

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UMR 7178

THÈSE présentée par :

Mathieu WEITTEN

soutenue le : **17 décembre 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences du Vivant / Biologie des organismes

**Adaptations métaboliques et influence
du régime alimentaire chez un
hibernant food-storing**

THÈSE dirigée par :

Dr. ROBIN Jean-Patrice

Chargé de Recherche, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7178

RAPPORTEURS :

Dr. BONNET Xavier

Directeur de Recherche, Université de la Rochelle, CNRS UMR 7372

Dr. ROUSSEL Damien

Maître de Conférences, Université Lyon 1, CNRS UMR 5023

EXAMINATEURS :

Dr. AUJARD Fabienne

Directeur de Recherche, CNRS UMR 7179

Dr. CHALLET Etienne

Directeur de Recherche, Université de Strasbourg, CNRS UPR 3212

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Fabienne Aujard, M Xavier Bonnet, M Etienne Challet et M Damien Roussel, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier Caroline Habol pour son encadrement. Je remercie également Jean-Patrice Robin pour avoir été mon encadrant officiel.

Merci à Paul Pévet et Dominique Ciocca pour nous avoir permis de débiter l'élevage de hamsters et pour leurs conseils aussi bien pour l'élevage des animaux que pour les expériences.

Merci à Hugues Oudart, pour m'avoir formé à l'implantation des capteurs et à la perfusion intestinale.

Je remercie les ingénieurs, techniciens et stagiaires ayant réalisé des mesures, dosages et analyses multiples sur les échantillons biologiques de hamsters.

Merci aux autres doctorants avec qui j'ai partagé les bons et les mauvais moments.

Je remercie Odile Petit et François Criscuolo pour leur accueil au Département Ecologie, Physiologie et Ethologie de l'IPHC. Je tiens également à remercier l'ensemble des chercheurs du DEPE. Merci à Aurélie qui a assuré l'entretien et le nourrissage des hamsters. Merci à Claudine, Martine, Brigitte et Yannick d'avoir assuré les aspects administratifs, financiers, bibliographiques et informatiques de la thèse.

Merci à toute ma famille et à tous mes amis dont le soutien sans faille m'a beaucoup aidé au cours de ces 3 années de thèse. J'exprime tout mon amour à Camille pour m'avoir toujours soutenu et avec qui j'ai partagé l'expérience de la thèse mais également celle d'être parents. Merci à Hugo, qui en pointant son nez en dernière année de doctorat, m'a permis de ne pas penser sans cesse au travail et m'a apporté des moments merveilleux.

Communications réalisées au cours de la thèse

Ce travail est basé sur les articles suivants :

Article 1 :

- Hormonal changes and energy substrates' availability during the hibernation cycle of Syrian hamsters. M. Weitten, J-P Robin, H. Oudart, P. Pévet, C. Habold, *Hormones and Behavior*. 2013, 64(4), 611-617. doi: 10.1016/j.yhbeh.2013.08.015

Article 2:

- Intestinal absorptive capacities of a food-storing hibernator, the European hamster, during hibernation. M. Weitten, H. Oudart, C. Habold, *Comparative Biochemistry and Physiology, part A*. 2016, 193, 45-51. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.01.006

Article 3

- Diet influence on the life cycle of a food-storing hibernator: the European hamster. M. Weitten, J-P. Robin, C. Habold, *En préparation*.

Article non présenté dans le cadre de la thèse :

- In vivo estimation of body composition in the Syrian Hamster: a validation study using Bioimpedance Spectroscopy. M. Weitten, A. Zahariev, J-P. Robin, C. Habold. *En préparation*.
- How maize monoculture and increasing winter rainfall bring the hibernating European hamster on the verge of extinction. M. Tissier, Y. Handrich, J.-P. Robin, M. Weitten, P. Pévet, C. Kourkgy, C. Habold. *En préparation*.

Communications orales effectuées dans le cadre de la thèse :

- Diet Influence on the life cycle of a hibernating mammal, the European hamster. M. Weitten, C. Habold. *Scientific events of the ZAEU – Strasbourg*, FR, December 2013
- Intestinal absorption capacities of hibernating hamsters (*Cricetus cricetus*). M. Weitten, H. Oudart, C. Habold. *1st CPBI – Strasbourg*, FR, May 2015. doi: 10.1111/apha.12522

Communications affichées dans le cadre de la thèse :

- Hormonal profiles and energy substrates during the annual life cycle of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). M. Weitten, M. Quille, J-P. Robin, P. Pévet, C. Habold. *19th Meeting of the IHWG – Hazel*, BL, November 2012

- Metabolic state of Syrian hamster during hibernation cycle: focus on Adiponectin. M. Weitten, J-P. Robin, H. Oudart, P. Pévet, C. Habold. *CEPA 2013* - Lyon, FR, November 2013
- The role of lipids and proteins in the diet of common hamsters (*Cricetus cricetus*) on hibernation and reproductive success. M. Weitten, J-P. Robin, C. Habold. *APS Intersociety Meeting: Comparative Approaches to Great Challenges in Physiology* - San Diego, CA, USA, October 2014 -**Travel Award**-

Table des matières

REMERCIEMENTS	A
COMMUNICATIONS REALISEES AU COURS DE LA THESE	C
TABLE DES MATIERES	E
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
A. La torpeur	7
1. <i>La torpeur journalière</i>	9
2. <i>Hibernation/ Torpeur prolongée</i>	10
3. <i>Contrôle du cycle annuel</i>	13
B. Stratégies d'accumulation de réserves.....	40
1. Les espèces hibernantes fat-storing	40
2. Les espèces hibernantes food-storing	43
C. Le métabolisme intermédiaire au cours de l'hibernation	47
1. Le glucose.....	47
2. Les lipides.....	49
D. Les adaptations digestives	51
E. L'influence de l'alimentation sur le cycle annuel.....	53
1. Impact de l'alimentation sur l'hibernation	53
2. Impact de l'alimentation sur la reproduction des espèces hibernantes.....	60
F. Problématique de recherche.....	65
G. Modèles d'étude.....	66
1. Hamster doré (<i>Mesocricetus auratus</i>)	66
2. Hamster d'Europe (<i>Cricetus cricetus</i>).....	67
MATERIELS ET METHODES	69
Choix des modèles	71
Lots d'individus	71
Statut hormonal.....	71
Perfusion intestinale <i>in-vivo</i>	72
Influence du régime alimentaire	73

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	137
Adaptations spécifiques aux hibernants food-storing	139
Influence de la composition du régime alimentaire.....	141
Perspectives	142
Schémas de conclusion.....	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	152
ANNEXES	176
Poster: Hormonal profiles and energy substrates during the annual life cycle of Syrian hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	177
Poster: Metabolic state of Syrian hamster during hibernation cycle: focus on Adiponectin.	178
Poster: The role of lipids and proteins in the diet of common hamsters (<i>Cricetus cricetus</i>) on hibernation et reproductive success.	179

Introduction

L'évolution a retenu des stratégies comportementales et physiologiques permettant aux animaux de survivre aux variations environnementales saisonnières. La plus connue est sans doute la migration, qui constitue une réponse comportementale à une diminution de la disponibilité alimentaire, les animaux se déplaçant vers des régions plus riches en ressources. C'est le cas de nombreuses espèces d'oiseaux qui migrent vers le Sud en hiver, mais aussi de mammifères comme les gnous, effectuant les plus grandes migrations terrestres, qui suivent les pluies dans la savane africaine. Une autre stratégie vise à constituer des réserves alimentaires durant une période d'abondance en prévision d'une période de diminution de la disponibilité alimentaire. C'est le cas de nombreuses espèces, notamment l'écureuil roux (*Sciurus vulgaris*). Enfin, une troisième stratégie, impliquant une très importante économie d'énergie et s'accompagnant de la constitution de réserves corporelles et/ou extracorporelles, est la torpeur. La torpeur se caractérise par une dépression métabolique et une hypothermie, permettant la survie des animaux au sein de milieux présentant une diminution de la disponibilité alimentaire et/ou hydrique et éventuellement de la température ambiante. On distingue la torpeur journalière (observée tous les jours en période de repos chez des espèces telles que le colibri ou la musaraigne, pour lesquelles le coût de l'homéothermie est élevé en raison d'un rapport surface/volume important), et la torpeur saisonnière (observée lors de périodes de disettes ou de difficultés climatiques chez des espèces telles que le hamster ou la marmotte). Cette torpeur saisonnière peut être observée en climat froid et l'on parle d'hibernation, ou bien en climat désertique et l'on parle d'estivation.

