this study, the combination of substrates (pyruvate/malate/succinate) was chosen to generate a convergent electron flow at the coenzyme-Q junction of the respiratory chain (Gnaiger, 2009). However, the greater oxidative activity of pigeon mitochondria, via citrate synthase activity and a greater contribution and activity of complex I at any temperature, may be the reason why avian mitochondria are more efficient than mammalian mitochondria.

In conclusion, our results showed that in both species oxygen consumption, mitochondrial coupling efficiency, and oxidase activities of the mitochondrial respiratory chain complexes were strongly impacted by increasing temperature. Unexpectedly, pigeon mitochondria appeared to be as or more efficient than rats for any temperature and at lower metabolic activities. This supports the paradoxical feature of birds and raises questions about oxidative stress associated with the use of different respiratory substrates. It would indeed, be worthwhile to link mitochondrial respiration, ATP supply and mitochondrial energy demand

with the generation of ROS at different temperatures, which together or separately could have an impact on the efficiency and energy transduction, and thus on metabolic performances in birds and mammals.

References

- Angilletta, M. J.** (2009). *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*. OUP Oxford.
- Barbe, J., Roussel, D. and Voituron, Y.** (2023). Effect of physiological hyperthermia on mitochondrial fuel selection in skeletal muscle of birds and mammals. *Journal of Thermal Biology* **117**, 103719.
- Barja, G., Cadenas, S., Rojas, C., Pérez-Campo, R. and López-Torres, M.** (1994). Low Mitochondrial Free Radical Production Per Unit O₂ Consumption Can Explain the Simultaneous Presence of High Longevity and High Aerobic Metabolic Rate in Birds. *Free Radical Research* **21**, 317–327.
- Bennett, A. F. and Ruben, J. A.** (1979). Endothermy and Activity in Vertebrates. *Science* **206**, 649–654.
- Ben-Shachar, M., Lüdtke, D. and Makowski, D.** (2020). effectsize: Estimation of Effect Size Indices and Standardized Parameters. *JOSS* **5**, 2815.
- Boël, M., Romestaing, C., Voituron, Y. and Roussel, D.** (2019). Allometry of mitochondrial efficiency is set by metabolic intensity. *Proceedings of the Royal Society B* **286**, 20191693.
- Boël, M., Voituron, Y. and Roussel, D.** (2023). Body mass dependence of oxidative phosphorylation efficiency in liver mitochondria from mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **284**, 111490.
- Brand, M. D.** (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology* **35**, 811–820.
- Brand, M. D.** (2005). The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochemical Society Transactions* **33**, 897–904.
- Brand, M. D., Chien, L.-F., Ainscow, E. K., Rolfe, D. F. S. and Porter, R. K.** (1994). The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1187**, 132–139.
- Brooks, G., Hittelman, K., Faulkner, J. and Beyer, R.** (1971). Temperature, skeletal muscle mitochondrial functions, and oxygen debt. *American Journal of Physiology-Legacy Content* **220**, 1053–1059.
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M. and West, G. B.** (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* **85**, 1771–1789.

- Brown, J. C. L., Gerson, A. R. and Staples, J. F.** (2007). Mitochondrial metabolism during daily torpor in the dwarf Siberian hamster: role of active regulated changes and passive thermal effects. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **293**, R1833–R1845.
- Clarke, A.** (2006). Temperature and the metabolic theory of ecology. *Functional Ecology* **20**, 405–412.
- Clarke, A. and Pörtner, H.-O.** (2010). Temperature, metabolic power and the evolution of endothermy. *Biological Reviews* **85**, 703–727.
- Cohen, J.** (2013). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Academic Press.
- Geiser, F.** (1988). Reduction of metabolism during hibernation and daily torpor in mammals and birds: temperature effect or physiological inhibition? *J Comp Physiol B* **158**, 25–37.
- Geiser, F.** (2004). Metabolic Rate and Body Temperature Reduction During Hibernation and Daily Torpor. *Annual Review of Physiology* **66**, 239–274.
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M. and Charnov, E. L.** (2001). Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate. *Science* **293**, 2248–2251.
- Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., Charnov, E. L., West, G. B. and Brown, J. H.** (2006). Response to Clarke and Fraser: effects of temperature on metabolic rate. *Functional Ecology* **20**, 400–404.
- Gnaiger, E.** (2009). Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: New perspectives of mitochondrial physiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**, 1837–1845.
- Hedrick, M. S. and Hillman, S. S.** (2016). What drove the evolution of endothermy? *Journal of Experimental Biology* **219**, 300–301.
- Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R. and Buttemer, W. A.** (2007). Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiological Reviews* **87**, 1175–1213.
- Jackman, M. R. and Willis, W. T.** (1996). Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **270**, C673–C678.
- James, R. S.** (2013). A review of the thermal sensitivity of the mechanics of vertebrate skeletal muscle. *Journal of Comparative Physiology B* **183**, 723–733.
- Jarmuszkiewicz, W., Woyda-Ploszczyca, A., Koziel, A., Majerczak, J. and Zoladz, J. A.** (2015). Temperature controls oxidative phosphorylation and reactive oxygen species production through uncoupling in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* **83**, 12–20.

- Koch, R. E., Buchanan, K. L., Casagrande, S., Crino, O., Dowling, D. K., Hill, G. E., Hood, W. R., McKenzie, M., Mariette, M. M., Noble, D. W. A., et al.** (2021). Integrating Mitochondrial Aerobic Metabolism into Ecology and Evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **36**, 321–332.
- Koteja, P.** (2004). The Evolution of Concepts on the Evolution of Endothermy in Birds and Mammals. *Physiological and Biochemical Zoology* **77**, 1043–1050.
- Kuzmiak, S., Glancy, B., Sweazea, K. L. and Willis, W. T.** (2012). Mitochondrial function in sparrow pectoralis muscle. *Journal of Experimental Biology* **215**, 2039–2050.
- Lovegrove, B. G.** (2017). A phenology of the evolution of endothermy in birds and mammals. *Biological Reviews* **92**, 1213–1240.
- Mckechnie, A. E. and Lovegrove, B. G.** (2002). Avian facultative hypothermic response: A review. *The Condor* **104**, 705–724.
- McNab, B. K.** (1966). An Analysis of the Body Temperatures of Birds. *The Condor* **68**, 47–55.
- Monternier, P.-A., Marmillot, V., Rouanet, J.-L. and Roussel, D.** (2014). Mitochondrial phenotypic flexibility enhances energy savings during winter fast in king penguin chicks. *Journal of Experimental Biology* **217**, 2691–2697.
- Montgomery, M. K., Hulbert, A. J. and Buttemer, W. A.** (2011). The Long Life of Birds: The Rat-Pigeon Comparison Revisited. *PLoS ONE* **6**, e24138.
- Mozo, J., Emre, Y., Bouillaud, F., Ricquier, D. and Criscuolo, F.** (2005). Thermoregulation: What Role for UCPs in Mammals and Birds? *Bioscience Reports* **25**, 227–249.
- Nakagawa, S. and Cuthill, I. C.** (2007). Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biological Reviews* **82**, 591–605.
- Prinzinger, P., Prebmar, A. and Schleucher, E.** (1991). Body temperature in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **4**, 499–506.
- Ranatunga, K.** (1998). Temperature dependence of mechanical power output in mammalian (rat) skeletal muscle. *Experimental Physiology* **83**, 371–376.
- Rasmussen, U. F., Vielwerth, S. E. and Rasmussen, H. N.** (2004). Skeletal muscle bioenergetics: a comparative study of mitochondria isolated from pigeon pectoralis, rat soleus, rat biceps brachii, pig biceps femoris and human quadriceps. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **137**, 435–446.
- Refinetti, R.** (1999). Amplitude of the daily rhythm of body temperature in eleven mammalian species. *Journal of Thermal Biology* **24**, 477–481.
- Reynafarje, B., Costa, L. E. and Lehninger, A. L.** (1985). O₂ solubility in aqueous media determined by a kinetic method. *Analytical Biochemistry* **145**, 406–418.

Roussel, D. and Voituron, Y. (2020). Mitochondrial Costs of Being Hot: Effects of Acute Thermal Change on Liver Bioenergetics in Toads (*Bufo bufo*). *Frontiers in Physiology* **11**, 153.

Saltin, B., Gagge, A. P. and Stolwijk, J. A. (1968). Muscle temperature during submaximal exercise in man. *Journal of Applied Physiology* **25**, 679–688.

White, C. R., Phillips, N. F. and Seymour, R. S. (2006). The scaling and temperature dependence of vertebrate metabolism. *Biology Letters* **2**, 125–127.

Zoladz, J. A., Koziel, A., Woyda-Ploszczyca, A., Celichowski, J. and Jarmuszkiewicz, W. (2016). Endurance training increases the efficiency of rat skeletal muscle mitochondria. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **468**, 1709–1724.



DISCUSSION & PERSPECTIVES

I. RÉSULTATS PRINCIPAUX

Les principaux objectifs de cette thèse étaient d'explorer le fonctionnement mitochondrial et son efficacité de conversion énergétique chez les oiseaux, dans le but de le comparer à celui des mammifères. Par une approche comparative, il était question de comprendre en quoi les déterminants des propriétés biologiques des oiseaux et des mammifères : la masse corporelle, la température mais également la phylogénie influent sur le métabolisme énergétique mitochondrial et ainsi les performances individuelles (croissance, reproduction, survie...), les processus de vieillissement et la capacité de thermorégulation des endothermes.

1. Patterns allométriques mitochondriaux des oiseaux

Pour investiguer l'effet de la masse corporelle sur la bioénergétique mitochondriale des oiseaux, nous avons choisi de porter nos études sur différents tissus jouant un rôle significatif dans le métabolisme de base à savoir le muscle squelettique, le cœur, le foie. Nous avons également étudié un tissu particulier : le sang. Les résultats concernant l'investigation des patterns allométriques aviaires spécifiques aux **Articles 1, 2 et 3** de ma thèse sont regroupés dans la **Figure 1**. Les données montrent globalement un effet de la masse corporelle sur divers paramètres énergétiques mitochondriaux, nous permettant d'établir que chez les oiseaux, l'effet de la masse est conservé à travers toutes les échelles biologiques, avec cependant une dépendance aux tissus étudiés.

Dans le muscle squelettique de nos 14 espèces d'oiseaux, il a été montré que la consommation d'oxygène mitochondriale (par mg de protéine mitochondriale) est corrélée négativement avec la masse corporelle, tout comme au niveau de l'organisme entier (Kleiber, 1932, 1947 ; Gillooly et al., 2001 ; West et al., 2002 ; White et al., 2006, Hatton et al., 2019). Associée à une diminution de la masse corporelle, on observe également une augmentation de la synthèse d'ATP (par unité de masse). Les flux mitochondriaux sont donc plus puissants chez les petites espèces d'oiseaux que chez les grandes espèces (**Figure 1, Articles 1 et 3**). L'efficacité maximale (P/O) des mitochondries du muscle squelettique est en revanche indépendante de la masse corporelle. Ce

résultat indique qu'à puissance maximale, les mitochondries de toutes les espèces aviaires atteignent la même efficacité mitochondriale dans le muscle squelettique.

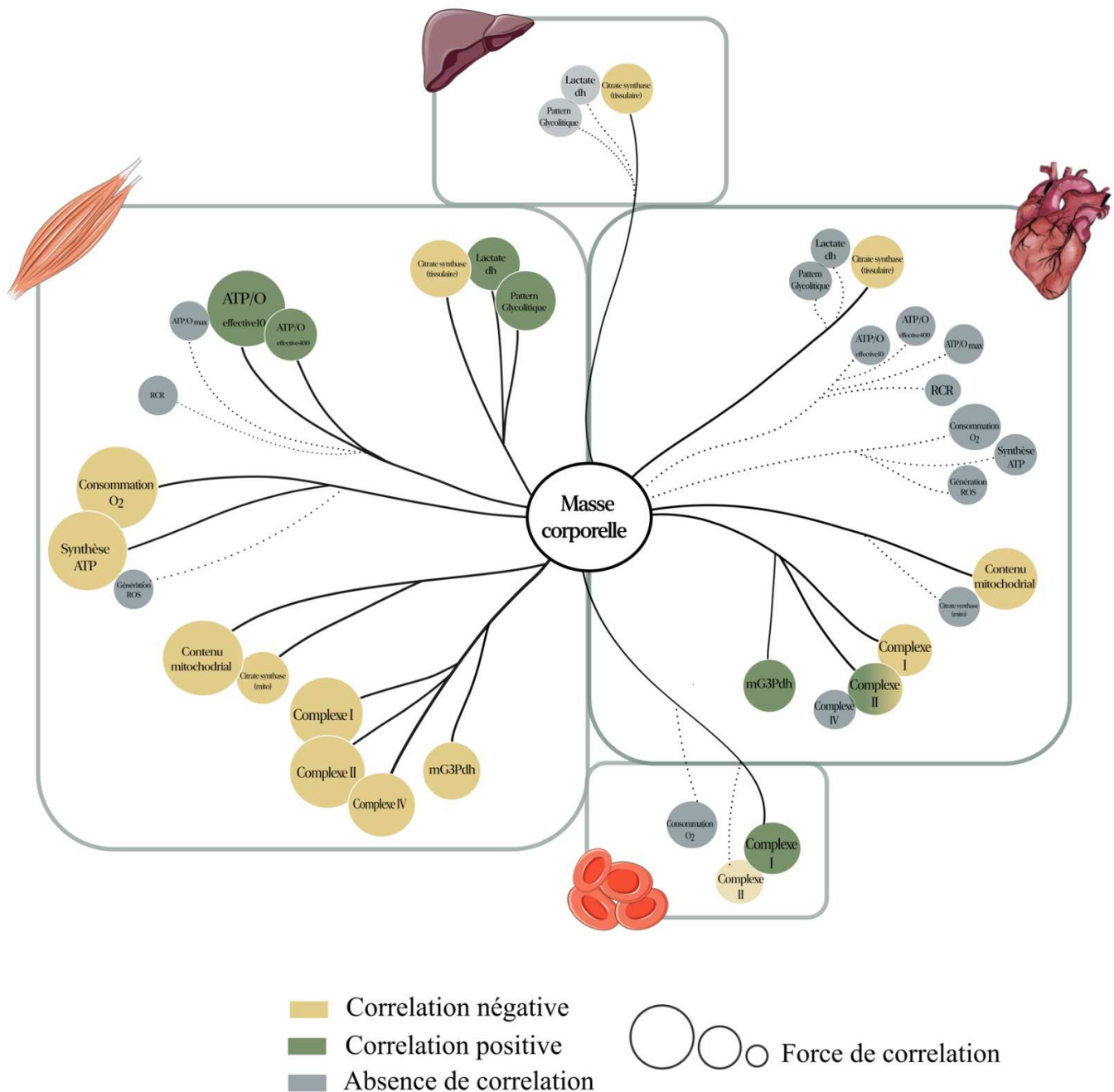


Figure 1 | Schéma récapitulatif de l'exploration des patterns allométriques mitochondriaux provenant du muscle squelettique, du cœur, du foie et du sang des oiseaux, présentés dans les articles 1, 2 et 3. Pour chaque tissu est représenté un réseau de « communication » ou de lien avec la masse corporelle et les différents paramètres bioénergétiques tissulaires et mitochondriaux. Les différentes couleurs s'identifient la nature de l'évolution (négative, positive ou absente) entre la masse corporelle et les paramètres mesurés. La grandeur des cercles renseigne sur la force de la corrélation (faible/forte) entre la masse corporelle et les paramètres mesurés.