Dans une première partie bibliographique, je vais présenter :

- les grandes notions qui sous-tendent la stratégie d'hibernation,

- les adaptations particulières des espèces stockant de la nourriture (food-storing) et s'alimentant au cours de l'hibernation,

- les effets de la qualité du régime alimentaire sur la qualité de l'hibernation et le succès reproducteur.

Dans une deuxième partie, je présenterai les articles découlant de mes travaux avec un résumé en français pour chaque article.

Enfin, dans une troisième partie, je ferai une synthèse générale de mes travaux et je développerai les conclusions et perspectives qui en émanent.

Revue bibliographique

A. La torpeur

La torpeur se rencontre chez des animaux (mammifères et oiseaux) présentant des masses allant de quelques grammes à plusieurs centaines de kilogrammes (Humphries et al., 2003a). Cependant, la majorité des animaux ayant recourt à la torpeur ont une masse inférieure à 10 kg (Wang et Lee, 2011). La torpeur est caractérisée par une diminution substantielle, temporaire, périodique et facultative, mais contrôlée, de l'intensité métabolique, de la température du corps, des pertes d'eau, du rythme cardiaque et d'autres fonctions physiologiques. Il s'agit du moyen le plus efficace pour les endothermes pour conserver l'énergie. La baisse de température corporelle observée peut s'étendre de 4°C à 40°C en fonction de l'espèce et de l'habitat. La durée des épisodes de torpeur peut aller de quelques heures à plusieurs semaines (Wang et Lee, 2011). La réduction du métabolisme durant la torpeur profonde est remarquable puisque la consommation d'oxygène au cours de la torpeur approche environ 5% des valeurs observées en euthermie mais peut descendre jusqu'à environ 1% (Carey et al., 2003; Geiser, 2004). L'économie d'énergie réalisée au cours de l'hibernation représente 80% à 90% de la dépense énergétique d'un animal qui serait resté en euthermie (Armitage et Woods, 2003; Armitage et al., 2003; Geiser, 2004). Chaque épisode de torpeur est caractérisé par quatre états différents : l'entrée en torpeur, le maintien en torpeur profonde, la sortie de torpeur, et une phase d'euthermie. Un exemple d'un épisode de torpeur d'une marmotte alpine (*Marmota marmota*) est donné en Fig. 1.

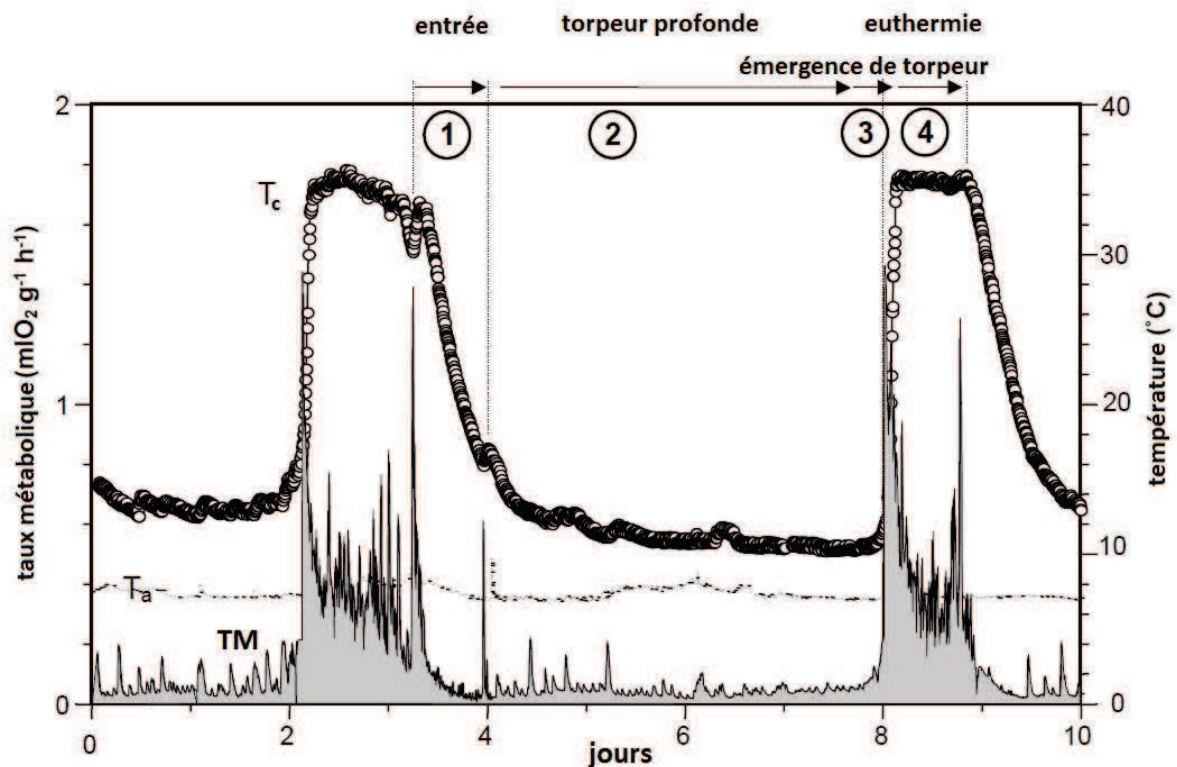


Figure 1 Episode de torpeur d'une marmotte Alpine (*Marmota marmota*). Un enregistrement en continu de l'intensité métabolique et de la température corporelle montre la diminution de l'intensité métabolique et de la température corporelle au cours de l'entrée en torpeur (1), un maintien de l'hypométabolisme et de l'hypothermie au cours de la torpeur (2), un réchauffement rapide et une augmentation de l'intensité métabolique au cours de la sortie de torpeur (3), et un retour à l'euthermie et l'eumétabolisme (4). TM taux métabolique, Tc température corporelle, Ta température ambiante. Adapté de Heldmaier et al., 2004.

Dans le passé, la torpeur a été vue en majorité comme un mécanisme d'adaptation au froid. La torpeur est maintenant connue comme étant présente sous toutes les latitudes et dans tous les milieux, des zones arctiques aux régions tropicales (Buck et Barnes, 2000; Dausmann et al., 2004; Twente et Twente, 1985). Il apparaît également maintenant que le manque de nourriture, qui se produit une partie de l'année dans les zones tropicales ainsi que dans les zones tempérées et arctiques, est la principale raison de l'utilisation de la torpeur (Vuarin et Henry, 2014). Etant donné que la baisse de la température ambiante implique une dépense d'énergie plus importante à des fins de thermorégulation chez les animaux endothermes et

que le froid est l'une des raisons de la diminution des ressources alimentaires, l'exposition au froid induit généralement une augmentation de l'occurrence d'épisodes de torpeur (Ruf et Geiser, 2014; Ruf et al., 1993). Ces phénomènes de torpeur se rencontrent dans sept ordres de mammifères (Monotrèmes, Marsupiaux, Insectivore, Chiroptères, Primates, Carnivores et Rongeurs)(Geiser, 2013) mais également chez au moins quatre ordres d'oiseaux (Caprimulgiformes, Apodiformes, Passeriformes, Columbiformes) (Brigham, 1992; Geiser et Ruf, 1995). Selon le moment où se produisent ces épisodes de torpeur, ainsi qu'en fonction de leur durée et de leur profondeur (baisse de température observée en torpeur), on peut distinguer des torpeurs journalières (Geiser et Ruf, 1995), et des torpeurs prolongées (épisodes de torpeur répétés au cours d'une saison donnée) qui constituent l'hibernation et l'estivation.

1. *La torpeur journalière*

Parmi les animaux utilisant la torpeur journalière, on retrouve de nombreux oiseaux, notamment les oiseaux-mouches (famille des trochilidés) mais également des mammifères, comme des rongeurs (les souris épineuses (*Acomys* sp.) par exemple) et des primates (le microcèbe (*Microcebus murinus*)). Les torpeurs journalières se produisent toujours lors de la phase d'inactivité : les espèces nocturnes entrent en torpeur en fin de nuit ou tôt le matin, alors que les espèces diurnes entrent en torpeur en début de nuit (Stamper et al., 1999). La torpeur journalière est en général moins saisonnière que l'hibernation, elle peut apparaitre tout au long de l'année. Dans les climats tempérés et arctiques, on observe une plus grande utilisation de la torpeur journalière durant l'hiver (Ruf et Geiser, 2014). Sous les climats chauds en revanche, la torpeur journalière est majoritairement utilisée durant l'été. Ceci est dû à la réduction de la disponibilité en nourriture et/ou hydrique en été (Ruf et Geiser, 2014). Certaines espèces de milieux désertiques se sont adaptées à une disponibilité

alimentaire continuellement basse en utilisant la torpeur journalière de manière régulière, même quand les conditions environnementales peuvent être considérées comme favorables (Geiser et Pavey, 2007). Les torpeurs journalières ne durent que quelques heures et la baisse de température corporelle est souvent moins importante que celle observée chez les animaux hibernants (Ruf et Geiser, 2014)(Fig. 2).