En revanche, lorsque l'on regarde le fonctionnement mitochondrial à des intensités intermédiaires, il apparaît que l'efficacité effective du couplage mitochondriale ($ATP/O_{\text{effective}}$), est corrélée positivement avec la masse corporelle. Cette covariation positive, entre l'efficacité mitochondriale effective et la masse corporelle, est également dépendante de l'état énergétique mitochondrial : plus les mitochondries se rapprochent de leur état énergétique de repos (fuites de protons importantes) et plus l'exposant allométrique (b) est élevé.

Il apparaît aussi que les mitochondries des petits oiseaux sont plus flexibles dans leur couplage oxydation-phosphorylation, que celles des grandes espèces. L'ensemble de ces résultats sont semblables à ceux publiés dans une précédente étude mitochondriale mammalienne (Boël et al., 2019). De plus, en s'intéressant aux activités métaboliques tissulaires (CS, LDH) ainsi qu'aux activités des différents complexes protéiques de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Article 3**), il apparaît un effet de la masse corporelle sur ces différents paramètres. L'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme aérobie, comme la CS (enzyme clé du cycle de Krebs) et les complexes I, II et IV (cytochrome c oxydase) de chaîne respiratoire mitochondriale, diminuent avec la masse corporelle. En revanche, l'activité de la LDH, enzyme impliquée dans le métabolisme anaérobie, augmente avec la masse corporelle. Ainsi, la faible consommation d'oxygène chez les grandes espèces d'oiseaux, pourrait s'expliquer par une activité plus faible des enzymes oxydatives par rapport aux plus petites espèces, s'adaptant au rythme de la chaîne respiratoire.

2. L'effet de la masse corporelle est dépendant du tissu chez les oiseaux

Au contraire des organes de faible activités ou métaboliquement inertes (squelette, plumes, poils...), les organes métaboliquement actifs (muscles squelettiques, cœur, foie, reins et cerveau) sont des contributeurs majeurs dans le métabolisme de base, (Kozłowski et al., 2020). Chez les oiseaux et les mammifères le muscle squelettique est un déterminant important du taux métabolique basal, notamment dû à sa large proportion (45%) au sein des endothermes (Spargo et al., 1979 ; Rolfe et Brown, 1997). Par ailleurs, les organes viscéraux (cœur, rein, foie et intestin) ainsi que le cerveau, ne représentent que 5 à 8 % de la masse corporelle mais utilisent une quantité d'énergie disproportionnée puisqu'ils consomment ensemble, 59 % de l'énergie au

repos de l'animal (Konarzewski and Diamond, 1995 ; Rolfe et Brown, 1997 ; Kozłowski et al., 2020). Or, des études précédentes ont montré que les patrons allométriques métaboliques n'étaient pas toujours présents dans tous les tissus (Turner et al., 2005, 2006 ; Boël et al., 2023) alors qu'ils participent activement au métabolisme de base. Cela nous a amené à nous questionner sur l'existence et la conservation possible de patterns allométriques mitochondriaux dans d'autres tissus métaboliquement actifs, autres que le muscle squelettique.

Le muscle squelettique et le cœur étant deux tissus contractiles physiologiquement similaires, on s'attendait à trouver des modèles allométriques similaires dans les deux tissus. Ce ne fut finalement pas le cas puisque qu'au contraire du muscle squelettique, les mitochondries isolées provenant du tissu cardiaque, n'ont présenté aucune relation significative entre la masse corporelle que ce soit pour la consommation d'oxygène, la synthèse d'ATP, la génération de ROS mitochondriale ou encore l'efficacité de couplage mitochondriale ($ATP/O_{effective}$). Seuls, le contenu mitochondrial et certaines activités des complexes protéiques (complexe I, complexe II et mGPdh) de la chaîne respiratoire mitochondriale proposent une variation (négative ou positive) en fonction de la masse corporelle (**Figure 1 ; Articles 1 et 3**). On observe alors, au sein du même organisme, une perte de l'effet de la masse corporelle sur l'efficacité de la mitochondrie à produire de l'énergie dans le tissu cardiaque comparé à ce qui se passe dans le muscle squelettique. On imagine alors que cette différence de manifestation des patrons allométriques entre les deux tissus musculaires serait due à leurs rôles spécifiques dans l'organisme ainsi qu'à leur « gamme » de fonctionnement métabolique distincte. En effet, une caractéristique importante du muscle squelettique est son important potentiel à soutenir un large éventail d'activités et d'intensités métabolique : de l'activité basale (repos) à l'augmentation rapide du taux de demande et de consommation d'énergie pour assurer la fonction locomotrice par exemple (Westerblad et al., 2010). Le cœur lui, subit également des modulations et répond à des stimuli externes (rythmes circadiens, locomotion), mais peut difficilement être dans un état de repos total en raison de la nécessité de générer des contractions vitales régulières. Il travaille donc souvent à une intensité relativement constante et élevée pour assurer sa fonction indépendamment de la masse corporelle. Mais d'un autre côté, des relations allométriques cardiaques, relatives à la fréquence et au débit cardiaque, sont apparues dans diverses études

aviaires ce qui ne laissait pas présager d'une perte d'effet de la masse à plus petite échelle (Grubb, 1983; Bishop, 1997).

Dans le sang (**Article 2**) et dans le foie (**Article 3**), il n'a pas été possible de mesurer autant de paramètres bioénergétiques mitochondriaux que dans les tissus musculaires (muscle squelettique et cœur) mais les résultats liés à ces études apportent des données supplémentaires à l'**Article 1**, montrant que l'effet de la masse corporelle des oiseaux sur la bioénergétique mitochondriale, est fortement dépendant du tissu et que certains patterns allométriques mitochondriaux provenant d'un tissu type ne peuvent être généralisés à l'ensemble des autres tissus et ainsi à l'organisme entier.

II. COMPARAISON DES PATTERNS ALLOMÉTRIQUES OISEAUX / MAMMIFÈRES

Un des objectifs de cette thèse était d'établir si les différences métaboliques que l'on observe à l'échelle de l'organisme entre les oiseaux et les mammifères de même masse corporelle (taux métabolique, température et longévité), étaient en partie exprimées à plus petite échelle par des différences dans le fonctionnement et l'efficacité mitochondriale. Pour rappel, la recherche des effets de la masse corporelle sur ces derniers aspects énergétiques a été récemment menée sur les mammifères (Boël et al., 2019, Boël et al., 2023). Les données collectées concernant les mammifères (thèse de Mélanie Boël) et les oiseaux (présente thèse) nous permettent ainsi d'initier des analyses comparatives de bioénergétique entre ces deux clades. Les différentes relations allométriques retrouvées chez les oiseaux et les mammifères sont résumées et regroupées dans la **Figure 2**.

1. Universalité de l'évolution du fonctionnement mitochondrial chez les endothermes ?

Il est relativement bien établi que la masse corporelle influence l'ensemble des processus et des structures biologiques, de la dynamique populationnelle à l'échelle subcellulaire (Peter, 1983

; Calder, 1984 ; Schmidt-Nielsen 1984 ; Damuth, 1987 ; Hubert et al., 2002 ; Brand et al., 2003 ; Else et al., 2004 ; Helle et al., 2007 ; Turner et al., 2006 ; West et Brown, 2005 ; Chamberlin et Holland, 2009).

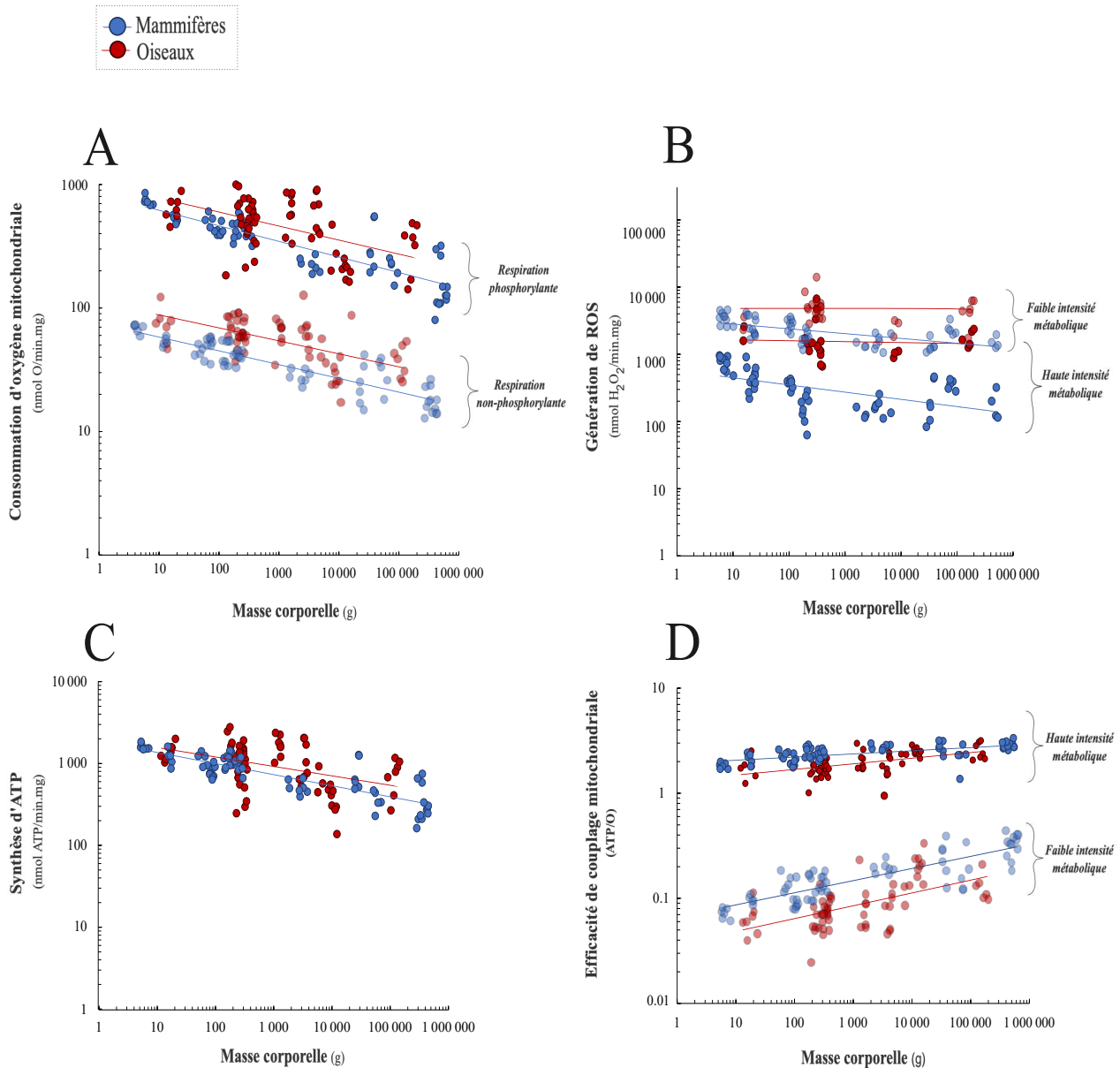


Figure 2 | Effet de la masse corporelle sur la bioénergétique mitochondriale du muscle squelettique des oiseaux (rouge) et des mammifères (bleu). Les données oiseaux sont issues de ma thèse et basées sur 11 espèces d'oiseaux soit 74 individus dont les masses corporelles allaient de 15 g (mandarin) à 160 kg (autruche). Les données mammifères sont issues de la thèse de Boël et al., 2019 ; Voituron et al., 2020 et basées sur 14 espèces mammaliennes soit 70 individus, dont les masses corporelles allaient de 5 g (souris pygmée Africaine) à 550 kg (bœuf). Les mesures de bioénergétiques ont été réalisées à 37°C pour les mammifères contre 40°C pour les espèces aviaires, avec comme substrat respiratoire commun un mélange de pyruvate/malate/succinate. Toutes les relations présentent dans les panels **A)** Consommation d'oxygène mitochondriale, **B)** Génération de ROS, **C)** Synthèse d'ATP et **D)** Efficacité de couplage mitochondriale, ont été linéarisées log-log.

De plus, l'ensemble des données de la thèse de Mélanie Boël sur les mammifères (Boël et al. 2019, Voituron et al., 2020 ; Boël et al, 2023) et de ma thèse, indiquent une certaine universalité de l'évolution du fonctionnement mitochondrial avec la masse corporelle, exprimant des stoechiométries qui restent tout de même très conservées au cours de l'évolution des endothermes. En effet, chez les oiseaux et les mammifères nous retrouvons des patterns allométriques mitochondriaux similaires dans le muscle squelettique. La consommation d'oxygène (**Figure 2A**) et la synthèse d'ATP (**Figure 2C**) sont corrélées négativement avec la masse corporelle. Les exposants allométriques spécifiques aux processus de respiration et de phosphorylation sont très similaires entre les oiseaux ($b : -0.126$ à -0.132 et les mammifères ($b : -0.124$ à -0.137).

L'efficacité de couplage mitochondriale effective ($ATP/O_{\text{effective}}$, c-à-d le nombre d'atome d'oxygène consommé menant spécifiquement à une certaine quantité de molécules d'ATP synthétisées) est corrélée positivement avec la masse corporelle (**Figure 2D**). Nous retrouvons alors un schéma commun d'efficacité mitochondriale à savoir que les grandes espèces d'oiseaux et de mammifères ont un système de conversion énergétique plus efficace que celui des plus petites espèces. Nous retrouvons également une caractéristique commune concernant la flexibilité de l'efficacité du couplage mitochondriale : la corrélation positive de l'efficacité mitochondriale avec la masse corporelle est dépendante de l'activité mitochondriale (ou intensité métabolique). Plus la mitochondrie est proche de son état de repos, plus la différence entre petites et grandes espèces s'accroît. Et de manière inverse, plus la mitochondrie est proche de son état métabolique maximal, moins la corrélation avec la masse corporelle est visible. On retrouve également des exposants allométriques similaires entre les oiseaux ($b : 0.054$ à 0.135) et les mammifères ($b : 0.038$ à 0.118). La raison de la flexibilité du couplage mitochondriale en fonction de l'activité métabolique des endothermes serait probablement due à une stratégie de maximisation des processus de thermorégulation chez les plus petites espèces. En effet, les animaux échangent de la chaleur à travers leur surface, principalement par les processus de radiation et de convection (Kleiber 1961 ; Calder 1984 ; McNab 2002). On utilise alors le rapport surface/volume qui régit le comportement de thermorégulation des organismes en fonction de leur taille (ou masse). Les espèces de grande taille ont un rapport surface/volume faible et sont

par conséquent plus isolants vis-à-vis des pertes de chaleurs (Speakman and Król, 2010), comparés aux espèces de petite taille dont le rapport surface/volume est désavantageux.

Chez les petites espèces d'oiseaux et de mammifères, la composition lipidique influence la fluidité des membranes via le degré de poly-insaturation (Porter et al., 1996 ; Hulbert et al., 2002a, 2002b ; Brand et al., 2003 ; Hulbert et al., 2007). En effet, chez les deux taxons, les phospholipides membranaires des petites espèces sont d'avantages polyinsaturés, notamment dû à une augmentation parallèle de la proportion en une chaîne d'acyl $n-3$ hautement polyinsaturée qui est l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 $n-3$). La conséquence chez les plus petites espèces est une augmentation de la fluidité des membranes mitochondriales associée à une plus grande conductance protonique (Porter et al., 1996 ; Brand et al., 2003). Comme la fuite de proton est maximale au repos, cette caractéristique de conductance membranaire pourrait expliquer pourquoi les mitochondries des petites espèces sont d'autant plus découplées (valeur ATP/O faible) que l'activité mitochondriale est faible. Cela expliquerait aussi la plus grande flexibilité dans le couplage mitochondrial, permettant aux mitochondries du tissu musculaire des petites espèces de produire davantage de chaleur au repos (faible ATP/O) tout en fournissant efficacement l'ATP nécessaire pour les performances maximales individuelles (fort ATP/O), comme la locomotion. En d'autres termes, les mitochondries musculaires seraient ainsi capables de réduire leur efficacité au repos afin de compenser les coûts énergétiques liés à la forte conductance thermique des petites espèces, et lors de performances intenses, d'augmenter leur efficacité afin de répondre aux besoins énergétiques accrus du tissu musculaire.

Alors que les flux d'oxygène et d'ATP semblent évoluer de la même manière chez les oiseaux et les mammifères, les relations spécifiques à la génération de ROS, ne semblent pas évoluer dans le même sens (**Figure 2B**). Chez les mammifères, en utilisant un mélange de pyruvate/malate/succinate, on observe une corrélation négative significative entre la masse corporelle et la génération de ROS, quelle que soit l'activité mitochondriale (b : -0.120 à l'état basal et b : -0.100 à l'état phosphorylant). En revanche, en utilisant seulement du pyruvate/malate comme substrat respiratoire, aucune corrélation significative n'est observée entre la masse corporelle et la génération de ROS (résultats non inclus). Ainsi, chez les mammifères, l'apparition d'une relation allométrique significative pour la génération de ROS semble dépendante du substrat utilisé et valable lorsque l'on génère un flux reverse des électrons

dans la chaîne respiratoire, grâce à l'apport de succinate. Alors que chez les oiseaux, aucune relation allométrique significative n'est observée. À noter que, chez les oiseaux, le nombre d'espèces et d'individus pour mesurer la génération de ROS (27 oiseaux de 6 espèces) est bien plus faible que celle des mammifères (63 mammifères de 10 espèces) mais également comparé aux mesures de la synthèse d'ATP et de consommation d'oxygène au sein du même clade (68 oiseaux de 11 espèces). Il se pourrait alors que les relations allométriques concernant la génération de ROS soient bien inexistantes chez les oiseaux ou alors que l'effort d'échantillonnage ait été insuffisant.

2. Réflexion autour des patterns allométriques chez les endothermes

Après avoir déterminé que l'effet de la masse corporelle sur la bioénergétique mitochondriale est commun (en termes de force d'évolution) chez les endothermes (à l'exception de la production de ROS), il s'agit à présent de déterminer comment se placent (graduellement) les différents flux mitochondriaux des oiseaux par rapport à ceux des mammifères et s'ils sont différents statistiquement. Cet objectif de thèse n'ayant pas pu aboutir complètement, je discuterais dans cette partie de la méthodologie envisagée ainsi que de certaines limitations à comparer directement les relations allométriques mitochondriales des mammifères (thèse de Mélanie Boël) avec celles des oiseaux (présente thèse). En observant la **Figure 2**, on remarque globalement une tendance aux flux mitochondriaux des oiseaux (ATP, O₂ et ROS) et à l'efficacité mitochondriale (ATP/O) à se trouver au-dessus et en dessous respectivement, de ceux des mammifères. Sont-ils pour autant distincts ? Peut-on alors supposer que les mammifères sont plus efficaces que les oiseaux ?

**** Quelle température de mesure utiliser pour comparer les espèces endothermiques ? ****

Les relations allométriques des endothermes, décrites dans la **Figure 2** n'ont pas été mesurées à la même température *in vitro*. Pour chacune des études, il a été choisi de mesurer les différents flux mitochondriaux à la température corporelle/physiologique du modèle d'étude. Chez les mammifères, la température corporelle moyenne est de 37°C contre 40°C chez les

oiseaux (McNab, 1966 ; Prinzinger, 1991). La température, d'une manière générale, a un effet sur la vitesse à laquelle les réactions biochimiques se produisent (Cossins et Bowler, 1987 ; Gillooly et al., 2001 ; Brown et al., 2004). Par ailleurs, les études découlant de ma thèse ont montré clairement que la température impactait les flux respiratoires des mitochondries isolées provenant de muscle squelettique d'une espèce d'oiseau (pigeon) et d'une espèce de mammifère (rat) (**Article 4**), et également l'efficacité du couplage mitochondriale (**Article 5**). De ce fait, nous avons également mesuré chez certaines de nos espèces d'oiseaux, les flux mitochondriaux à la température corporelle moyenne des mammifères à savoir 37°C. Les résultats (non inclus dans cette thèse) montrent qu'à 37°C les flux aviaires se superposent à ceux des mammifères et que l'efficacité du couplage mitochondriale des oiseaux est identique voir meilleure à celle des mammifères. Finalement en investiguant les patterns allométriques mitochondriaux chez les endothermes, on tente de limiter (mais sans éliminer), la dépendance du métabolisme à la température (Giancarli et al., 2023) puisque leur température corporelle diffère de quelques degrés. La question qui se pose alors est : comment comparer des relations entre les oiseaux et les mammifères en tenant compte de leur température corporelle ?

La littérature existante est quelque peu hésitante à ce sujet. La grande majorité prend le parti d'utiliser des températures communes entre espèces mammaliennes et aviaires, soit directement lors des mesures métaboliques (Münkemüller et al., 2012)(Pamplona et al., 1999 ; Portero-Otín et al., 2004 ; Kuzmiak et al., 2012) soit *a posteriori* en utilisant des Q_{10} (Rasmussen et al., 2004 ; White et al., 2006). Et alors que certaines de ces publications discutent même de la différence de température corporelle entre les oiseaux et les mammifères, la température commune à laquelle sont rapportées les mesures est en général celle de l'espèce mammalienne étudiée, soit 37°C. À ma connaissance, il existe finalement très peu d'étude prenant en compte la différence de température corporelle entre les deux clades pour réaliser leurs mesures (St-Pierre et al., 2002 ; Montgomery et al., 2010). Pour résumer, si l'on compare les relations, chacune correspondantes aux températures corporelles du modèle d'étude (37°C vs 40°C) on ne peut se détacher de l'impact de la température sur les réactions biochimiques, il serait alors normal d'avoir des flux plus importants pour des températures plus élevées (cas des oiseaux). Mais si l'on compare les relations à une température commune (37°C par exemple), est-ce bien pertinent d'un point de

vue biologique de mesurer les flux respiratoires mitochondriaux d'un oiseau dont la température n'ira que très rarement ⁸ en dessous de 40°C ?

Pour décortiquer plus finement l'effet de la température sur le fonctionnement mitochondriale des endothermes, nous avons procédé à un « zoom » sur nos relations allométriques en étudiant le couple pigeon-rat. En prenant ces deux espèces, nous nous affranchissons de l'effet de la masse corporelle pour nous concentrer sur l'effet de l'augmentation physiologique de la température musculaire lors des différentes activités métaboliques de l'animal (repos vs locomotion), associée à l'utilisation préférentielle de certains substrats respiratoires. Les résultats principaux des **Articles 4 et 5** montrent que l'augmentation de la température *in vitro* induit une augmentation des flux respiratoires et une baisse de l'efficacité mitochondriale chez les deux espèces (**Articles 4 et 5**). De plus, il a été constaté que l'augmentation de la température avait un effet délétère sur l'utilisation de substrat d'origine lipidique pour les mitochondries des rats au contraire des pigeons qui semblent adaptées à oxyder des substrats d'origine glucidique et lipidique à n'importe quelle température. Tout ceci apporte davantage de complexité aux études comparatives, car en plus de devoir déterminer à quelle température (commune ou non) les mesures doivent être faites, il faut également prendre en compte la préférence d'utilisation de carburant pour les deux clades. Une des découvertes étonnantes des études menant aux **Articles 4 et 5**, est que pour n'importe quelle température, la consommation d'oxygène (**Articles 4 et 5**) et la synthèse d'ATP (**Article 5**) des mitochondries isolées de rat étaient bien plus élevées que pour le pigeon, avec une efficacité mitochondriale en plus importante chez les pigeons. Même en prenant les flux d'oxygène et d'ATP à 40°C contre 37°C pour les rats, les pigeons présentent des flux mitochondriaux environs 2 fois plus faibles par rapport aux rats alors que les relations globales allométriques oiseaux/mammifères (**Figure 2**) montrent des flux mitochondriaux plus élevés chez les oiseaux que chez les mammifères.

Cependant, si l'on intègre nos rats (*Rattus norvegicus* de souche Wistar ; $n=8$; 276 ± 29 g) à la relation allométrique des mammifères (même protocole de mesure mitochondriale, à 37°C) on observe qu'ils présentent une consommation d'oxygène à l'état phosphorylant ainsi qu'une

⁸ Étant cependant le cas pour certaines familles spécifiques (*Struthioniformes*, *Casuariiformes*, *Apterygiformes*, *Procellariiformes*, et certains *Apodiformes*) mais également lors de certaines conditions environnementales imposant une diminution du métabolisme (hibernation, torpeur).

synthèse d'ATP relativement plus élevées qu'un mammifère de masse corporelle équivalente (Hamster Européen et Rat noir sauvage). À l'inverse, le pool de pigeons issus des études Pigeon/Rat, présente des flux mitochondriaux tout à fait similaires au pool de pigeons utilisés pour l'étude allométrique et s'intègrent parfaitement au pattern allométrique des oiseaux. On aurait donc un rat avec des flux plus élevés que ce que le pattern allométrique prédit empiriquement chez les mammifères et qui amènerait à exacerber la différence entre nos rats de laboratoire et nos pigeons sauvages. Il n'en reste pas moins que le rat présente des flux mitochondriaux plus élevés que les pigeons à n'importe quelle température même si cela ne suit pas le schéma traditionnel mitochondrial établi globalement entre les deux clades. Ainsi, en prenant seulement un couple oiseau /mammifère on reconnaît la difficulté à généraliser les résultats de ce couple à l'ensemble des oiseaux et des mammifères. Cela nous permet cependant d'investiguer plus finement l'effet de certains facteurs : la sensibilité à l'augmentation de la température en condition physiologique (**Articles 4 et 5**), l'impact de l'intensité métabolique (**Article 5**) et la nature du substrat respiratoire mitochondriale (**Article 4**), en écartant l'effet de la masse corporelle.

**** Différence de taux évolutif entre les oiseaux et les mammifères ? ****

Chez les oiseaux et les mammifères, l'évolution de la taille et masse corporelle est principalement déterminée par le climat passé (Clavel et Morlon, 2017), avec des taux évolutifs plus élevés pendant les périodes de climat froid que dans des périodes de climat chaud. Il a donc été suggéré que la température influencerait les taux évolutifs en modifiant les pressions de sélection plutôt que par son effet sur la disponibilité de l'énergie et du métabolisme. Donc l'effet du climat sur l'évolution de la taille/masse corporelle semble être une caractéristique générale de l'évolution des endothermes. Seulement, les oiseaux présentent une hétérogénéité plus importante que les mammifères, sur le plan d'évolution des traits phénotypiques et notamment sur les taux évolutifs de la taille/masse corporelle (Clavel et Morlon, 2017). Il semblerait que les vitesses, les taux évolutifs de la masse corporelle, soient un peu plus rapides chez les mammifères que chez les oiseaux au cours du cénozoïque (dernière ère géologique). Cette variabilité des taux, nous oblige donc à nous demander sur quels arbres on doit se baser pour la comparaison

oiseaux/mammifères (probablement pas morphologique, bien que plus facile à mesurer et à retracer) ? Le fait que les taux évolutifs de la masse corporelle ne soient pas tout à fait les mêmes entre les oiseaux et les mammifères entraîne une difficulté supplémentaire dans la comparaison de leurs patterns allométriques mitochondriaux.

3. Limites à l'étude allométrique aviaire

**** Signal phylogénétique comme élément perturbateur dans les relations allométriques ? ****

Un objectif classique des analyses comparatives phylogénétiques, est de mesurer un trait (ici mitochondrial) sur un ensemble d'espèce (ici oiseaux et mammifères) et de déterminer à quel point celui-ci est héritable. Autrement dit, quelle est la part de la variation du trait qui est expliquée par la phylogénie ? C'est ce que l'on nomme plus communément le **signal phylogénétique**⁹ ou encore la mesure de l'**héritabilité phylogénétique** (h^2) avec une mesure comprise entre 0 et 1. Une valeur proche de 0 indique une indépendance phylogénétique et une valeur proche de 1 indique que les traits des espèces sont distribués comme prévu selon le modèle du mouvement brownien. Une valeur intermédiaire indique que, bien qu'il y ait un signal phylogénétique dans le caractère, celui-ci a évolué selon un processus autre que le mouvement brownien pur (Münkemüller et al., 2012) ; Kamilar et Cooper, 2013). Dans notre étude allométrique mitochondriale chez les oiseaux, nous avons obtenu une estimation de l'héritabilité (de Villemereuil, 2019) pour chacun des modèles construits. Le signal phylogénétique des différents paramètres mitochondriaux (consommation d'oxygène, synthèse d'ATP, génération de ROS, efficacité de couplage effective, activités enzymatiques...) par rapport à la masse corporelle s'est avéré supérieur à 0 et généralement à 0.50, représentant un signal phylogénétique relativement fort. Mais ce qui a été le plus étonnant a été de constater que la masse corporelle elle-même présentait un signal phylogénétique fort : $h^2 = 0.997$; ICs=0.995 à 0.999 concernant

⁹ *Tendance des espèces apparentées à se ressembler davantage que celles tirées au hasard dans un arbre phylogénétique (Blomberg et al., 2003)*

les 14 espèces aviaires collectées pour les **Articles 1** et **3** et $h^2 = 0.938$; ICs=0.628 à 0.998 concernant les 18 espèces aviaires collectées au parc des oiseaux pour l'**Article 2**. Cela laisse supposer deux choses :

La première est que la variation de la masse corporelle est largement expliquée par la phylogénie puisque le signal phylogénétique est très fort. En construisant ainsi nos modèles allométriques, les corrélations que l'on pense observer entre la variation de la masse corporelle et les paramètres mitochondriaux ne seraient qu'en réalité, des relations directes entre les espèces (la phylogénie) et ces mêmes paramètres mitochondriaux. Sans le vouloir, on induirait des phénomènes d'auto-corrélation entre les différents caractères. Les relations allométriques significatives quand elles existent, entre la masse corporelle et le paramètre mitochondrial étudié pourrait alors représenter un artéfact phylogénétique affectant la structure d'erreur des données (Garamszegi, 2014). Une des précautions que l'on peut prendre en analyses comparatives serait de considérer les relations allométriques observées en conjonction avec le signal phylogénétique spécifique aux paramètres étudiés.