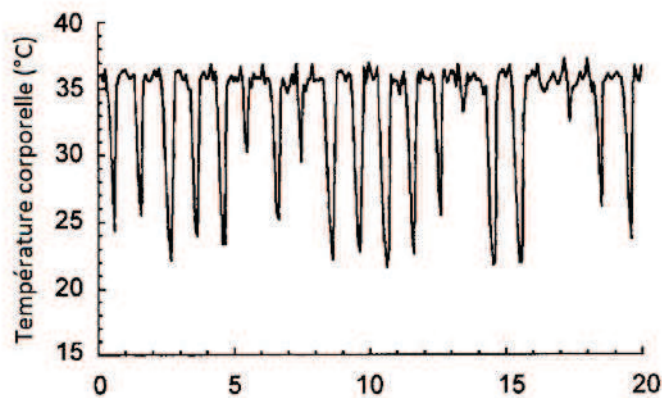


Figure 2 Exemple de torpeurs journalières chez un hamster Sibérien (*Phodopus sungorus*) sur 20 jours en milieu d'hiver. La température corporelle minimale reste au-dessus de 20°C lorsque la température ambiante est maintenue à environ 15°C. Adapté de Ruby, 2003.

L'intensité métabolique observée au cours des torpeurs journalières est réduite de 30% en moyenne comparée à l'intensité métabolique à l'euthermie. Cette réduction peut varier de 10% à 80% en fonction de la durée de la torpeur et de sa profondeur.

2. Hibernation/ Torpeur prolongée

La torpeur prolongée est appelée estivation lorsqu'elle se produit en été; et hibernation lorsqu'elle se produit en hiver. Dans ce groupe, on retrouve notamment les chauves-souris (*Eptesicus* et *Myotis*)(Twente et Twente, 1985), les tamias (*Eutamias*)(Levesque et Tattersall, 2010), les loirs (*Eliomys* et *Glis*)(Hoo-Paris et al., 1985), les hérissons (*Erinaceus*)(Cherel et al., 1995), les gerbilles (*Jaculus*)(Wang et Lee, 2011), les marmottes (*Marmota*)(Wojda et al., 2012), les opossums (*Burramys*)(Geiser, 2013), certains hamsters (*Cricetus* sp., *Mesocricetus* sp.)(Revel et al., 2007; Ueda and Ibuka, 1995) ou encore les spermophiles (*Spermophilus*)(Buck et Barnes, 1999). L'hibernation est définie comme étant une phase du cycle annuel au cours de laquelle un animal présente une succession d'épisodes de torpeur

entrecoupés d'eutherme. On observe des épisodes de torpeur qui durent de quelques heures à plusieurs semaines (Wang et Lee, 2011), au cours desquels la température corporelle est diminuée (maintenue de 1°C à 2°C au-dessus de la température ambiante) et les processus physiologiques réduits à leur minimum (Guppy et Withers, 1999). Les torpeurs sont interrompues périodiquement par des épisodes de réchauffement coûteux en énergie conduisant à des phases d'eutherme (généralement < 1 jour), également coûteuses en énergie (Wang, 1989) (Fig. 3). On ignore encore la finalité exacte de ces épisodes d'eutherme, mais de nombreuses hypothèses ont été avancées comme l'élimination des déchets métaboliques (Clausen et Storesund, 1971), la régulation du pH liée à l'accumulation

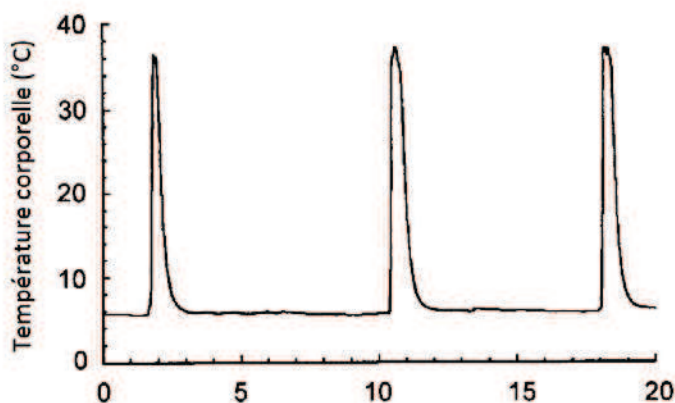


Figure 3 Exemple de succession de torpeurs au cours de l'hibernation d'un spermophile à manteau doré (*Spermophilus lateralis*) durant 20 jours en milieu d'hiver. La température corporelle est d'environ 6°C au cours des torpeurs lorsque la température ambiante est maintenue à environ 5°C. Lorsqu'ils émergent de torpeur, les spermophiles restent euthermiques ($T_c \sim 37^\circ\text{C}$) pendant moins de 20h. Adapté de Ruby, 2003.

de CO_2 (Malan et al., 1988), la lutte contre le stress oxydant accumulé au cours de la torpeur (Buzadzić et al., 1990), le sommeil (Daan et al., 1991; Trachsel et al., 1991), ou encore la réactivation de la fonction immunitaire (Prendergast et al., 2002). L'énergie économisée par un hibernant est de 80% à 90% comparée à un animal qui serait resté à l'eutherme (Armitage et Woods, 2003; Armitage et al., 2003; Geiser, 2004).

L'hibernation est l'une des phases du cycle annuel d'un hibernant saisonnier, qui comporte typiquement: (a) une phase pré-hibernatoire de gain de masse corporelle ou de constitution de réserves dans le terrier commençant au cours du printemps ou de l'été après la fin de la reproduction; (b) une phase hibernatoire de perte de masse et/ou de consommation des réserves externes accumulées, commençant par la fermeture du terrier à la fin de l'été ou à l'automne, selon l'altitude ou la latitude (Frey, 2015) ; et (c) une phase de reproduction, débutant avec l'émergence de l'hibernation au printemps (Dark, 2005). Cependant, ce modèle n'est pas universel. Certaines espèces comme l'opposum pygmée (*Cercartetus spp.*) (Song et al., 1997) ou des chauves-souris insectivores (Speakman et Rowlet, 1999), en particulier celles qui vivent dans des régions tropicales, peuvent se nourrir pendant des périodes plus chaudes en hiver puis ré-entrer en torpeur pour plusieurs jours lorsque la température extérieure diminue. Chez le loir (*Glis glis*), l'hibernation peut se terminer en fin de printemps, mais les individus peuvent ré-entrer en torpeur pour une période de plusieurs jours (estivation) après seulement quelques jours d'activité lorsqu'ils ne se reproduisent pas et ceci afin d'échapper à leurs prédateurs (Bieber et Ruf, 2009). Chez l'échidné (*Tachyglossus aculeatus*), l'hibernation s'arrête souvent à la moitié de l'hiver pour l'accouplement (Beard et Grigg, 2000). Des données montrent également que certains hibernants peuvent ne pas présenter de phases de réchauffement périodique. Le hérisson malgache (*Tenrec ecaudatus*) peut rester à une température corporelle d'environ 23°C pendant plus de 4 mois (Geiser, 1988), similaire à la dormance chez les ectothermes. Le chirogale moyen (*Cheirogaleus medius*) et les espèces apparentées subissent des variations de la température corporelle qui suivent passivement la température ambiante et cela pendant des mois (Dausmann et al., 2004). Le réchauffement passif ou partiellement passif, qui réduit énormément les coûts énergétiques liés au réchauffement après un épisode de torpeur, est largement utilisé par la

chauve-souris de Goulde (*Nyctophilus gouldi*) (Currie et al., 2014) et l'engoulevent de Nuttall (*Phalaenoptilus nuttallii*) (Brigham, 1992), mais cela n'est bien sûr possible que si la température ambiante fluctue dans la plage de température corporelle de l'animal, ce qui ne se produit pas dans les climats froids, ou seulement si les animaux ont accès au rayonnement solaire.