Une deuxième observation est que l'échelle phylogénétique/taxonomique de l'analyse à son importance. En effet, les mesures du signal phylogénétique de tout trait biologique peuvent varier à différentes échelles phylogénétiques ou taxonomiques (Kamilar et Cooper, 2013). Par conséquent, un trait peut présenter des niveaux élevés de signal phylogénétique à un certain niveau, mais ce schéma peut s'estomper à des niveaux d'analyse plus élevés ou plus bas. Un des objectifs de l'étude allométrique aviaire était d'évaluer si ce que l'on observait au niveau du pattern musculaire se retrouvait au niveau du pattern érythrocytaire. Or les espèces aviaires sélectionnées pour les deux études présentaient un ensemble taxonomique différent. Pour rappel, le « pool d'oiseaux muscle » était composé de 85 oiseaux représentant 14 espèces, 9 familles et 8 ordres différents. Alors que le « pool d'oiseaux sang » était composé de 73 oiseaux de 18 espèces, 15 familles et 13 ordres. Le signal phylogénétique associé à la masse corporelle pour le premier pool s'est avéré effectivement plus important que pour le deuxième pool et l'effet de la masse corporelle des oiseaux sur la bioénergétique mitochondriale paraissent bien plus conservé lorsque l'on choisit des espèces très apparentées que lorsque le niveau taxonomique est plus élevé. D'où l'importance de réaliser en général les analyses comparatives sur un même ensemble d'oiseaux, ce qui n'a malheureusement pas été le cas dans notre étude allométrique aviaire inter-

tissus (néanmoins pour des raisons éthiques et techniques évidentes) et qui entraîne assurément une limite méthodologique à comparer les patterns allométriques musculaire et érythrocytaire.

*** *La masse corporelle des oiseaux, une variable biométrique aussi pertinente que pour les*

*mammifères ? ****



Il est 6h du matin, le 13 avril 2022, je me trouve au niveau des étangs de la Dombes à Versailleux (Ain, 01) avec un pisciculteur dont l'arrêté préfectoral pour la saison 2021-2022, lui autorise « la destruction d'oiseaux de l'espèce grand cormoran, *Phalacrocorax carbo sinensis*, sur les piscicultures extensives en étangs affiliées au syndicat des propriétaires et exploitants d'étangs de la Dombes ». Lorsque le pisciculteur m'amène les cormorans, je suis très étonnée de la taille de ces oiseaux. Ils ne pèsent que 2 kilos alors que l'un d'entre eux fait pratiquement la moitié de ma taille ... C'est à ce moment que je me demande si la masse corporelle des oiseaux est la variable biométrique la plus pertinente pour caractériser les oiseaux.

Crédits : Laetitia Detarvernier

De nombreuses personnes, qu'il s'agisse du grand public ou de biologistes, partent du principe que le squelette des oiseaux présente de nombreuses caractéristiques associées à la locomotion du vol le rendant « plus léger ». En effet, le squelette des oiseaux est « plus léger » par rapport à celui de leurs ancêtres (théropodes), permis par la réduction, la perte et la fusion progressive de nombreux éléments du squelette ainsi que par l'expansion des espaces pneumatiques à l'intérieur de certains os (Dumont, 2010; Feduccia, 2013; Gutherz and O'Connor, 2021). De plus, lorsque l'on compare un oiseau et un mammifère de masse corporelle similaire (par exemple le cormoran et le lapin dans notre étude allométrique), on pourrait supposer que l'oiseau, même avec les ailes repliées, présente une surface et un volume plus important que celui du mammifère. Cette différence n'en est que plus grande si les ailes des oiseaux sont déployées.

Cependant cette observation, subjective et dépendante des espèces (dont mon observation avec le grand cormoran), ne serait en réalité qu'une illusion pouvant être attribuée au fait que les oiseaux possèdent des voies respiratoires plus développées ainsi que des plumes pouvant engendrer un volume plus important (Dumont, 2010). Au vu de leur caractéristique pneumatique, on pourrait également penser que les os des oiseaux seraient plus fragiles, délicats et légers par rapport à ceux des mammifères. En réalité, plusieurs études ont montré que la masse du squelette aviaire contribue autant à la masse corporelle totale que celui des mammifères terrestres (Prange et al., 1979; Dumont, 2010; Martin-Silverstone et al., 2015) et que les os des oiseaux (et des mammifères volants) présentent une densité plus importante les rendant suffisamment solides pour résister aux forces rencontrées pendant le vol. Seulement, lorsque l'on mesure la masse corporelle totale d'un animal, cette mesure représente la somme de la masse associée au squelette (équivalente à la taille structurelle) mais également à ce qui n'est pas associé au squelette (réserve nutritive, masse des tissus mous par exemple) et la masse corporelle totale peut donc être amplement dépendante de la qualité de l'habitat, du style de vie et de vol, de la saison, de la période de reproduction, du statut nutritionnel (Piersma et Davidson, 1991). Tous ces facteurs menant à la variabilité et à la flexibilité de la masse corporelle nous poussent à nous demander si cette variable morphologique est idéale et suffisante pour évaluer le fonctionnement d'autres variables biologiques et physiologiques chez les oiseaux.

La masse corporelle a longtemps été le pilier de la recherche écologique et évolutive (Peter, 1983 ; Calder, 1984 ; Schmidt-Nielsen 1984 ; West et al., 2004, 2005 ; Hatton et al., 2019), mais elle fournit parfois des informations limitées sur l'écologie fonctionnelle animale. L'utilisation d'autres traits morphologiques pour expliquer les caractères fonctionnels (morpho, physio, comportementaux) aviaires arrivent finalement assez tard (années 2000) mais elle permettrait d'appréhender différemment les analyses comparatives phylogénétiques entre autres (Tobias et al., 2022). On construit ainsi de plus en plus de bases de données nous permettant d'avoir accès à de nombreuses variables morphologiques/biométriques et notamment sur les oiseaux ([AVONET](#), [Avibase](#) ou encore [AnimalTraits](#)).

Une limite méthodologique de ma thèse peut être effectivement l'utilisation de la masse corporelle comme seule variable morphologique. Heureusement, ces bases de données nous donnent accès à la masse corporelle, mais également à de nombreux autres traits

morphologiques spécifiques (longueur/largeur du bec, taille de la queue, de l'aile, du tarse, taille totale, l'envergure) ce qui nous permet de procéder à des tests préliminaires et évaluer les corrélations entre certains de ces paramètres morphologiques et les paramètres mitochondriaux mesurés chez nos espèces d'oiseaux. L'**envergure des ailes**, c'est-à-dire la distance entre la pointe et l'extrémité des plumes primaires les plus longues des ailes étendues (Liddy, 1990) pourrait constituer une autre variable morphologique plus informative, en particulier lorsqu'il s'agit d'étudier la bioénergétique des muscles de vol. À partir de ces bases de données, j'ai récupéré les envergures spécifiques à chacune des espèces d'oiseaux et généré des modèles bayésiens similaires à ceux présentés dans l'**Article 1**. Pour chacune des relations allométriques (consommation d'oxygène, synthèse d'ATP, efficacité mitochondriale ...), nous avons retrouvé les mêmes conclusions statistique et biologique que lorsque la masse corporelle était la variable morphologique. L'envergure est en fait particulièrement intéressante car même si elle présente une allométrie positive ($b^{1/3}$) par rapport à la masse corporelle (Nudds, 2007), elle présente aussi un signal phylogénétique plus faible (~ 0.64) que la masse corporelle elle-même (~ 0.99), ce qui diminue la dépendance phylogénétique de la variable morphologique. Par conséquent, l'envergure serait un paramètre supplémentaire et pertinent à prendre en compte dans les études allométriques des oiseaux, et qui pourrait fournir des informations complémentaires /plus explicatifs à la variation de certains paramètres énergétiques mitochondriaux.

III. PERSPECTIVES

1. *Explorer le petit pour trouver des liens de causalité*

Les relations retrouvées dans le muscle squelettique, des oiseaux et des mammifères, entre la masse corporelle et l'efficacité de couplage mitochondriale (ATP/O) révèlent un pattern général chez les endothermes : les grandes espèces présentent une meilleure efficacité mitochondriale que les plus petites espèces, et la flexibilité de l'efficacité dépend du niveau d'activation du métabolisme. Seulement, ces relations ne représentent que des liens de corrélations entre la masse corporelle et la bioénergétique mitochondriale des endothermes, sans vraiment savoir ce qu'il se passe au niveau moléculaire. Ainsi, pour établir des liens associatifs et

comprendre l'existence de ces patterns, il est nécessaire d'investiguer les **mécanismes moléculaires** sous-tendant la flexibilité mitochondriale musculaire chez les oiseaux et les mammifères.

Pour rappel, l'efficacité du couplage mitochondriale (effective) se définit comme : la capacité d'une mitochondrie à générer une certaine quantité d'ATP (fixe) par molécule d'oxygène consommée (rapport $\text{ATP}/\text{O}_{\text{effective}}$). Cette efficacité mitochondriale tient compte des différences de flux basaux entre les espèces. Elle peut être modifiée par tout phénomène capable d'impacter : (1) la force proton motrice par « découplage extrinsèque » : fuite de protons, perméabilité membranaire, génération de ROS... ou (2) en diminuant l'efficacité des pompes à protons de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexes I, III et IV), par « découplage intrinsèque », c'est à dire en diminuant la stœchiométrie H^+/e^- (Pietrobon et al., 1983; Brand et al., 1994; Brand, 2005a). Pour mieux appréhender l'efficacité du fonctionnement mitochondriale des endothermes, face à l'effet de la masse corporelle, il est alors nécessaire de s'intéresser aux découplages intrinsèques et extrinsèques de l'efficacité mitochondriale, en d'autres termes, ce qui se passent avant et après la dissipation du gradient électrochimique de protons.

a- Au niveau de la chaîne respiratoire

La **cytochrome c oxydase** (COX, complexe IV de la chaîne respiratoire), qui catalyse la réduction terminale de l'oxygène est composée de différentes sous-unités et isoformes. Le noyau catalytique est codé par trois gènes mitochondriaux (COX1, COX2 et COX3), et dont la sous-unité 3 semble jouer un rôle important dans le contrôle de la fonction de translocation des protons (Brunori et al., 1987; Scott, 2011). En effet, une caractéristique de la fonction catalytique de la COX est l'efficacité du pompage des protons, mesurée par le rapport entre les protons pompés et les électrons transférés (H^+/e^-). Ainsi, dans des conditions de faible énergie, il est avantageux pour les mitochondries de maximiser l'efficacité du pompage des protons (H^+/e^- élevé) afin de garantir une production efficace d'ATP. Inversement, dans des conditions de haute énergie, il serait avantageux d'avoir un H^+/e^- plus faible pour minimiser la production de ROS et la fuite de protons.

Chez les mammifères, il semblerait que l'expression des isoformes 1 et 2 de la sous-unité 4 de la cytochrome c oxydase (COX4) modifie l'affinité pour l'oxygène, à la suite de différents facteurs induits comme l'hypoxie et l'exercice (Desplanches et al., 2014). Les oiseaux, quant à eux, constituent des modèles exceptionnels pour étudier comment la bioénergétique cellulaire peut faire face à des situations physiologiques « extrêmes », lorsque le métabolisme élevé doit être maintenue face à des ressources environnementales se faisant rares. C'est le cas par exemple, des oies à tête barrée (*Anser indicus*) volant à plus de 9 000 mètres au-dessus de la chaîne de l'Himalaya (Scott et al., 2009), tout en maintenant des taux métaboliques élevés nécessaires au vol dans l'hypoxie sévère qu'impose ces altitudes. Chez cette espèce, la capacité exceptionnelle à voler haut est, entre autres, la conséquence d'une modification de la cinétique de la cytochrome c oxydase (COX), qui se traduit par une activité catalytique maximale plus faible et une affinité plus élevée pour le cytochrome c réduit. Contrairement aux mammifères, c'est la sous-unité 3 de la COX (COX3) qui serait la cause d'une interaction modifiée entre les différentes sous-unités de la COX, qui induirait un changement fonctionnel majeur (Scott, 2011). De plus, une étude menée par notre laboratoire (Roussel et al., 2018) a montré que de petites concentrations de cyanure, un inhibiteur de la COX, améliore le couplage mitochondrial dans les mitochondries isolées provenant du muscle squelettique de canard.

L'effet de la masse corporelle comme levier intrinsèque, pourrait tout comme certains leviers externes (hypoxie, froid, exercice...), entraîner des modifications fonctionnelles de la COX, affectant l'activité de pompage des protons et donc sa capacité à maintenir le gradient de protons à travers la membrane interne. Les données provenant du muscle squelettique des mammifères (Boël et al., 2023) et des oiseaux (présente thèse) ont montré que l'activité globale de la COX diminue avec la masse corporelle. Cependant, son activité et son fonctionnement semble faire intervenir différentes sous-unités de la COX chez les oiseaux et les mammifères (Little et al., 2010; Scott et al., 2011; Desplanches et al., 2014), ce qui pourrait amener à une différence dans le découplage intrinsèque de l'efficacité mitochondriale entre les deux clades. Il serait alors intéressant d'investiguer l'expression différentielle des sous-unités de la COX chez mes espèces d'oiseaux mais également pour les espèces mammaliennes. *Méthode envisagée : discrimination sur tissus congelés disponibles par Polymerase Chain Reaction (PCR).*

b- En aval de la chaîne respiratoire

Chez les oiseaux et les mammifères, la perméabilité des membranes mitochondriales diffère en fonction de la masse corporelle, résultant d'une augmentation du degré de poly-insaturation des phospholipides membranaires avec la diminution de la masse corporelle (Porter et al., 1996; Hulbert et al., 2002b; Hulbert et al., 2002a; Brand et al., 2003; Turner et al., 2005; Turner et al., 2006). Ce degré de poly-insaturation des phospholipides influence également, positivement, l'activité des protéines mitochondriales (Hulbert et al., 2007, Turner et al., 2005, 2006). En d'autres termes, les mitochondries contenant des membranes très poly-insaturées (petites espèces), auront une activité protéique membranaire associée importante. De ces protéines mitochondriales, il existe au moins deux transporteurs provoquant une certaine conductance protonique lorsqu'ils sont activés par des petites molécules (par exemple les acides gras) : l'Adénine Nucléotide Translocase (ANT) et les protéines découplantes (UCPs). Les deux systèmes fournissent un canal permettant aux protons de retourner dans la matrice mitochondriale sans être couplés à la synthèse d'ATP, libérant ainsi de l'énergie sous forme de chaleur et pouvant être à l'origine d'une diminution de l'efficacité mitochondriale (Clarke and Pörtner, 2010). À ma connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à l'évolution des quantités de ces deux protéines mitochondriales dans un contexte allométrique, ni chez les oiseaux, ni chez les mammifères. Il serait alors intéressant d'évaluer leur contenu au sein des membranes mitochondriales des endothermes.

L'ANT est un transporteur mitochondrial d'une grande importance physiologique puisqu'il va permettre, entre autres, la voie d'échange de l'ATP et de l'ADP (Brand, 2005b; Hulbert et al., 2006). L'ANT représente jusqu'à 10 % du total des protéines membranaires mitochondriales dans les tissus à haute demande d'énergie. De plus, une relation positive a été observée entre la fuite de protons et le contenu en ANT, qui semble contribuer à hauteur de 60 à 80 % de la conductance protonique basale (Brand, 2005). Nous supposons donc que l'ANT pourrait être impliqué dans la flexibilité de l'efficacité mitochondriale, notamment au repos, avec une teneur plus importante chez les petites espèces. *Méthodologie envisagée : évaluation du contenu mitochondrial en ANT sur échantillons congelés à partir de western blot.*

Les UCPs entraînent également une fuite de protons inductible à travers la membrane interne et sont représentées par différentes isoformes, retrouvées dans des tissus spécifiques.