3. *Contrôle du cycle annuel*

a) *Facteurs externes*

De nombreux facteurs externes peuvent influencer sur le déroulement du cycle annuel, aussi bien sur les variations de masses corporelles observées au cours de l'année que sur le déroulement de l'hibernation (initiation et émergence). C'est le cas notamment de la photopériode, de la température ambiante et de la disponibilité en nourriture.

(1) *La photopériode*

Chez le hamster Sibérien (*Phodopus sungorus*), les variations de masses corporelles et de couleurs de pelage observables au cours de l'année, peuvent être induites par des variations imposées de photopériode (Bartness et Wade, 1985; Geiser et Heldmaier, 1995). L'exposition de ces animaux à une photopériode courte (mimant la saison hivernale) induit une augmentation de la fréquence des torpeurs journalières et une variation de la coloration du pelage (de gris à blanc) afin de mieux se dissimuler dans leur environnement (Kirsch et al., 1991)

Des études ont mis en évidence l'implication d'une structure cérébrale dans la sensibilité à la photopériode : le noyau supra-chiasmatique (NSC). Des expériences d'ablation du NSC ont montré une désorganisation de l'occurrence des torpeurs chez le hamster Sibérien (Ruby et

Zucker, 1992) ou une expression continue de torpeur chez le spermophile à manteau doré (*Spermophilus lateralis*) (Ruby et al., 1998). La variation de photopériode, plus particulièrement la durée de la nuit (Fig. 4) (1a), est perçue par la rétine (Fig. 4) (1b) puis

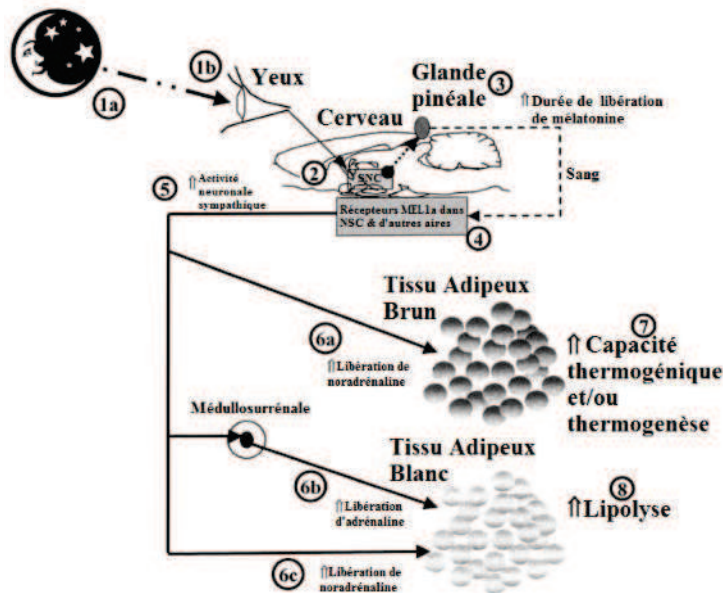


Figure 4 Illustration du mécanisme sous-tendant la diminution saisonnière d'adiposité induite par la photopériode chez le hamster Sibérien. Adapté de Bartness et al., 2002.

l'information est transmise au NSC (Fig. 4) (2). Le NSC transmet l'information à la glande pinéale (Fig. 4) (3) qui convertit le message nerveux en un message chimique : la mélatonine. La sécrétion de mélatonine est proportionnelle à la durée de la nuit (Bartness et Goldman, 1989; Bartness et al., 1993). La mélatonine est principalement connue comme étant l'hormone régulant les rythmes biologiques car synthétisée surtout la nuit (Corbalán-Tutau et al., 2012). La perfusion intracérébroventriculaire (ICV) de mélatonine à des taux similaires à ceux observés en photopériode courte induit des réponses similaires à celles observées lors d'une exposition à une photopériode courte (Badura et Goldman, 1992; Bartness et al., 1993). La mélatonine circulante se fixe à des récepteurs (récepteurs MEL1a), notamment ceux présents sur les neurones du NSC (Fig. 4) (4) mais également d'autres régions (Reppert et al., 1994; Song et al., 2000) incluant les neurones effecteurs du système nerveux sympathique (SNS) (Fig. 4) (5). La stimulation des neurones du SNS (augmentation de la libération de noradrénaline (McElroy et al., 1986) (Fig. 4) (6a)) induit des effets

périphériques : thermogenèse par le tissu adipeux brun (TABr) (Bamshad et al., 1999) (Fig. 4) (7), lipolyse du tissu adipeux blanc (TABl) (Fig. 4) (8) via la sécrétion d'adrénaline par la médullosurrénale (Fig. 4) (6b) et de noradrénaline (Fig. 4) (6c) (Demas et Bartness, 2001).

Les espèces dont certains paramètres physiologiques (masse corporelle, activité, capacités reproductrices) sont directement sous le contrôle de la photopériode sont appelées photopériodiques (Pévet, 1988). C'est notamment le cas du hamster doré chez lequel l'exposition à une photopériode courte pendant six semaines induit l'entrée en hibernation (Ueda and Ibuka, 1995). La photopériode peut également induire des changements de manière indirecte en influençant une horloge interne. Ce mécanisme sera abordé plus en détails dans la partie « Système Nerveux Central » (p 14).

(2) *La température ambiante*

Contrairement à la photopériode qui a un rôle régulateur sur le cycle annuel et notamment sur le déroulement des torpeurs, la température ambiante est un facteur modulateur important mais non déterminant.

Chez la marmotte alpine exposée à des températures ambiantes comprises entre 5°C et 15°C au cours de l'hibernation, on observe des températures corporelles allant de 7.8°C à 17.6°C (Ortmann et Heldmaier, 2000). Une étude chez le spermophile Arctique (*Spermophilus parryi*) a démontré une influence de la température ambiante sur l'intensité métabolique des animaux : à des températures ambiantes comprises entre 0°C et -16°C, l'intensité métabolique augmente (de 0,01 à 0,18ml O₂.g⁻¹.h⁻¹) afin de maintenir une température corporelle stable d'environ 0°C (Buck et Barnes, 2000). Une étude sur un autre hibernant saisonnier, le spermophile à manteau doré, a démontré que des animaux maintenus à 9.5°C durant leur hibernation présentaient des phases d'hibernation plus longues que des animaux

maintenus à 21°C. Une étude sur un animal réalisant des torpeurs journalières, le hamster Sibérien, a mis en évidence qu'une exposition au froid (5°C) induisait une apparition précoce des épisodes de torpeur par rapport à des animaux exposés à une température ambiante de 23°C (Ruf et al., 1993). Il a également été observé une plus grande utilisation de la torpeur par les animaux exposés au froid ainsi qu'une diminution plus rapide de la masse corporelle (Ruf et al., 1993). Il semblerait également que les hamsters Sibérien juvéniles soient plus sensibles que les adultes aux variations journalières de la température ambiante (Diedrich et al., 2015).

(3) *La disponibilité alimentaire*

De même que la température ambiante, la disponibilité alimentaire jouerait un rôle modulateur et non de contrôle sur le déroulement de l'hibernation.

Des études aussi bien de terrain que de laboratoire ont permis de mettre en évidence ce rôle. Ainsi, chez le spermophile à manteau doré, une restriction calorique entraîne un retard de l'initiation de la phase d'hibernation d'environ quatre semaines (permettant de se constituer des réserves suffisantes) mais n'influe pas sur la durée des épisodes de torpeur (Pulawa et Florant, 2000). Chez le tamia rayé (*Tamias striatus*), une augmentation de la disponibilité alimentaire avant l'hibernation entraîne une diminution d'un facteur 2 du temps passé en torpeur et de la température corporelle en torpeur deux fois supérieures à celles observées chez un groupe contrôle (Munro et al., 2005). Des manipulations de la quantité d'aliments disponibles ont également entraîné des variations dans l'utilisation des torpeurs chez d'autres rongeurs, comme le spermophile de Belding (*Urocitellus beldingi*)(French, 1982), la marmotte alpine (Ortmann et Heldmaier, 2000) ou encore le muscardin du Japon (*Glirulus japonicus*)(Otsu et Kimura, 1993). Des expériences sur d'autres

familles d'hibernants ont également mis en évidence un rôle modulateur de la disponibilité alimentaire sur le déroulement de l'hibernation, notamment chez les marsupiaux (le phalanger pygmée (*Cercartetus nanus*)(Westman et Geiser, 2004) et le monito del monte (*Dromiciops gliroides*)(Nespolo et al., 2010)), ou chez des chauve-souris comme le nyctophile de Gouldie (*Nyctophilus gouldi*)(Geiser et Brigham, 2000), le grand murin (*Myotis myotis*)(Wojciechowski et al., 2007), le nyctophile de Geoffroy (*Nyctophilus geoffroyi*)(Geiser et Brigham, 2000). Cet effet a également pu être observé chez des animaux réalisant des torpeurs journalières, comme chez le hamster Sibérien (Bae et al., 2003) et également chez un oiseau, le colibri roux (*Selasphorus rufus*)(Hiebert, 1991).

b) Facteurs internes

De nombreux facteurs internes peuvent influencer le déroulement du cycle annuel, aussi bien au niveau des variations de la masse corporelle observée au cours de l'année que sur le déroulement de l'hibernation et des torpeurs. C'est notamment le cas du système nerveux, impliquant des régions comme l'hypothalamus et l'hippocampe, des hormones clés du métabolisme énergétique, mais également des hormones du stress et de la reproduction.