L'UCP1, par exemple, est la protéine la plus abondante dans les mitochondries du tissu adipeux brun (BAT) des petits rongeurs et des humains nouveau-nés (Brand, 2005). Dans ce tissu, l'UCP1 contribue à la thermogénèse adaptative (sans frisson), en découplant l'oxydation phosphorylante et en dissipant le gradient mitochondrial transmembranaire de protons en chaleur (Brand, 2005b; Mozo et al., 2005; Parker et al., 2009). Dans le tissu musculaire des mammifères, on retrouve les homologues de l'UCP1 à savoir l'UCP2 et l'UCP3. Contrairement à l'UCP1, ces homologues ne participeraient pas à la thermogénèse adaptative mais plutôt à un contrôle dans la balance énergétique (Brand, 2005 ; Mozo et al., 2005). En effet, les UCPs 2 et 3 pourraient induire un léger découplage (à peine détectable en conditions physiologiques), ce qui diminuerait le potentiel de membrane mitochondriale et donc la production de ROS. Bien que les oiseaux ne possèdent pas de réserves de BAT ou de tissu thermogénique apparenté, ils utiliseraient le muscle squelettique pour la thermogénèse sans frisson (Duchamp et al., 1991; Duchamp and Barre, 1993). En effet, une protéine avUCP (avian uncoupling protrein) a été identifiée et s'est vue largement exprimée dans les muscles squelettiques des oiseaux (Raimbault et al., 2001; Vianna et al., 2001). Cette protéine partage 55 % d'acides aminées avec l'UCP1 et 70 % avec les UCP2 et UCP3 mammaliennes mais jouerait un rôle thermogène d'avantage similaire à celui de l'UCP1 (Talbot et al., 2004). Nous faisons donc l'hypothèse, que le contenu en UCPs soit plus important chez les petites espèces ayant une plus grande conductance protonique. Alors que la fuite de protons basale semble se produire par l'intermédiaire du système ANT, les UCPs elles, répondent à une variété de facteurs de stress et de régulateurs, y compris les ROS (Brand, 2000). Les patterns allométriques retrouvés dans cette thèse, entre la production de ROS et la masse corporelle montrent globalement une production de ROS plus importante chez les oiseaux. On peut alors imaginer que la teneur en UCPs sera plus importante chez les oiseaux comparés aux mammifères de même masse corporelle.

2. Voir plus grand, plus loin

Dans ce travail de thèse nous avons étudié l'effet top-down (descendant), des deux déterminants biologiques des organismes, que sont la masse corporelle et la température corporelle sur le métabolisme mitochondrial. Essayer de prendre le chemin inverse, par une approche Bottom-up, pourrait faire progresser notre compréhension des mécanismes qui sous-

tendent les processus écologiques et évolutifs clés, de la variation des traits d'histoire de vie à l'adaptation aux conditions thermiques changeantes.

La **Théorie Métabolique Écologique** (MTE) a été une des premières à tenter de prédire comment le métabolisme contrôlait les processus écologiques à tous les niveaux d'organisation : du niveau moléculaire au niveau de l'écosystème (West et al. 1997, 1999, Gillooly et al. 2001, 2002, Brown et al. 2004). Cependant cette théorie métabolique a été vivement critiquée (Dodds et al. 2001, White and Seymour 2003, 2005, O'connor et al., 2007), notamment pour le fait que l'on observe au sein de nombreux clades, des écarts d'exposants allométrique par rapport à la règle du $\frac{3}{4}$ proposée et sur laquelle se base la MTE. Le fait de retrouver des exposants allométriques mitochondriaux, loin de l'exposant $\frac{3}{4}$ mais également différents en fonction de l'intensité métabolique nous laisse penser que l'application de cette théorie, pour remonter à une échelle plus grande que cellulaire, est limitée.

Une autre théorie métabolique, prenant également comme point de départ l'énergétique de l'organisme est la **Dynamic Energy Budget** (DEB), proposée 20 ans plus tôt (Kooijman, 1986). La DEB représente un cadre théorique puissant qui permet de relier les processus sub-organiques (biochimiques, génétiques et physiologiques) aux performances de l'organisme et, par conséquent, aux populations, aux écosystèmes et à leur évolution temporelle (Kooijman, 2010 ; Nisbet et al., 2012). La DEB propose une vision de l'organisme compartimentalisé en structure et en réserves. Elle suppose également que, au sein d'une espèce, les divers processus énergétiques comme le taux d'absorption de nourriture, dépendent soit de la surface, soit du volume corporel. La DEB a ainsi pour but de modéliser la vitesse à laquelle l'organisme assimile et utilise l'énergie et la matière élémentaire des aliments pour son entretien, sa croissance, sa reproduction et son développement ou la maintenance des structures cellulaires.

Cependant, la plupart des paramètres de la DEB, tels que la fraction de l'énergie utilisée consacrée à la croissance et à l'entretien, ne peuvent pas être mesurés directement. Ce qui pose un problème, est que la plupart des processus du modèle conceptuel n'ont pas de relation directe avec des processus facilement mesurables (van der Meer, 2006). C'est le cas par exemple de la consommation d'oxygène. En effet, la consommation d'oxygène à l'échelle de l'organisme, représente non seulement les coûts de maintenance, mais également les frais généraux de croissance et de reproduction. Tout comme la consommation d'oxygène à l'échelle de la

mitochondrie qui peut être utilisée pour la synthèse d'ATP, la génération de ROS ou pour contrer la fuite de protons. Pour contrer ce problème, nous pourrions utiliser le rapport ATP/O, représentant l'efficacité de couplage mitochondriale, permettant de lier directement le rendement énergétique mitochondrial aux autres paramètres et ainsi simplifier la dynamique du modèle.

IV. CONCLUSION

En conclusion, les différents travaux effectués durant ma thèse montrent que l'effet de la masse corporelle sur la bioénergétique mitochondriale des oiseaux est dépendant des tissus. Au contraire des autres tissus étudiés tels que le cœur, le foie et le sang, seul le muscle squelettique présente des relations allométriques significatives entre la bioénergétique mitochondriale et la masse corporelle. Ainsi, dans le muscle squelettique, les grandes espèces aviaires présentent des flux mitochondriaux (consommation d'oxygène et synthèse d'ATP) plus élevés que les petites espèces, ce qui s'accompagne d'une diminution de l'efficacité mitochondriale chez ces mêmes petites espèces. Cette covariation positive, entre l'efficacité mitochondriale et la masse corporelle, est également flexible et dépendante de l'état énergétique mitochondrial : plus les mitochondries se rapprochent de leur état énergétique de repos (fuites de protons importantes), plus l'effet de la masse est important et plus l'exposant allométrique est élevé. Ces travaux de thèse ont également montré que les différents paramètres mitochondriaux chez les oiseaux évoluent selon un pattern similaire aux mammifères, entraînant alors un pattern allométrique mitochondrial général chez les endothermes. L'un des objectifs de ce travail de thèse était de comparer leur fonctionnement mitochondrial afin de comprendre les différences observées entre les oiseaux et les mammifères à l'échelle de l'organisme (taux métabolique, température et longévité). Cependant, les analyses comparatives chez les endothermes ont, avant tout, nécessité une étude approfondie du fonctionnement mitochondrial en prenant en compte les différences dans la régulation et le maintien de la température corporelle, ainsi que les préférences d'utilisation des substrats respiratoires mitochondriaux. Enfin, ces différentes exigences écologiques et physiologique imposées aux oiseaux et aux mammifères à différents niveaux d'intégration biologique, complexifie les analyses comparatives mais permettent de mieux appréhender

l'implication de la bioénergétique mitochondriale dans les mécanismes qui sous-tendent les processus écologiques et évolutifs clés des endothermes.

RÉFÉRENCES

A

Allen, J.A. (1877). The influence of physical conditions in the genesis of species. *Radical history review* **1**, 108–140.

Andreyev, A. Yu., Kushnareva, Yu. E. and Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry* **70**, 200–214.

Angilletta, M. J. (2009). *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*. OUP Oxford.

Araiso, Y., Imai, K. and Endo, T. (2022). Role of the TOM Complex in Protein Import into Mitochondria: Structural Views. *Annual Review of Biochemistry*. **91**, 679–703.

Arrhenius, S. (1889). Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für physikalische Chemie* **4**, 226–248.

B

Baldwin, J. W., Garcia-Porta, J., & Botero, C. A. (2023). Complementarity in Allen's and Bergmann's rules among birds. *Nature Communications*, **14**, 4240.

Barbe, J., Roussel, D. and Voituron, Y. (2023). Effect of physiological hyperthermia on mitochondrial fuel selection in skeletal muscle of birds and mammals. *Journal of Thermal Biology* **117**, 103719.

Barja, G. (2004). Free radicals and aging. *Trends in Neurosciences* **27**, 595–600.

Barja, G. (2007). Mitochondrial Oxygen Consumption and Reactive Oxygen Species Production are Independently Modulated: Implications for Aging Studies. *Rejuvenation Research* **10**, 215–224.

Barja, G., Cadenas, S., Rojas, C., Pérez-Campo, R. and López-Torres, M. (1994). Low Mitochondrial Free Radical Production Per Unit O₂ Consumption Can Explain the Simultaneous Presence of High Longevity and High Aerobic Metabolic Rate in Birds. *Free Radical Research* **21**, 317–327.

Bastide, P., Mariadassou, M. and Robin, S. (2022). Modèles d'évolution de caractères continus. In *Modèles et méthodes pour l'évolution biologique*, pp. 47–85. ISTE Group.

- Batchelder, P., Kinney, R. O., Demlow, L. and Lynch, C. B.** (1983). Effects of temperature and social interactions on huddling behavior in *Mus musculus*. *Physiology & Behavior* **31**, 97–102.
- Bay, D. C. and Court, D. A.** (2002). Origami in the outer membrane: the transmembrane arrangement of mitochondrial porins. *Biochemistry and Cell Biology* **80**, 551–562.
- Beaman, J., Ortiz-Barrientos, D., Monro, K., Hall, M. and White, C. R.** (2020). Metabolic scaling has diversified among species, despite an evolutionary constraint within species. *bioRxiv*.26.
- Becker, T. and Wagner, R.** (2018). Mitochondrial Outer Membrane Channels: Emerging Diversity in Transport Processes. *BioEssays* **40**, 1800013.
- Bejan, A.** (2000). Shape and structure, from engineering to nature. Cambridge university press.
- Bennett, A. F. and Ruben, J. A.** (1979). Endothermy and Activity in Vertebrates. *Science* **206**, 649–654.
- Ben-Shachar, M., Lüdtke, D. and Makowski, D.** (2020). effectsize: Estimation of Effect Size Indices and Standardized Parameters. *JOSS* **5**, 2815.
- Bertholet, A. M., Chouchani, E. T., Kazak, L., Angelin, A., Fedorenko, A., Long, J. Z., Vidoni, S., Garrity, R., Cho, J., Terada, N., et al.** (2019). H⁺ transport is an integral function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Nature* **571**, 515–520.
- Bergmann, C.** (1847). Über die Verhältnisse der Wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Grösse. *Gött. Studien*, **3**, 595–708.
- Betteridge, D. J.** (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* **49**, 3–8.
- Bhagavan, N. V.** (2002). Medical biochemistry. Academic press.
- Bird, M. J., Adant, I., Windmolders, P., Vander Elst, I., Felgueira, C., Altassan, R., Gruenert, S. C., Ghesquière, B., Witters, P., Cassiman, D., et al.** (2019). Oxygraphy Versus Enzymology for the Biochemical Diagnosis of Primary Mitochondrial Disease. *Metabolites* **9**, 220.
- Bishop, C. M.** (1997). Heart mass and the maximum cardiac output of birds and mammals: implications for estimating the maximum aerobic power input of flying animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **352**, 447–456.
- Bliek, A. M. van der, Shen, Q. and Kawajiri, S.** (2013). Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a011072.
- Block, B. A.** (1994). Thermogenesis in Muscle. *Annual Review of Physiology*. **56**, 535–577.
- Blomberg, S. P., Garland, T. and Ives, A. R.** (2003). Testing for Phylogenetic Signal in Comparative Data: Behavioral Traits Are More Labile. *Evolution* **57**, 717–745.
- Boël, M., Romestaing, C., Voituron, Y. and Roussel, D.** (2019). Allometry of mitochondrial efficiency is set by metabolic intensity. *Proceedings of the Royal Society B*: **286**, 20191693.

Boël, M., Voituron, Y. and Roussel, D. (2023). Body mass dependence of oxidative phosphorylation efficiency in liver mitochondria from mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **284**, 111490.

Boltzmann, L. (1872). Boltzmann equation. *Sitzungsber Akade Wissen*, **66**, 275-370.

Bottje, W., Iqbal, M., Tang, Z. X., Cawthon, D., Okimoto, R., Wing, T. and Cooper, M. (2002). Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. *Poultry Science* **81**, 546-555.

Bourguignon, A., Rameau, A., Toullec, G., Romestaing, C. and Roussel, D. (2017). Increased mitochondrial energy efficiency in skeletal muscle after long-term fasting: its relevance to animal performance. *Journal of Experimental Biology*. **220**, 2445-2451.

Brand, M. D. (1990). The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1018**, 128-133.

Brand, M. D. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology* **35**, 811-820

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

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

Brand, M. D. (2016). Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine* **100**, 14-31.

Brand, M. D., Chien, L.-F., Ainscow, E. K., Rolfe, D. F. S. and Porter, R. K. (1994). The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1187**, 132-139.

Brand, M. D., Turner, N., Ocloo, A., Else, P. L. and Hulbert, A. J. (2003). Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochemical Journal* **376**, 741-748.

Brand, M. D., Pakay, J. L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D. C., Brookes, P. S. and Cornwall, E. J. (2005). The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochemical Journal* **392**, 353-362.

Bratosin, D., Estaquier, J., Slomianny, C., Tissier, J.-P., Quatannens, B., Bulai, T., Mitrofan, L., Marinescu, A., Trandaburu, I., Ameisen, J.-C., et al. (2004). On the evolution of erythrocyte programmed cell death: apoptosis of *Rana esculenta* nucleated red blood cells involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Biochimie* **86**, 183-192.

Brody, S. (1945). *Bioenergetics and Growth: with Special Reference to the Efficiency Complex in Domestic Animals*. Reinhold, New York

Brooks, G., Hittelman, K., Faulkner, J. and Beyer, R. (1971). Temperature, skeletal muscle mitochondrial functions, and oxygen debt. *American Journal of Physiology-Legacy Content* **220**, 1053–1059.

Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M. and West, G. B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* **85**, 1771–1789.

Brown, J. C. L., Gerson, A. R. and Staples, J. F. (2007). Mitochondrial metabolism during daily torpor in the dwarf Siberian hamster: role of active regulated changes and passive thermal effects. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **293**, R1833–R1845.

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

Brunori, M., Antonini, G., Malatesta, F., Sarti, P. and Wilson, M. T. (1987). Cytochrome-c oxidase. *European Journal of Biochemistry* **169**, 1–8.

Bryk, A. H. and Wiśniewski, J. R. (2017). Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome. *J. Proteome Res.* **16**, 2752–2761.

C

Calder, W. A. (1984). *Size, Function, and Life History*. Courier Corporation.

Campbell, N., Reece, J., Faucher, J., Cain, M., Urry, L. Wasserman, S. (2012) *Biologie*. ERPI - Le Renouveau Pédagogique Editions. 12ème édition.

Chamberlain, S. A. and Holland, J. N. (2009). Body Size Predicts Degree in Ant-Plant Mutualistic Networks. *Functional Ecology* **23**, 196–202.

Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* **59**, 527–605.

Chinnery, P. F. and Schon, E. A. (2003). Mitochondria. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **74**, 1188–1199.

Clarke, A. (2006). Temperature and the metabolic theory of ecology. *Funct Ecology* **20**, 405–412.

Clarke, A. and Pörtner, H.-O. (2010). Temperature, metabolic power and the evolution of endothermy. *Biological Reviews* **85**, 703–727.

Clarke, A. and Rothery, P. (2008). Scaling of body temperature in mammals and birds. *Functional Ecology* **22**, 58–67.

Clavel, J., & Morlon, H. (2017). Accelerated body size evolution during cold climatic periods in the Cenozoic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, 4183-4188.

Cohen, J. (2013). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Academic Press.

Cossins, A. R., and Bowler, K. (1987), Thermal injury, thermal death and resistance adaptation, in *Temperature Biology of Animals*, Springer, Netherlands

Crompton, A. W. and Jenkins, F. A. (1973). Mammals from Reptiles: A Review of Mammalian Origins. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **1**, 131-155.

D

Damuth, J. (1987). Interspecific allometry of population density in mammals and other animals: the independence of body mass and population energy-use. *Biological Journal of the Linnean Society*, **31** 193-246.

Darveau, C.-A., Suarez, R. K., Andrews, R. D. and Hochachka, P. W. (2002). Allometric cascade as a unifying principle of body mass effects on metabolism. *Nature* **417**, 166-170.

Dawson, W. R. and Carey, C. (1976). Seasonal acclimatization to temperature in cardueline finches. *Journal of Comparative Biology* **112**, 312-333

de Villemereuil, P. (2019). On the relevance of Bayesian statistics and MCMC for animal models. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **136**, 339-340.

Delhaye, J., Salamin, N., Roulin, A., Criscuolo, F., Bize, P. and Christe, P. (2016). Interspecific correlation between red blood cell mitochondrial ROS production, cardiolipin content and longevity in birds. *Age (Dordr)* **38**, 433-443.

Demetrius, L. (2006). The origin of allometric scaling laws in biology. *Journal of Theoretical Biology* **243**, 455-467.

Desplanches, D., Amami, M., Dupré-Aucouturier, S., Valdivieso, P., Schmutz, S., Mueller, M., Hoppeler, H., Kreis, R. and Flück, M. (2014). Hypoxia refines plasticity of mitochondrial respiration to repeated muscle work. *European Journal of Applied Physiology* **114**, 405-417.

Dobson, F. S. (1992). Body Mass, Structural Size, and Life-History Patterns of the Columbian Ground Squirrel. *The American Naturalist* **140**, 109-125.

Dodds, P. S., Rothman, D. H. and Weitz, J. S. (2001). Re-examination of the “3/4-law” of Metabolism. *Journal of Theoretical Biology* **209**, 9-27.

Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* **82**, 47-95.

Duchamp, C. and Barre, H. (1993). Skeletal muscle as the major site of nonshivering thermogenesis in cold-acclimated ducklings. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **265**, R1076–R1083.

Duchamp, C., Barre, H., Rouanet, J. L., Lanni, A., Cohen-Adad, F., Berne, G. and Brebion, P. (1991). Nonshivering thermogenesis in king penguin chicks. I. Role of skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **261**, R1438–R1445.

Duchen, M. R. (2004). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine* **25**, 365–451.

Dumont, E. (2010). Bone density and the lightweight skeletons of birds. *Proceedings of the Royal Society B* **277**, 2193–2198

Dunn, R. E., White, C. R. and Green, J. A. (2018). A model to estimate seabird field metabolic rates. *Biology Letters* **14**, 20180190.

E

Else, P. L. and Hulbert, A. J. (1985). An allometric comparison of the mitochondria of mammalian and reptilian tissues: The implications for the evolution of endothermy. *Journal of Comparative Physiology B* **156**, 3–11.

Else, P. L., Brand, M. D., Turner, N. and Hulbert, A. J. (2004). Respiration rate of hepatocytes varies with body mass in birds. *Journal of Experimental Biology* **207**, 2305–2311.

Emmett, B. and Hochachka, P. W. (1981). Scaling of oxidative and glycolytic enzymes in mammals. *Respiration Physiology* **45**, 261–272.

F

Farhana, A., & Lappin, S. L. (2020). Biochemistry, lactate dehydrogenase. StatPearls

Feduccia, A. (2013). Bird origins anew. *The Auk* **130**, 1–12.

Feldman, H. A. (1995). On the allometric mass exponent, when it exists. *Journal of Theoretical Biology* **172**, 187–197.

Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist* **125**, 1–15.

Field, D. J., Lynner, C., Brown, C. and Darroch, S. A. F. (2013). Skeletal Correlates for Body Mass Estimation in Modern and Fossil Flying Birds. *PLOS ONE* **8**, e82000.

Field 2nd, J., Belding, H. S. and Martin, A. W. (1939). An analysis of the relation between basal metabolism and summated tissue respiration in the rat. I. The post-pubertal albino rat. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **14**, 143–157.

Flouris, A. D. and Piantoni, C. (2015). Links between thermoregulation and aging in endotherms and ectotherms. *Temperature* **2**, 73–85.

G

Garamszegi, L. Z. (2014). *Modern phylogenetic comparative methods and their application in evolutionary biology*. New York: Springer.

Gardner, J. L., Peters, A., Kearney, M. R., Joseph, L., & Heinsohn, R. (2011). Declining body size: a third universal response to warming?. *Trends in ecology & evolution*, **26**, 285–291.

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

Geiser, F. (2004). Metabolic Rate and Body Temperature Reduction During Hibernation and Daily Torpor. *Annu. Rev. Physiol.* **66**, 239–274.

Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C. and Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 204–224.

Giancarli, S. M., Dunham, A. E. and O'Connor, M. P. (2023). Clade-Specific Allometries in Avian Basal Metabolic Rate Demand a Broader Theory of Allometry. *Physiological and Biochemical Zoology* **96**, 216–232.

Gilbert, C., Robertson, G., Lemaho, Y., Naito, Y. and Ancel, A. (2006). Huddling behavior in emperor penguins: Dynamics of huddling. *Physiology & Behavior* **88**, 479–488.

Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M. and Charnov, E. L. (2001). Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate. *Science* **293**, 2248–2251.

Gillooly, J. F., Charnov, E. L., West, G. B., Savage, V. M., & Brown, J. H. (2002). Effects of size and temperature on developmental time. *Nature*, **417**, 70–73.

Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., Charnov, E. L., West, G. B. and Brown, J. H. (2006). Response to Clarke and Fraser: effects of temperature on metabolic rate. *Functional Ecology* **20**, 400–404.

Gillooly, J. F., Gomez, J. P. and Mavrodiev, E. V. (2017). A broad-scale comparison of aerobic activity levels in vertebrates: endotherms versus ectotherms. *Proceedings of the Royal Society B* **284**, 20162328.

Glazier, D. S. (2010). A unifying explanation for diverse metabolic scaling in animals and plants. *Biological Reviews* **85**, 111–138.

Glazier, D. S. (2015). Is metabolic rate a universal ‘pacemaker’ for biological processes? *Biological Reviews* **90**, 377–407.

Glazier, D. S. (2022). Complications with body-size correction in comparative biology: possible solutions and an appeal for new approaches. *Journal of Experimental Biology* **225**, jeb243313.

Gnaiger, E. (2009). Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: New perspectives of mitochondrial physiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**, 1837–1845.

Gnaiger, E. (2020). Mitochondrial Pathways and Respiratory Control: An Introduction to OXPHOS Analysis. 5th ed.

Goncalves, R. L. S., Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M. and Brand, M. D. (2015). Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Production by Muscle Mitochondria Assessed ex Vivo under Conditions Mimicking Rest and Exercise. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 209–227.

Grigg, G. C., Beard, L. A. and Augee, M. L. (2021). The Evolution of Endothermy and Its Diversity in Mammals and Birds. *Physiological and Biochemical Zoology* **77**, 982–997.

Grubb, B. R. (1983). Allometric relations of cardiovascular function in birds. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **245**, H567–H572.

Gueguen, N., Lefaucheur, L., Fillaut, M. and Herpin, P. (2005). Muscle fiber contractile type influences the regulation of mitochondrial function. *Molecular and Cellular Biochemistry* **276**, 15–20.

Gutherz, S. B. and O'Connor, P. M. (2021). Postcranial Skeletal Pneumaticity in Cuculidae. *Zoology* **146**, 125907.

H

Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K.-L., Harshman, J., et al. (2008). A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science* **320**, 1763–1768.

Hadfield, J. D. (2010). MCMC Methods for Multi-Response Generalized Linear Mixed Models: The **MCMCglmm** R Package. *Journal of Statistical Software* **33**

Hansford, R. G., Hogue, B. A. and Mildaziene, V. (1997). Dependence of H₂O₂ Formation by Rat Heart Mitochondria on Substrate Availability and Donor Age. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **29**, 89–95.

Harman, D. (1983). Free radical theory of aging: consequences of mitochondrial aging. *Age*, **6**, 86–94.

Harper, M. E. and Brand, M. D. (1993). The quantitative contributions of mitochondrial proton leak and ATP turnover reactions to the changed respiration rates of hepatocytes from rats of different thyroid status. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 14850–14860.

- Harper, M.-E. and Seifert, E. L.** (2008). Thyroid Hormone Effects on Mitochondrial Energetics. *Thyroid* **18**, 145–156.
- Harper, M.-E., Ballantyne, J. S., Leach, M. and Brand, M. D.** (1993). Effects of thyroid hormones on oxidative phosphorylation. *Biochemical Society Transactions* **21**, 785–792.
- Harris, J. R. and Brown, J. N.** (1971). Fractionation of the avian erythrocyte: An ultrastructural study. *Journal of Ultrastructure Research* **36**, 8–23.
- Hatton, I. A., Dobson, A. P., Storch, D., Galbraith, E. D. and Loreau, M.** (2019). Linking scaling laws across eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**, 21616–21622.
- He, J., Tu, J., Yu, J., & Jiang, H.** (2023). A global assessment of Bergmann's rule in mammals and birds. *Global Change Biology*, **29**, 5199–5210.
- Healy, K., Guillerme, T., Finlay, S., Kane, A., Kelly, S. B. A., McClean, D., Kelly, D. J., Donohue, I., Jackson, A. L. and Cooper, N.** (2014). Ecology and mode-of-life explain lifespan variation in birds and mammals. *Proceedings of the Royal Society B*. **281**, 20140298.
- Hedges, C. P., Woodhead, J. S. T., Wang, H. W., Mitchell, C. J., Cameron-Smith, D., Hickey, A. J. R. and Merry, T. L.** (2019). Peripheral blood mononuclear cells do not reflect skeletal muscle mitochondrial function or adaptation to high-intensity interval training in healthy young men. *Journal of Applied Physiology* **126**, 454–461.
- Hedrick, M. S. and Hillman, S. S.** (2016). What drove the evolution of endothermy? *Journal of Experimental Biology* **219**, 300–301.
- Hemmingsen, A. M.** (1960). Energy metabolism as related to body size and respiratory surfaces, and its evolution. Reports of the Steno Memorial Hospital and the Nordisk Insulinlaboratorium **9**, 1–110
- Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S. and Floyd, R. A.** (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine* **28**, 1456–1462.
- Herrero, A. and Barja, G.** (1998). H₂O₂ production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: sites of free radical generation and mechanisms involved. *Mechanisms of Ageing and Development* **103**, 133–146.
- Hochachka, P. W., Emmett, B. and Suarez, R. K.** (1988). Limits and constraints in the scaling of oxidative and glycolytic enzymes in homeotherms. *Canadian Journal of Zoology*. **66**, 1128–1138.
- Hulbert, A. J., Rana, T. and Couture, P.** (2002a). The acyl composition of mammalian phospholipids: an allometric analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **132**, 515–527.
- Hulbert, A. J., Faulks, S., Buttemer, W. A. and Else, P. L.** (2002b). Acyl composition of muscle membranes varies with body size in birds. *Journal of Experimental Biology* **205**, 3561–3569.

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

Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R. and Buttemer, W. A. (2007). Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiological Reviews* **87**, 1175–1213

J

Jackman, M. R. and Willis, W. T. (1996). Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **270**, C673–C678.

James, R. S. (2013). A review of the thermal sensitivity of the mechanics of vertebrate skeletal muscle. *Journal of Comparative Physiology B* **183**, 723–733.

Jansen, S. V., Müller, I., Nachtsheim, M., Schmitz-Rode, T. and Steinseifer, U. (2016). Ghost Cell Suspensions as Blood Analogue Fluid for Macroscopic Particle Image Velocimetry Measurements. *Artificial Organs* **40**, 207–212.

Janský, L. (1973). Non-Shivering Thermogenesis and Its Thermoregulatory Significance. *Biological Reviews* **48**, 85–132.

Jarmuszkiewicz, W., Woyda-Ploszczyca, A., Koziel, A., Majerczak, J. and Zoladz, J. A. (2015). Temperature controls oxidative phosphorylation and reactive oxygen species production through uncoupling in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* **83**, 12–20.

Jeffree, E. P. and Jeffree, C. E. (1994). Temperature and the Biogeographical Distributions of Species. *Functional Ecology* **8**, 640–650.

Jetz, W., Thomas, G. H., Joy, J. B., Hartmann, K. and Mooers, A. O. (2012). The global diversity of birds in space and time. *Nature* **491**, 444–448.

Johannsen, D. L. and Ravussin, E. (2009). The role of mitochondria in health and disease. *Current Opinion in Pharmacology* **9**, 780–786.

Judge, A. and Dodd, M. S. (2020). Metabolism. *Essays in Biochemistry* **64**, 607–647.

K

Kadenbach, B., Ramzan, R., Wen, L. and Vogt, S. (2010). New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1800**, 205–212.

Kamilar, J. M., & Cooper, N. (2013). Phylogenetic signal in primate behaviour, ecology and life history. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **368**, 20120341.

- Kikusato, M. and Toyomizu, M.** (2015). Moderate dependence of reactive oxygen species production on membrane potential in avian muscle mitochondria oxidizing glycerol 3-phosphate. *The Journal of Physiological Sciences* **65**, 555–559.
- Kleiber, M.** (1932). Body size and metabolism. *Hilgardia* **6**, 315–353.
- Kleiber, M.** (1961). The fire of life. An introduction to animal energetics. The fire of life.
- Koch, R. E., Buchanan, K. L., Casagrande, S., Crino, O., Dowling, D. K., Hill, G. E., Hood, W. R., McKenzie, M., Mariette, M. M., Noble, D. W. A., et al.** (2021). Integrating Mitochondrial Aerobic Metabolism into Ecology and Evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **36**, 321–332.
- Kohn, T. A., Anley, M. J., Magwaza, S. N., Adamson, L., Hoffman, L. C. and Brand, T. S.** (2023). Muscle fiber type and metabolic profiles of four muscles from the African black ostrich. *Meat Science* **200**, 109156.
- Konarzewski, M. and Diamond, J.** (1995). Evolution of Basal Metabolic Rate and Organ Masses in Laboratory Mice. *Evolution* **49**, 1239–1248.
- Kooijman, S. A. L. M.** (1986). Energy budgets can explain body size relations. *Journal of Theoretical Biology*, **121**, 269–282.
- Kooijman, S. A. L. M.** (2010). Dynamic energy budget theory for metabolic organisation. Cambridge university press.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. and Starkov, A. A.** (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters* **416**, 15–18.
- Koteja, P.** (2004). The Evolution of Concepts on the Evolution of Endothermy in Birds and Mammals. *Physiological and Biochemical Zoology* **77**, 1043–1050.
- Koza, R. A., Kozak, U. C., Brown, L. J., Leiter, E. H., Macdonald, M. J. and Kozak, L. P.** (1996). Sequence and Tissue-Dependent RNA Expression of Mouse FAD-Linked Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **336**, 97–104.
- Kozłowski, J., Konarzewski, M. and Czarnoleski, M.** (2020). Coevolution of body size and metabolic rate in vertebrates: a life-history perspective. *Biological Reviews* brv.12615.
- Krüger, K., Prinzinger, R. and Schuchmann, K.-L.** (1982). Torpor and metabolism in hummingbirds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **73**, 679–689.
- Krüger, V., Becker, T., Becker, L., Montilla-Martinez, M., Ellenrieder, L., Vögtle, F.-N., Meyer, H. E., Ryan, M. T., Wiedemann, N., Warscheid, B., et al.** (2017). Identification of new channels by systematic analysis of the mitochondrial outer membrane. *Journal of Cell Biology* **216**, 3485–3495.
- Ku, H.-H. and Sohal, R. S.** (1993). Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and anti-oxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential. *Mechanisms of Ageing and Development* **72**, 67–76.