(1) Le système nerveux

(a) Le système nerveux central

(i) Les structures impliquées

Comme l'euthermie permet aux mammifères un fonctionnement cellulaire indépendant des fluctuations de la température ambiante, tout mécanisme provoquant l'entrée en hibernation doit en premier lieu amener à une diminution de la valeur de consigne hypothalamique de la température corporelle et diminuer la production de chaleur (Wang and Lee, 2011). L'hypothalamus, et en particulier l'aire antérieure préoptique (HAPO), tient

une place prépondérante dans l'altération des processus thermogéniques, puisqu'un refroidissement de cette zone initie une réaction de frisson générant de la chaleur (Heller et al., 1977). L'indice majeur confirmant le rôle du système nerveux central dans le contrôle de l'hibernation est que la température corporelle est toujours régulée pendant l'hibernation mais à une valeur de consigne très faible (Buck et Barnes, 2000; Craig Heller et al., 1977; Drew et al., 2007; Florant et Heller, 1977; Heller et Hammel, 1972; Horowitz et Horrigan, 1996). La variation de la valeur de consigne hypothalamique est rendue évidente par la diminution de l'intensité métabolique avant toute diminution observable de la température corporelle (Lyman, 1958). Des neurones thermosensibles sont présents dans l'HAPO et ceux-ci pourraient contrôler les mécanismes de réchauffement au cours de l'hibernation (Krulowicz et al., 1994). Une étude récente a mis en évidence une expression plus importante du gène codant pour une protéine découplante (UCP1) (induisant une production de chaleur) dans le cerveau de spermophile rayé (*Spermophilus tridecemlineatus*) en torpeur (Laursen et al., 2014). Ceci permet de maintenir la température de certaines régions du cerveau au-dessus de celle des autres tissus (environ 0.5°C) afin de maintenir certaines fonctions du tissu nerveux (Laursen et al., 2014).

Comme détaillé précédemment dans la partie traitant de l'influence de la photopériode, le NSC joue un rôle fondamental dans la régulation photopériodique de l'hibernation, dans le contrôle de la rythmicité des torpeurs (Ruby et Zucker, 1992; Ruby et al., 1998) et le contrôle de la reproduction (Pévet, 1988). En outre, l'utilisation du glucose par le NSC reste élevée au cours des torpeurs (Kilduff et al., 1982). Des neurones du NSC projettent des axones vers des zones pré-sympathiques et pré-parasympathiques capables de moduler les fonctions du

système nerveux autonome (Buijs et al., 2003) (ces fonctions sont décrites dans la partie « Système Nerveux Autonome » (p 18)).

Le NSC revêt une très grande importance chez des espèces possédant une horloge circannuelle interne comme le hamster d'Europe. Des animaux placés en photopériode continue (phases de lumière et d'obscurité de durée constante) présentent des variations de masse corporelle et une phase d'hibernation similaire à des animaux exposés à une photopériode normale (les durées des phases de lumière et d'obscurité journalières sont identiques aux variations naturelles (allongement de la durée du jour de janvier à juin, raccourcissement de juillet à décembre) (Masson-Pevet et al., 1994a). Cependant, le hamster d'Europe présente des périodes de photosensibilité (au cours des mois de janvier, mai à juillet, novembre et décembre) durant lesquelles son horloge circannuelle interne (contrôlée par des gènes horloges et qui définit un cycle biologique à l'échelle d'une année) peut se resynchroniser avec la photopériode (Monecke et al., 2015). La photopériode est alors un synchroniseur de cette horloge et n'agit plus directement pour contrôler le cycle annuel. Cette synchronisation peut se faire *via* un mécanisme dépendant de la mélatonine (Bartness and Goldman, 1989)(détaillé dans la partie « Photopériode » (p9)) ou indépendant de la mélatonine. Ce dernier mécanisme a été mis en évidence chez le hamster d'Europe (Monecke et al., 2013), le spermophile à manteau doré (Hiebert et al., 2000), ou encore le loir (Jallageas et al., 1993) suite à des expériences de pinéalectomie ou d'ablation des ganglions cervicaux supérieurs (visant à supprimer l'innervation sympathique de la glande pinéale). Malgré un arrêt de la sécrétion de mélatonine, ces animaux ont continué de présenter des variations de leurs paramètres physiologiques identiques à des animaux témoins. Les deux mécanismes de synchronisation semblent agir de concert : le mécanisme

indépendant de la mélatonine pourrait agir en soutien du mécanisme dépendant de la mélatonine en cas de mauvaise synchronisation durant la phase photosensible jusqu'à une resynchronisation à la prochaine phase photosensible (Monecke et al., 2015).

Des études antérieures suggèrent également que l'hippocampe et sa cible, le complexe septum médian/bande diagonale, sont impliqués dans le contrôle de l'hibernation (Belousov et al., 1990; Heller, 1979; Pakhotin et al., 1993). L'hippocampe est considéré comme une structure cérébrale essentielle au contrôle de l'hibernation car il s'agit de la dernière structure active à l'EEG lors de l'entrée en torpeur et elle est la première à être réactivée lors de l'émergence de torpeur (Beckman, 1982; Heller, 1979), mais son rôle est inconnu.

(ii) Voies d'action impliquées

Un neuro-modulateur, l'adénosine, qui a notamment un rôle dans la régulation du sommeil par une action au niveau du cortex et du cerveau antérieur basal (Huang et al., 2011), pourrait également jouer un rôle dans la régulation de l'hibernation, puisque son application exogène agit sur le système nerveux central, induisant une hypothermie (Swoap et al., 2007). De plus, l'injection intracérébroventriculaire (ICV) d'un antagoniste de l'adénosine provoque une diminution de la réaction d'hypothermie (Barros et Branco, 2000) induite chez les rongeurs par l'hypoxie (Levesque et Tattersall, 2009). L'injection ICV d'un agoniste de l'adénosine chez la souris arrête les torpeurs journalières induites par le jeûne (Swoap et al., 2012). Ces données suggèrent que l'adénosine pourrait jouer un rôle dans l'altération de la thermorégulation au cours de l'entrée en torpeur.

En plus de son rôle dans le contrôle du cycle journalier, la mélatonine pourrait être impliquée dans le contrôle de l'hibernation. Chez le spermophile hibernant, les taux d'ARNmessenger de la sérotonine n-acétyltransférase (AA-NAT), impliquée dans la synthèse

de la mélatonine, sont augmentés dans le NSC (dont le rôle dans le contrôle du cycle annuel a été décrit dans le 2nd paragraphe de la partie « Photopériode » (p 9-10)). Une augmentation de l'expression des récepteurs à la mélatonine (Mel1a) a été mise en évidence dans l'hypothalamus de spermophile rayé hibernant (McCarron et al., 2001). Chez le hamster d'Europe, on a rapporté une augmentation d'un facteur 6 de la sécrétion de mélatonine chez des animaux en photopériode courte par rapport à celle d'animaux en photopériode longue (Garidou et al., 2003). En outre, la mélatonine semble avoir un rôle de neuroprotection lors des phases d'émergence de torpeur, car l'injection dans l'hypothalamus d'un spermophile rayé d'un antagoniste provoque un triplement de l'activité de la caspase 3, une enzyme intervenant dans le déclenchement de l'apoptose cellulaire (Schwartz et al., 2015).