Kuzmiak, S., Glancy, B., Sweazea, K. L. and Willis, W. T. (2012). Mitochondrial function in sparrow pectoralis muscle. *Journal of Experimental Biology* **215**, 2039–2050.

L

Larsson, N.-G. (2010). Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging. *Annual Review of Biochemistry* **79**, 683–706.

Liddy, J. (1990). Wing length, wingspan and body length measurement of live birds at banding stations. *Corella* **14**, 148–155

Little, A. G., Kocha, K. M., Lougheed, S. C. and Moyes, C. D. (2010). Evolution of the nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in vertebrates. *Physiological Genomics* **42**, 76–84.

Liu, S. (1997). Generating, Partitioning, Targeting and Functioning of Superoxide in Mitochondria. *Bioscience Reports* **17**, 259–272.

Longrich, N. R., Tokaryk, T. and Field, D. J. (2011). Mass extinction of birds at the Cretaceous-Paleogene (K-Pg) boundary. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 15253–15257.

Lovegrove, B. G. (2017). A phenology of the evolution of endothermy in birds and mammals. *Biological Reviews* **92**, 1213–1240.

Lovegrove, B. G., Heldmaier, G. and Ruf, T. (1991). Perspectives of endothermy revisited: The endothermic temperature range. *Journal of Thermal Biology* **16**, 185–197.

M

Marín-García, J. and Goldenthal, M. J. (2002). The mitochondrial organelle and the heart. *Revista Española de Cardiología* **55**, 1293–1310.

Margulis, L. (1971). Whittaker's five kingdoms of organisms: minor revisions suggested by considerations of the origin of mitosis. *Evolution*, **25**, 242–245.

Marquez, J., Sweazea, K. L. and Braun, E. J. (2005). Skeletal muscle fiber composition of the English sparrow (*Passer domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **143**, 126–131.

Martin-Silverstone, E., Vincze, O., McCann, R., Jonsson, C. H. W., Palmer, C., Kaiser, G. and Dyke, G. (2015). Exploring the Relationship between Skeletal Mass and Total Body Mass in Birds. *PLOS ONE* **10**, e0141794.

Mathers, K. E., McFarlane, S. V., Zhao, L. and Staples, J. F. (2017). Regulation of mitochondrial metabolism during hibernation by reversible suppression of electron transport system enzymes. *J Comp Physiol B* **187**, 227–234.

- McCafferty, D. J., Pandraud, G., Gilles, J., Fabra-Puchol, M. and Henry, P.-Y.** (2017). Animal thermoregulation: a review of insulation, physiology and behaviour relevant to temperature control in buildings. *Bioinspiration & Biomimetics* **13**, 011001.
- Mckechnie, A. E. and Lovegrove, B. G.** (2002). Avian facultative hypothermic response: A review. *The Condor* **104**, 705–724
- McLaughlin, K. L., Hagen, J. T., Coalson, H. S., Nelson, M. A. M., Kew, K. A., Wooten, A. R. and Fisher-Wellman, K. H.** (2020). Novel approach to quantify mitochondrial content and intrinsic bioenergetic efficiency across organs. *Scientific Reports* **10**, 17599.
- McNab, B. K.** (1966). An Analysis of the Body Temperatures of Birds. *The Condor* **68**, 47–55.
- McNab, B. K.** (1974). The Energetics of Endotherms. *The Ohio journal of science* **74**, 11.
- Mitchell, P.** (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, **191**, 144–148.
- Miwa, S. and Brand, M. D.** (2003). Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochemical Society Transactions* **31**, 1300–1301.
- Mogensen, M. and Sahlin, K.** (2005). Mitochondrial efficiency in rat skeletal muscle: influence of respiration rate, substrate and muscle type. *Acta Physiologica Scandinavica* **185**, 229–236.
- Monternier, P.-A., Marmillot, V., Rouanet, J.-L. and Roussel, D.** (2014). Mitochondrial phenotypic flexibility enhances energy savings during winter fast in king penguin chicks. *Journal of Experimental Biology* **217**, 2691–2697.
- Monternier, P.-A., Fongy, A., Hervant, F., Draï, J., Collin-Chavagnac, D., Rouanet, J.-L. and Roussel, D.** (2015). Skeletal muscle phenotype affects fasting-induced mitochondrial oxidative phosphorylation flexibility in cold-acclimated ducklings. *Journal of Experimental Biology* **218**, 2427–2434.
- Monternier, P.-A., Teulier, L., Draï, J., Bourguignon, A., Collin-Chavagnac, D., Hervant, F., Rouanet, J.-L. and Roussel, D.** (2017). Mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency is upregulated during fasting in two major oxidative tissues of ducklings. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **212**, 1–8.
- Montgomery, M. K., Hulbert, A. J. and Buttemer, W. A.** (2011). The Long Life of Birds: The Rat-Pigeon Comparison Revisited. *PLoS ONE* **6**, e24138.
- Morrison, S. F., Nakamura, K. and Madden, C. J.** (2008). Central control of thermogenesis in mammals: Central pathway controlling thermogenesis. *Experimental Physiology* **93**, 773–797.
- Mota-Rojas, D., Titto, C. G., Orihuela, A., Martínez-Burnes, J., Gómez-Prado, J., Torres-Bernal, F., Flores-Padilla, K., Carvajal-de La Fuente, V. and Wang, D.** (2021). Physiological and Behavioral Mechanisms of Thermoregulation in Mammals. *Animals* **11**, 1733.

Mozo, J., Emre, Y., Bouillaud, F., Ricquier, D. and Criscuolo, F. (2005). Thermoregulation: What Role for UCPs in Mammals and Birds? *Bioscience Reports* **25**, 227–249.

Mráček, T., Pecinová, A., Vrbacký, M., Drahota, Z. and Houštěk, J. (2009). High efficiency of ROS production by glycerophosphate dehydrogenase in mammalian mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **481**, 30–36.

Mráček, T., Drahota, Z. and Houštěk, J. (2013). The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1827**, 401–410.

Münkemüller, T., Lavergne, S., Bzeznik, B., Dray, S., Jombart, T., Schiffrers, K. and Thuiller, W. (2012). How to measure and test phylogenetic signal. *Methods in Ecology and Evolution* **3**, 743–756.

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

N

Nagy, K. A. (1987). Field Metabolic Rate and Food Requirement Scaling in Mammals and Birds. *Ecological Monographs* **57**, 112–128.

Nagy, K. A. (2005). Field metabolic rate and body size. *Journal of Experimental Biology* **208**, 1621–1625.

Nagy, K. A., Girard, I. A. and Brown, T. K. (1999). Energetics of free-ranging mammals, reptiles, and birds. *Annual Review of Nutrition* **19**, 247–277.

Nakagawa, S. and Cuthill, I. C. (2007). Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biological Reviews* **82**, 591–605.

Nakagawa, S., Johnson, P. C. D. and Schielzeth, H. (2017). The coefficient of determination R^2 and intra-class correlation coefficient from generalized linear mixed-effects models revisited and expanded. *Journal of The Royal Society Interface* **14**: 20170213.

Naya, D. E., Naya, H. and White, C. R. (2018). On the Interplay among Ambient Temperature, Basal Metabolic Rate, and Body Mass. *The American Naturalist*. **92**, E000–E000

Nicholls, D. G. (1977). Stoichiometries of proton translocation by mitochondria.

Nisbet, R. M., Jusup, M., Klanjscek, T., & Pecquerie, L. (2012). Integrating dynamic energy budget (DEB) theory with traditional bioenergetic models. *Journal of Experimental Biology*, **215**, 892–902.

Nogueira, V., Walter, L., Averet, N., Fontaine, E., Rigoulet, M. and Leverve, X. M. (2002). Thyroid Status Is a Key Regulator of Both Flux and Efficiency of Oxidative Phosphorylation in Rat Hepatocytes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **34**

Nord, A., Metcalfe, N. B., Page, J. L., Huxtable, A., McCafferty, D. J. and Dawson, N. J. (2021). Avian red blood cell mitochondria produce more heat in winter than in autumn. *The FASEB Journal* **35**, e21490.

Nudds, R. L. (2007). Wing-bone length allometry in birds. *Journal of Avian Biology* **38**, 515–519.

Nudds, R. L., Kaiser, G. W. and Dyke, G. J. (2011). Scaling of Avian Primary Feather Length. *PLoS ONE* **6**, e15665.

O

Ogo, S. H., Bernardes, C. F., Glass, M. L., Torsoni, M. A. and Vercesi, A. E. (1993). Functional mitochondria in snake *Bothrops alternatus* erythrocytes and modulation of HbO₂ affinity by mitochondrial ATP. *Journal of Comparative Physiology B* **163**, 614–619.

O'Connor, M. P., Kemp, S. J., Agosta, S. J., Hansen, F., Sieg, A. E., Wallace, B. P., ... & Dunham, A. E. (2007). Reconsidering the mechanistic basis of the metabolic theory of ecology. *Oikos*, **116**, 1058–1072.

O'Rourke, B. (2007). Mitochondrial Ion Channels. *Annual Review of Physiology*. **69**, 19–49.

P

Pamplona, R., Prat, J., Cadenas, S., Rojas, C., Pérez-Campo, R., López Torres, M. and Barja, G. (1996). Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mechanisms of Ageing and Development* **86**, 53–66.

Pamplona, R., Portero-Otín, M., Ruiz, C., Gredilla, R., Herrero, A. and Barja, G. (1999a). Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mechanisms of Ageing and Development* **112**, 169–183.

Pamplona, R., Portero-Otín, M., Requena, J. R., Thorpe, S. R., Herrero, A. and Barja, G. (1999b). A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mechanisms of Ageing and Development* **106**, 283–296.

Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M. and Ruggiero, F. M. (2002). Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* **286**, 135–141.

- Paradis, E.** (2006). *Analysis of phylogenetics and evolution with R*. New York: Springer.
- Paradis, E. and Schliep, K.** (2019). ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* **35**, 526–528.
- Parker, N., Crichton, P. G., Vidal-Puig, A. J. and Brand, M. D.** (2009). Uncoupling protein-1 (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **41**, 335–342.
- Paschen, S. A. and Neupert, W.** (2001). Protein Import Into Mitochondria. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)* **52**, 101–112.
- Peters, R. H.** (1983). *The Ecological Implications of Body Size*. Cambridge University Press.
- Picard, M., Hepple, R. T. and Burelle, Y.** (2012). Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **302**, C629–C641.
- Piersma, T. and Davidson, N. C.** (1991). Confusions of Mass and Size. *The Auk* **108**, 441–443.
- Pietrobon, D., Zoratti, M. and Azzone, G. F.** (1983). Molecular slipping in redox and ATPase H⁺ pumps. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **723**, 317–321.
- Porter, R. K. and Brand, M. D.** (1993). Body mass dependence of H⁺ leak in mitochondria and its relevance to metabolic rate. *Nature* **362**, 628–630.
- Porter, R. K. and Brand, M. D.** (1995). Causes of differences in respiration rate of hepatocytes from mammals of different body mass. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **269**, R1213–R1224.
- Porter, R. K., Hulbert, A. J. and Brand, M. D.** (1996). Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **271**, R1550–R1560.
- Portero-Otín, M., Requena, J. R., Bellmunt, M. J., Ayala, V. and Pamplona, R.** (2004). Protein nonenzymatic modifications and proteasome activity in skeletal muscle from the short-lived rat and long-lived pigeon. *Experimental Gerontology* **9**.
- Prange, H. D., Anderson, J. F. and Rahn, H.** (1979). Scaling of Skeletal Mass to Body Mass in Birds and Mammals. *The American Naturalist* **113**, 103–122.
- Prinzinger, P., Prebmar, A. and Schleucher, E.** (1991). Body temperature in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **4**, 499–506.

R

- Raichlen, D. A., Gordon, A. D., Muchlinski, M. N. and Snodgrass, J. J.** (2010). Causes and significance of variation in mammalian basal metabolism. *Journal of Comparative Physiology B* **180**, 301–311.
- Raimbault, S., Dridi, S., Duchamp, C., Taouis, M. and Ricquier, D.** (2001). An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochemical Journal* **353**, 441–444.
- Ranatunga, K.** (1998). Temperature dependence of mechanical power output in mammalian (rat) skeletal muscle. *Experimental Physiology* **83**, 371–376.
- Rasmussen, U. F. and Rasmussen, H. N.** (2000). Human skeletal muscle mitochondrial capacity: Human skeletal muscle mitochondrial capacity. *Acta Physiologica Scandinavica* **168**, 473–480.
- Rasmussen, U. F., Vielwerth, S. E. and Rasmussen, H. N.** (2004). Skeletal muscle bioenergetics: a comparative study of mitochondria isolated from pigeon pectoralis, rat soleus, rat biceps brachii, pig biceps femoris and human quadriceps. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **137**, 435–446.
- Ratner, P. L., Fisher, M., Burkart, D., Cook, J. R. and Kozak, L. P.** (1981). The role of mRNA levels and cellular localization in controlling sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase expression in tissues of the mouse. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 3576–3579.
- Ray, C.** (1960). The application of Bergmann's and Allen's rules to the poikilotherms. *Journal of morphology*, **106**, 85–108.
- Refinetti, R.** (1999). Amplitude of the daily rhythm of body temperature in eleven mammalian species. *Journal of Thermal Biology* **24**, 477–481.
- Rey, B., Halsey, L. G., Dolmazon, V., Rouanet, J.-L., Roussel, D., Handrich, Y., Butler, P. J. and Duchamp, C.** (2008). Long-term fasting decreases mitochondrial avian UCP-mediated oxygen consumption in hypometabolic king penguins. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **295**, R92–R100.
- Reynafarje, B., Costa, L. E. and Lehninger, A. L.** (1985). O₂ solubility in aqueous media determined by a kinetic method. *Analytical Biochemistry* **145**, 406–418.
- Rodbard, S.** (1950). Weight and body temperature. *Science*, **111**, 465–466.
- Rolfe, D. F. and Brand, M. D.** (1996). Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **271**, C1380–C1389.
- Rolfe, D. F. and Brown, G. C.** (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews* **77**, 731–758.

- Rolfe, D. F. S., Newman, J. M. B., Buckingham, J. A., Clark, M. G. and Brand, M. D.** (1999). Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **276**, C692–C699.
- Rose, S., Carvalho, E., Diaz, E. C., Cotter, M., Bennuri, S. C., Azhar, G., Frye, R. E., Adams, S. H. and Børsheim, E.** (2019). A comparative study of mitochondrial respiration in circulating blood cells and skeletal muscle fibers in women. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **317**, E503–E512.
- Rosser, B. W. C. and George, J. C.** (1986). The avian pectoralis: histochemical characterization and distribution of muscle fiber types. *Canadian Journal of Zoology*. **64**, 1174–1185.
- Rosser, B. W. C., Waldbillig, D. M., Wick, M. and Bandman, E.** (1993). Muscle Fiber Types in the Pectoralis of the White Pelican, a Soaring Bird. *Acta Zoologica* **75**, 329–336.
- Rosser, B. W. C., Waldbillig, D. M., Wick, M. and Bandman, E.** (1996). Heterogeneity of myosin heavy-chain expression in fast-twitch fiber types of mature avian pectoralis muscle. *Biochem. Cell Biol.* **74**, 715–728.
- Roussel, D. and Voituron, Y.** (2020). Mitochondrial Costs of Being Hot: Effects of Acute Thermal Change on Liver Bioenergetics in Toads (*Bufo bufo*). *Frontiers in Physiology* **11**, 153.
- Roussel, D., Salin, K., Dumet, A., Romestaing, C., Rey, B. and Voituron, Y.** (2015). Oxidative phosphorylation efficiency, proton conductance and reactive oxygen species production of liver mitochondria correlates with body mass in frogs. *Journal of Experimental Biology* **218**, 3222–3228.
- Roussel, D., Boël, M. and Romestaing, C.** (2018). Fasting enhances mitochondrial efficiency in duckling skeletal muscle by acting on the substrate oxidation system. *Journal of Experimental Biology* **221**,.
- Rowland, L. A., Bal, N. C. and Periasamy, M.** (2015). The role of skeletal-muscle-based thermogenic mechanisms in vertebrate endothermy. *Biological Reviews* **90**, 1279–1297.
- Rubolini, D., Liker, A., Garamszegi, L. Z., Møller, A. P. and Saino, N.** (2015). Using the BirdTree.org website to obtain robust phylogenies for avian comparative studies: A primer. *Current Zoology* **61**, 959–965.
- Rubner M.** (1883). Über den Einfluss der Körpergrösse auf Stoff- und Kraftwechsel. *Zeitschr. f. Biol.* 1883. 19:535-562.

S

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

- Salin, K., Roussel, D., Rey, B. and Voituron, Y.** (2012). David and Goliath: A Mitochondrial Coupling Problem? *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **317**, 283–293.
- Salin, K., Auer, S. K., Rey, B., Selman, C. and Metcalfe, N. B.** (2015). Variation in the link between oxygen consumption and ATP production, and its relevance for animal performance. *Proceedings of the Royal Society B* **282**, 20151028.
- Salin, K., Villasevil, E. M., Anderson, G. J., Selman, C., Chinopoulos, C. and Metcalfe, N. B.** (2018). The RCR and ATP/O Indices Can Give Contradictory Messages about Mitochondrial Efficiency. *Integrative and Comparative Biology* **58**, 486–494.
- Saltin, B., Gagge, A. P. and Stolwijk, J. A.** (1968). Muscle temperature during submaximal exercise in man. *Journal of Applied Physiology* **25**, 679–688.
- Schimper, A. F. W.** (1883). Über die entwicklung der chlorophyllkörner und farbkörper. *Bot Zeit*, 41, 105.
- Schmidt-Nielsen, K.** (1975). Scaling in biology: The consequences of size. *Journal of Experimental Zoology* **194**, 287–307.
- Schmidt-Nielsen, K** (1984). *Scaling: Why is animal size so important?* Cambridge University Press.
- Schmidt-Nielsen, K.** (1997). *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. Cambridge University Press.
- Scott, G. R.** (2011). Elevated performance: the unique physiology of birds that fly at high altitudes. *Journal of Experimental Biology* **214**, 2455–2462.
- Scott, G. R., Richards, J. G. and Milsom, W. K.** (2009). Control of respiration in flight muscle from the high-altitude bar-headed goose and low-altitude birds. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **297**, R1066–R1074.
- Scott, G. R., Schulte, P. M., Egginton, S., Scott, A. L. M., Richards, J. G. and Milsom, W. K.** (2011). Molecular Evolution of Cytochrome c Oxidase Underlies High-Altitude Adaptation in the Bar-Headed Goose. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 351–363.
- Seebacher, F.** (2009). Responses to temperature variation: integration of thermoregulation and metabolism in vertebrates. *Journal of Experimental Biology* **212**, 2885–2891.
- Sheldon, L. D., Chin, E. H., Gill, S. A., Schmaltz, G., Newman, A. E. M. and Soma, K. K.** (2008). Effects of blood collection on wild birds: an update. *Journal of Avian Biology* **39**, 369–378.
- Sherwood, L. Klandorf, H. Yancey, P.** (2012) *Animal Physiology: From Genes to Organisms*. Cengage Learning

Shrimpton, S. J., Streicher, J. W., Gower, D. J., Bell, R. C., Fujita, M. K., Schott, R. K. and Thomas, K. N. (2021). Eye-body allometry across biphasic ontogeny in anuran amphibians. *Evolutionary Ecology* **35**, 337–359.

Sommer, A. M. and Pörtner, H. O. (2004). Mitochondrial Function in Seasonal Acclimatization versus Latitudinal Adaptation to Cold in the Lugworm *Arenicola marina* (L.). *Physiological and Biochemical Zoology* **77**, 174–186.

Spargo, E., Pratt, O. E., & Daniel, P. M. (1979). Metabolic functions of skeletal muscles of man, mammals, birds and fishes: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **72**, 921–925.

Speakman, J. R. and Król, E. (2010). Maximal heat dissipation capacity and hyperthermia risk: neglected key factors in the ecology of endotherms: Heat dissipation limit theory. *Journal of Animal Ecology* no-no.

Starkov, A. A. (2008). The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1147**, 37–52.

Starkov, A. A. and Fiskum, G. (2003). Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *Journal of Neurochemistry* **86**, 1101–1107.

Stawski, C., Willis, C. K. R. and Geiser, F. (2014). The importance of temporal heterothermy in bats. *Journal of Zoology* **292**, 86–100.

Stier, A., Bize, P., Schull, Q., Zoll, J., Singh, F., Geny, B., Gros, F., Royer, C., Massemin, S. and Criscuolo, F. (2013). Avian erythrocytes have functional mitochondria, opening novel perspectives for birds as animal models in the study of ageing. *Frontiers in Zoology* **10**, 33.

Stier, A., Romestaing, C., Schull, Q., Lefol, E., Robin, J.-P., Roussel, D. and Bize, P. (2017). How to measure mitochondrial function in birds using red blood cells: a case study in the king penguin and perspectives in ecology and evolution. *Methods in Ecology and Evolution* **8**, 1172–1182.

St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. and Brand, M. D. (2002). Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *J. Biol. Chem.* **277**, 44784–44790.

Suarez, R. K., Lighton, J. R., Brown, G. S. and Mathieu-Costello, O. (1991). Mitochondrial respiration in hummingbird flight muscles. *PNAS* **88**, 4870–4873.

T

Talbot, D. A., Duchamp, C., Rey, B., Hanuise, N., Rouanet, J. L., Sibille, B. and Brand, M. D. (2004). Uncoupling protein and ATP/ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins. *The Journal of Physiology* **558**, 123–135.

Tansey, E. A. and Johnson, C. D. (2015). Recent advances in thermoregulation. *Advances in Physiology Education* **39**, 139–148.

Terrien, J. (2011). Behavioral thermoregulation in mammals: a review. *Frontiers in Bioscience* **16**, 1428.

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

Teulier, L., Degletagne, C., Rey, B., Tornos, J., Keime, C., de Dinechin, M., Raccurt, M., Rouanet, J.-L., Roussel, D. and Duchamp, C. (2012). Selective upregulation of lipid metabolism in skeletal muscle of foraging juvenile king penguins: an integrative study. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**, 2464–2472.

Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V. and Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry* **62**, 341–360.

Tobias, J. A., Sheard, C., Pigot, A. L., Devenish, A. J. M., Yang, J., Sayol, F., Neate-Clegg, M. H. C., Alioravainen, N., Weeks, T. L., Barber, R. A., et al. (2022). AVONET: morphological, ecological and geographical data for all birds. *Ecology Letters* **25**, 581–597.

Treberg, J. R., Braun, K., Zacharias, P. and Kroeker, K. (2018). Multidimensional mitochondrial energetics: Application to the study of electron leak and hydrogen peroxide metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **224**, 121–128.

Turner, N., Haga, K. L., Hulbert, A. J. and Else, P. L. (2005). Relationship between body size, Na⁺/K⁺-ATPase activity, and membrane lipid composition in mammal and bird kidney. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **288**, R301–R310.

Turner, N., Haga, K. L., Else, P. L. and Hulbert, A. J. (2006). Scaling of Na⁺, K⁺-ATPase Molecular Activity and Membrane Fatty Acid Composition in Mammalian and Avian Hearts. *Physiological and Biochemical Zoology* **79**, 522–533.

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* **552**, 335–344.

Tyrrell, D. J., Bharadwaj, M. S., Jorgensen, M. J., Register, T. C. and Molina, A. J. A. (2016). Blood cell respirometry is associated with skeletal and cardiac muscle bioenergetics: Implications for a minimally invasive biomarker of mitochondrial health. *Redox Biology* **10**, 65–77.

Tyrrell, D. J., Bharadwaj, M. S., Jorgensen, M. J., Register, T. C., Shively, C., Andrews, R. N., Neth, B., Dirk Keene, C., Mintz, A., Craft, S., et al. (2017). Blood-Based Bioenergetic Profiling Reflects Differences in Brain Bioenergetics and Metabolism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, e7317251.

van der Meer, J. (2006). Metabolic theories in ecology. *Trends in ecology & evolution*, **21**, 136-140.

Veghte, J. H. (1964). Thermal and Metabolic Responses of the Gray Jay to Cold Stress. *Physiological Zoology* **37**, 316-328.

Velotto, S. and Crasto, A. (2004). Histochemical and Morphometrical Characterization and Distribution of Fibre Types in Four Muscles of Ostrich (*Struthio camelus*). *Anatomia, Histologia, Embryologia* **33**, 251-256.

Vernochet, C. and Ronald Kahn, C. (2012). Mitochondria, obesity and aging. *Aging (Albany NY)* **4**, 859-860.

Vianna, C. R., Hagen, T., Zhang, C.-Y., Bachman, E., Boss, O., Gereben, B., Moriscot, A. S., Lowell, B. B., Bicudo, J. E. P. W. and Bianco, A. C. (2001). Cloning and functional characterization of an uncoupling protein homolog in hummingbirds. *Physiological Genomics* **5**, 137-145.

Voituron, Y., Boël, M. and Roussel, D. (2020). Mitochondrial threshold for H₂O₂ release in skeletal muscle of mammals. *Mitochondrion* **54**, 85-91.

Voss, M., Shutler, D. and Werner, J. (2010). A Hard Look at Blood Sampling of Birds. *The Auk* **127**, 704-708.

W

Welch, K. C. and Altshuler, D. L. (2009). Fiber type homogeneity of the flight musculature in small birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **152**, 324-331.

West, G. B. and Brown, J. H. (2004a). Life's Universal Scaling Laws. *Physics Today* **57**, 36-42.

West, G. B. and Brown, J. H. (2004b). Life's Universal Scaling Laws. *Physics Today* **57**, 36-42.

West, G. B. and Brown, J. H. (2005). The origin of allometric scaling laws in biology from genomes to ecosystems: towards a quantitative unifying theory of biological structure and organization. *Journal of Experimental Biology* **208**, 1575-1592.

West, G. B., Brown, J. H. and Enquist, B. J. (1997). A General Model for the Origin of Allometric Scaling Laws in Biology. *Science* **276**, 122-126.

West, G. B., Brown, J. H. and Enquist, B. J. (1999). The Fourth Dimension of Life: Fractal Geometry and Allometric Scaling of Organisms. *Science* **284**, 1677-1679.

West, G. B., Woodruff, W. H. and Brown, J. H. (2002). Allometric scaling of metabolic rate from molecules and mitochondria to cells and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 2473-2478.

Westerblad, H., Bruton, J. D. and Katz, A. (2010). Skeletal muscle: Energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Experimental Cell Research* **316**, 3093–3099.

Westermann, B. (2012). Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1817**, 1833–1838.

Westoby, M., Leishman, M. R. and Lord, J. M. (1995). On Misinterpreting the 'Phylogenetic Correction'. *Journal of Ecology* **83**, 531–534.

Whelan, C. J., Wenny, D. G. and Marquis, R. J. (2008). Ecosystem Services Provided by Birds. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1134**, 25–60.

White, C. R. and Seymour, R. S. (2003). Mammalian basal metabolic rate is proportional to body mass^{2/3}. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 4046–4049.

White, C. R. and Seymour, R. S. (2005). Sample size and mass range effects on the allometric exponent of basal metabolic rate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **142**, 74–78.

White, C. R., Phillips, N. F. and Seymour, R. S. (2006). The scaling and temperature dependence of vertebrate metabolism. *Biology Letters* **2**, 125–127.

White, C. R., Cassey, P. and Blackburn, T. M. (2007). Allometric Exponents Do Not Support a Universal Metabolic Allometry. *Ecology* **88**, 315–323.

White, C. R., Marshall, D. J., Alton, L. A., Arnold, P. A., Beaman, J. E., Bywater, C. L., Condon, C., Crispin, T. S., Janetzki, A., Pirtle, E., et al. (2019). The origin and maintenance of metabolic allometry in animals. *Nature Ecology & Evolution* **3**, 598–603.

White, C. R., Alton, L. A., Bywater, C. L., Lombardi, E. J. and Marshall, D. J. (2022). Metabolic scaling is the product of life-history optimization. *Science* **377**, 834–839.

Z

Zangarelli, A., Chanseaux, E., Morio, B., Brugere, C., Mosoni, L., Rousset, P., ... & Walrand, S. (2006). Synergistic effects of caloric restriction with maintained protein intake on skeletal muscle performance in 21 - month - old rats: a mitochondria - mediated pathway. The FASEB journal, **20**, 2439-2450.

Zapata-Cuartas, M., Sierra, C. A. and Alleman, L. (2012). Probability distribution of allometric coefficients and Bayesian estimation of aboveground tree biomass. *Forest Ecology and Management* **277**, 173–179.

Zhang, Z.-W., Cheng, J., Xu, F., Chen, Y.-E., Du, J.-B., Yuan, M., Zhu, F., Xu, X.-C. and Yuan, S. (2011). Red blood cell extrudes nucleus and mitochondria against oxidative stress. *IUBMB Life* **63**, 560–565.

Zheng, W.-H., Li, M., Liu, J.-S. and Shao, S.-L. (2008). Seasonal acclimatization of metabolism in Eurasian tree sparrows (*Passer montanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **151**, 519–525.

Zoccarato, F., Cavallini, L. and Alexandre, A. (2009). Succinate is the controller of $O_2 - /H_2O_2$ release at mitochondrial complex I : negative modulation by malate, positive by cyanide. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **41**, 387–393.

Zoladz, J. A., Koziel, A., Woyda-Ploszczyca, A., Celichowski, J. and Jarmuszkiewicz, W. (2016). Endurance training increases the efficiency of rat skeletal muscle mitochondria. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **468**, 1709–1724.