Les voies d'action glutamatergiques semblent également être impliquées dans le contrôle de la torpeur, puisqu'un antagoniste des récepteurs NMDA induit l'émergence de torpeur chez le spermophile à manteau doré (Harris et Milsom, 2000). Ces résultats suggèrent que les voies d'action glutamatergiques pourraient activement maintenir la torpeur et/ou empêcher l'émergence de torpeur.

Les récepteurs aux opiacés semblent également jouer un rôle dans la régulation des torpeurs, puisqu'une activation des récepteurs μ permet le maintien en torpeur chez le hamster doré (Tamura et al., 2005). De la même manière, un antagoniste de ces récepteurs, la naloxone, réduit la durée des épisodes de torpeur chez le spermophile à manteau doré (Beckman et Lladós-Eckman, 1985).

Enfin, une injection d'histamine (synthétisée par les neurones du noyau tubéromamillaire de l'hypothalamus postérieur, et connue pour jouer un rôle dans l'état de veille) dans l'hippocampe prolonge la durée des torpeurs (Sallmen et al., 2003).

(b) Le système nerveux autonome

Le tonus parasympathique semble coordonner l'entrée en hypométabolisme tandis que le tonus sympathique semble déclencher la sortie de torpeur (Harris et Milsom, 1995; Milsom et al., 1999; Twente et Twente, 1978). De nombreux processus sont sous le contrôle du système nerveux autonome durant la torpeur, notamment les battements cardiaques et la respiration (Harris et Milsom, 1995; Milsom et al., 1999). Une influence parasympathique a été suggérée dans la mesure où l'atropine (qui présente des effets parasympatholytiques) augmente la fréquence cardiaque et abolit les arythmies cardiaques chez un certain nombre d'espèces au cours de la torpeur (Twente et Twente, 1978). Par ailleurs, plusieurs espèces hibernantes présentent au cours des torpeurs des phases de respiration séparées par des apnées prolongées, le rythme cardiaque étant plus rapide pendant les phases de respiration comparé aux phases d'apnée. Cette différence de rythme entre ces deux phases diminue en parallèle de la température corporelle durant la torpeur (Harris et Milsom, 1995; Milsom et al., 1999; Zimmer et Milsom, 2001). Une vagotomie réalisée sur des animaux en torpeur supprime la différence de rythme cardiaque en augmentant celui-ci pendant les périodes d'apnée à des valeurs proches de celles observées pendant la ventilation (Harris et Milsom, 1995). De tels profils de rythmes cardiaques ont été observés pendant des torpeurs chez le dunnart à pieds étroits (*Sminthopsis crassicaudata*) et l'opossum pygmée (*Cercartetus concinnus*) (Zosky, 2002; Zosky et Larcombe, 2003). Dans ces études, une inhibition du système nerveux parasympathique au cours de la torpeur par injection d'atropine supprime la variabilité de la fréquence cardiaque qui reste élevée comme à la suite d'une vagotomie

réalisée chez les spermophiles (Harris and Milsom, 1995). Ces résultats suggèrent qu'un contrôle parasympathique est conservé durant la torpeur.

(2) Les hormones

Les importantes variations saisonnières du comportement et de la dépense énergétique des hibernants, ainsi que les ajustements rapides et répétés au cours des processus physiologiques associés aux euthermies périodiques au cours de l'hibernation, impliquent un grand nombre de mécanismes neuroendocriniens. Ceux-ci agissent sur une grande variété de traits aussi bien comportementaux que physiologiques, allant du comportement alimentaire avant l'hibernation à la thermorégulation et le métabolisme tout au long de l'hibernation (Nürnberger, 1995). En général, un grand nombre de fonctions endocriniennes sont déprimées au début de l'hibernation, restimulées en milieu d'hibernation, et atteignent un pic après l'émergence (Wang, 1982), aussi bien en ce qui concerne les réponses dépendant de la structure cible que de l'expression des récepteurs hormonaux (Srivastava et Krishna, 2010).

(a) Les hormones pancréatiques

La place prépondérante des hormones pancréatiques, insuline et glucagon, dans la régulation de l'utilisation des substrats énergétiques en fait des candidates naturelles pour jouer un rôle dans la régulation de l'hibernation.

Chez les spermophiles mâles, les pics de concentration d'insuline se produisent concomitamment avec le pic de masse corporelle, alors que chez les femelles, l'insuline circulante reste élevée pendant la gestation, l'allaitement, et la phase de gain de masse (Boswell et al., 1994). Une injection ICV d'insuline chez une marmotte conduit à une diminution de la prise alimentaire et de la masse corporelle durant la période d'alimentation

estivale, mais n'a aucun effet pendant la période hivernale (Florant et al., 1991). En fait, après que le pic de masse ait été atteint, les hibernants semblent devenir résistants à l'insuline, une injection d'insuline ne parvenant alors plus à produire une diminution significative de la glycémie (Florant et al., 1985). Le rôle de l'insuline dans la prise alimentaire et l'utilisation des réserves chez les hibernants a été examiné en détails dans les années 1980 (Florant and Bauman, 1985; Melnyk et al., 1983). Au contraire de la petite chauve-souris brune (*Myotis lucifugus*) chez laquelle les taux plasmatiques d'insuline et de glucagon augmentent au cours de l'hibernation (Bauman, 1990), la plupart des espèces présente une diminution de ces taux pendant cette période, comme dans le cas du hérisson (*Ericeanus europaeus*) (Hoo-Paris et al., 1980; Hoo-Paris et al., 1982), du loir (Castex et al., 1984; Hoo-Paris et al., 1985), et du spermophile à manteau doré (Bauman et al., 1987). Des études *in vivo* et *in vitro* ont également montré une réduction considérable des sécrétions pancréatiques pendant l'hibernation (Castex et al., 1984; Hoo-Paris et al., 1982; Hoo-Paris et al., 1985). Cependant, des différences significatives existent dans la sensibilité à la température interne entre l'insuline et le glucagon. Par exemple, l'injection d'insuline n'a pas d'effet sur la glycémie chez le hérisson hibernant (Hoo-Paris et al., 1980), mais l'injection de glucagon induit une hyperglycémie dans les mêmes conditions (Hoo-Paris et al., 1982). De même, l'étude *in vitro* d'adipocytes du tissu adipeux blanc (TABl) de gerboise (*Allactaga sp.*) hibernant a révélé que ces derniers ont une plus grande sensibilité au glucagon que les mêmes cellules en conditions euthermiques, mais sont insensibles à l'insuline (Moreau-Hamsany et al., 1988). De plus, il n'y a pas de stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose, alors que l'effet de l'arginine sur la sécrétion du glucagon persiste chez le hérisson hibernant (Castex et al., 1984). Ces différences dans les fonctions hormonales pancréatiques pendant l'hibernation semblent être dues à la baisse de la température corporelle (Tc)

puisque aussi bien la sécrétion que l'action de ces hormones sont restaurées à partir d'une Tc de 15-25°C lors de la sortie de torpeur (Castex et al., 1984). On ignore encore les mécanismes liés à l'interruption de la fonction des cellules bêta du pancréas et au maintien de celle des cellules alpha pendant la torpeur. Ce maintien pourrait être lié au rôle du glucagon dans le contrôle de l'homéostasie du glucose (Bauman et al., 1987) et le métabolisme des acides gras (Schade et al., 1979) pendant cette période. Chez les espèces non hibernantes, la résistance à l'insuline peut être provoquée par un stress oxydatif, notamment par une production excessive de superoxyde mitochondrial, lorsqu'un afflux de nutriments se produit en l'absence d'augmentation de la consommation d'ATP. Le traitement des cellules avec des antioxydants mitochondriaux annule cette résistance à l'insuline (Hoehn et al., 2009). De même, une étude récente sur des cellules souches embryonnaires murines a mis en évidence qu'une exposition transitoire à des concentrations élevées en espèces réactives de l'oxygène (ROS) conduit à l'induction de la voie de résistance à l'insuline (Mouzannar et al., 2011). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la production de ROS chez les hibernants est généralement faible pendant la saison d'hibernation (Orr et al., 2009) et les défenses anti-oxydantes sont augmentées, en particulier lors des réveils lorsque le métabolisme des acides gras est élevé (Buzadzić et al., 1990).

(b) Les adipokines

La leptine sécrétée par le TABI est une hormone anorexigène stimulant la dépense énergétique et l'utilisation des réserves énergétiques (Fig. 5). Elle agit par action directe et via l'inhibition de la sécrétion du neuropeptide Y (NPY) au niveau de l'hypothalamus. La leptine est sans doute l'adipokine qui a été la plus étudiée chez les hibernants.

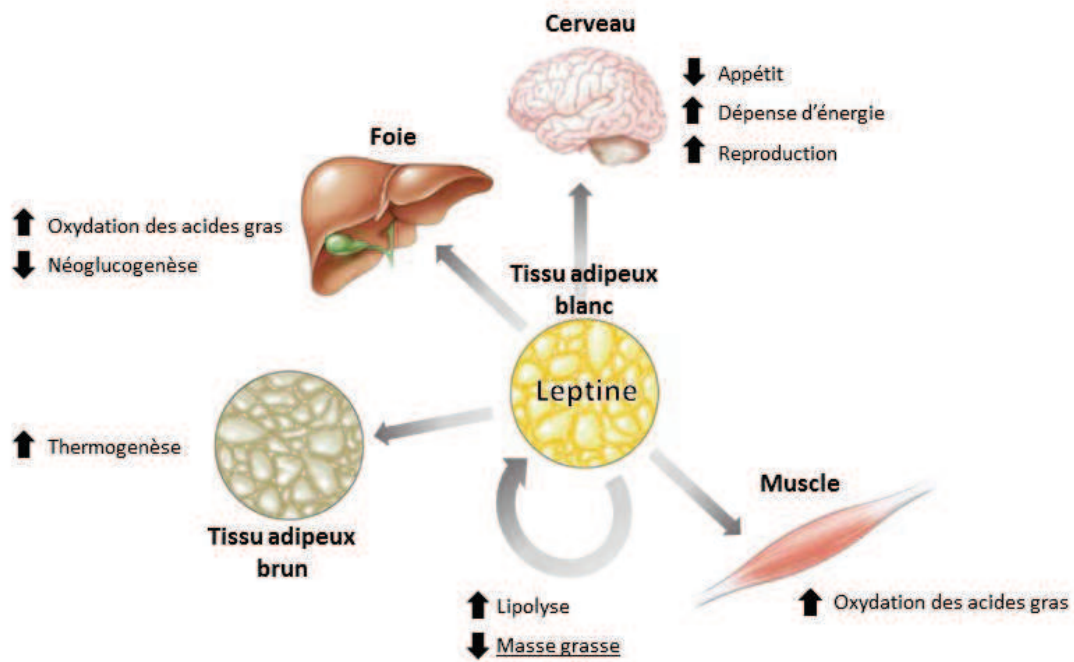


Figure 5 Principales cibles et actions de la leptine.

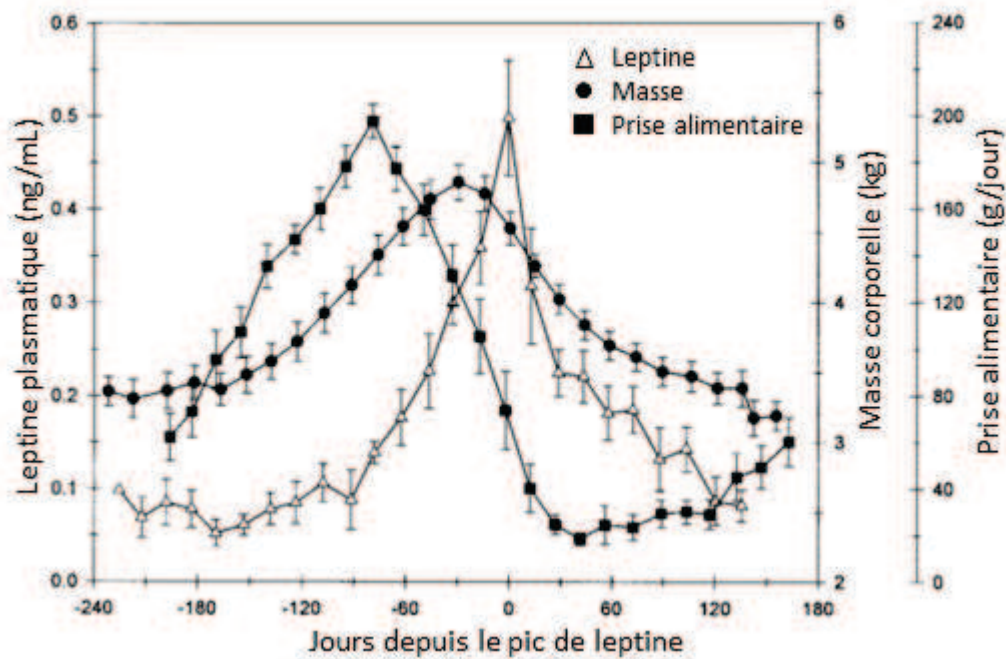


Figure 6 Variations annuelles de la masse corporelle, de la prise alimentaire et du taux de leptine plasmatique chez la Marmotte commune (*Marmota monax*). Adapté de Concannon et al. 2001.

Florant et al. (2004) ont mis en évidence une augmentation significative des taux de leptine circulante de juin à septembre chez la marmotte à ventre jaune (*Marmotta flaviventris*), ainsi qu'une diminution significative de ces taux jusqu'en février. Ces variations sont corrélées aux variations d'adiposité des animaux (Fig. 6) (Concannon et al., 2001; Florant et al., 2004) mais Kronfeld-Schor et al. (2000) ont montré une dissociation entre le taux de leptine et la masse grasse chez les petites chauves-souris brunes en période pré-hibernatoire, probablement pour permettre un plus grand stockage de TABI et outrepasser l'effet satiétogène et catabolique de la leptine. Des résultats similaires ont été observés chez le spermophile à manteau doré (Healy et al., 2008) et chez le spermophile Arctique (Boyer et al., 1997; Ormseth et al., 1996) en période pré-hibernatoire, ce qui suggère que ce mécanisme pourrait être commun aux petits hibernants, leur permettant de stocker de plus grandes quantités de lipides. Chez le spermophile Arctique, une injection de leptine induit une diminution de l'hyperphagie pré-hibernatoire (Boyer et al., 1997), tandis que des niveaux réduits de leptine sont associés à l'initiation de la prise alimentaire chez le spermophile à manteau doré (Healy et al., 2008). Du fait des forts taux de leptine circulante chez la marmotte en début de phase d'hibernation (Florant et al., 2004), on peut s'étonner du bon déroulement de l'hibernation puisque l'administration de leptine chez le hamster Sibérien induit une diminution de la fréquence des torpeurs d'un facteur 2 (Freeman et al., 2004). Une expérience similaire chez un marsupial, le dunnart à tête rayée, provoque une diminution de moitié de la durée des épisodes de torpeur, augmente la température moyenne journalière minimum de 4,5°C et augmente l'intensité métabolique minimale d'un facteur 2, ce qui induit une augmentation de la dépense énergétique journalière de 9% (Geiser et al., 1998). C'est la sensibilité à cette hormone qui serait donc modulée au cours de

l'hyperphagie pré-hibernatoire et lors de la reproduction (Buckley et Schneider, 2003; Keen-Rhinehart et Bartness, 2008; Keen-Rhinehart et al., 2010; Kronfeld-Schor et al., 2000; Schneider et al., 2000). En effet, il a été mis en évidence que l'injection intracérébroventriculaire (ICV) de NPY induit une diminution de la prise alimentaire et une induction des torpeurs chez le hamster Sibérien (Paul et al., 2005), ce qui plaide encore en faveur d'un découplage entre sécrétion de leptine et sensibilité à cette hormone pendant l'hibernation. Chez cette espèce, il a par ailleurs été démontré que des concentrations réduites de leptine sont nécessaires pour que les animaux puissent entrer en torpeur (Freeman et al., 2004). La dissociation entre les taux de leptine et la taille des réserves adipeuses ne serait donc pas nécessaire chez les hibernants de grande taille (les marmottes par exemple), car ils peuvent posséder suffisamment de réserves corporelles (principalement des lipides) pour survivre à l'ensemble de la saison d'hibernation.

Une autre adipokine, l'adiponectine, sécrétée de manière inversement proportionnelle à l'adiposité (Gavrilu et al., 2003; Lafontan et Viguerie, 2006), est connue pour stimuler la thermogénèse (Masaki et al., 2003), induire une diminution de la masse corporelle et de la masse grasse en stimulant l'oxydation des acides gras (Fruebis et al., 2001; Masaki et al., 2003) et inhiber la néoglucogénèse (Combs et al., 2001; Yamauchi et al., 2002) (Fig. 7).

Cette hormone a été beaucoup moins étudiée au cours de l'hibernation. Une seule étude chez la marmotte à ventre jaune décrit une diminution de l'adiponectinémie au cours de la période pré-hibernatoire en parallèle de la prise de masse grasse (Florant et al., 2004) (Fig. 8). Cette hormone pourrait intervenir dans la régulation de l'utilisation des substrats énergétiques au cours de l'hibernation.

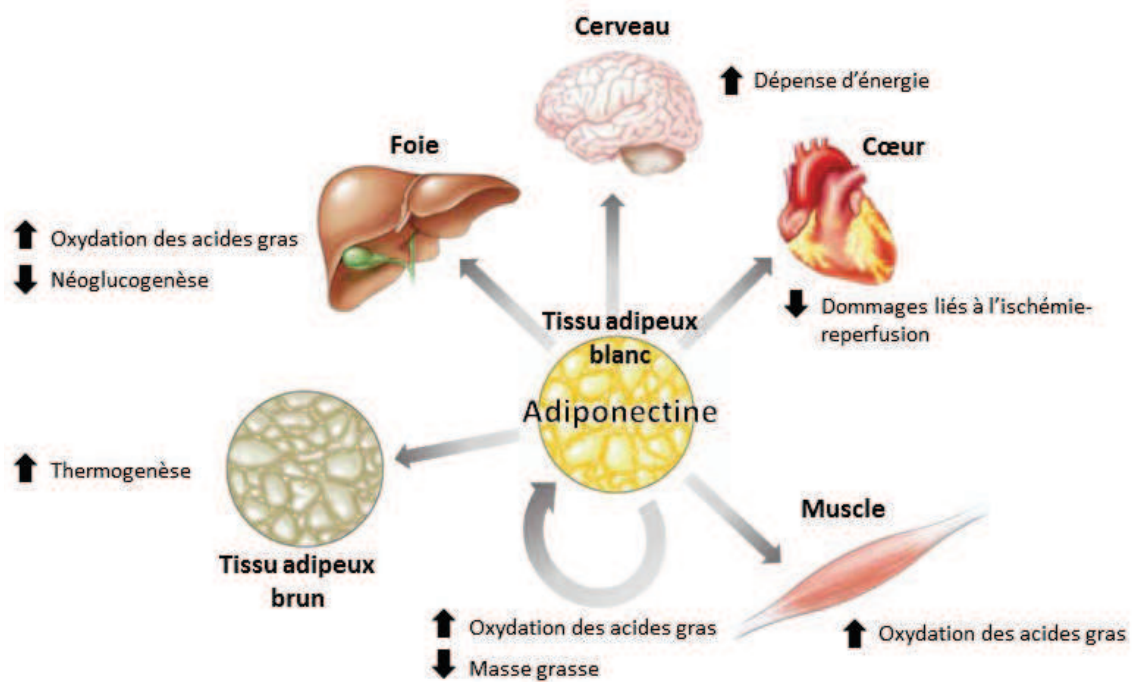


Figure 7 Principales cibles et actions de l'adiponectine.

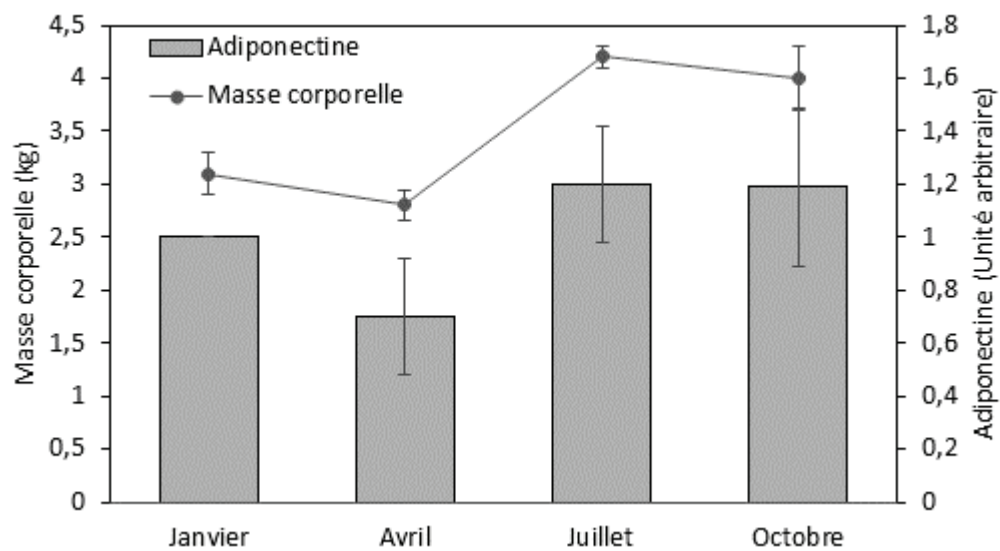


Figure 8 Variations annuelles de la masse corporelle et du taux d'adiponectine plasmatique chez la marmotte à ventre jaune (*Marmota flaviventris*). Adapté de Florant et al. 2004.

(c) Les incrétines

D'autres hormones de la balance énergétique, les incrétines sécrétées par l'intestin en réponse à la prise alimentaire (Baggio et Drucker, 2007), pourraient intervenir dans la réponse à l'alternance jeûne/alimentation des espèces se réalimentant au cours de l'hibernation. Les incrétines (le Glucagon-like-peptide-1 (GLP-1) et le Glucose-dependent insulintropic peptide (GIP)) sont principalement impliqués dans des processus anaboliques (Baggio et Drucker, 2007), via l'augmentation de la sécrétion d'insuline notamment. Le GLP-1 induit une augmentation du stockage du glucose dans les muscles et les adipocytes (Baggio and Drucker, 2007) et inhibe la néoglucogenèse (Baggio et Drucker, 2007). Il agit également au niveau du cerveau et du cœur en induisant des mécanismes de neuroprotection et de cardioprotection (Baggio et Drucker, 2007) (Fig. 9).

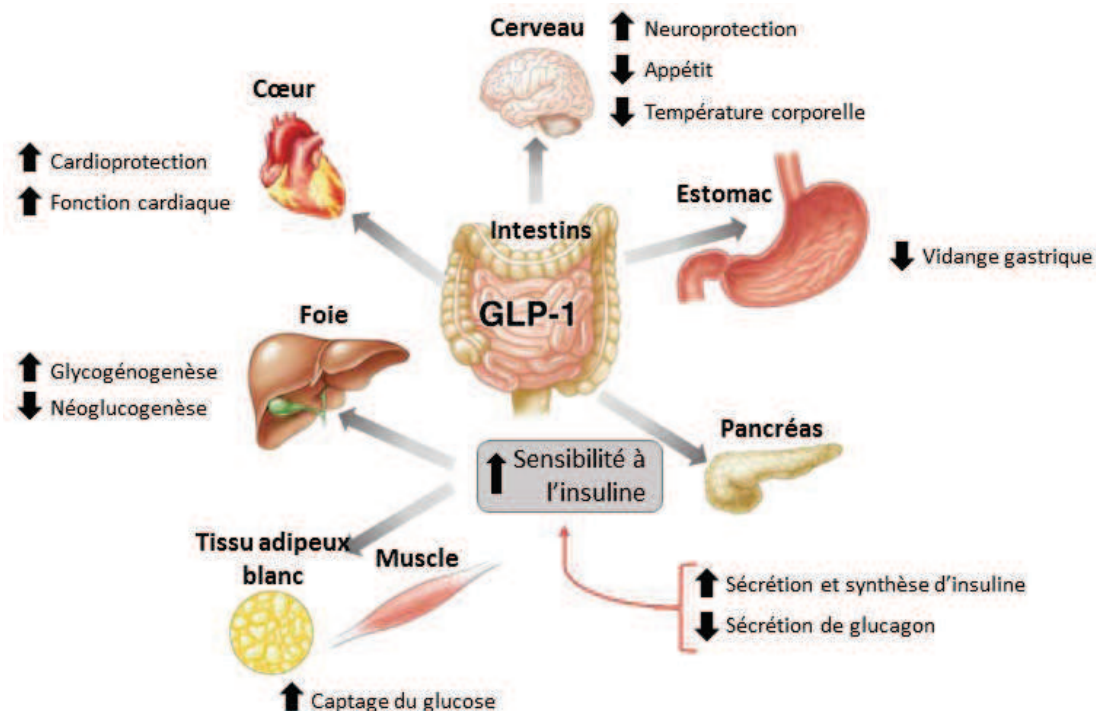


Figure 9 Principales cibles et actions du GLP-1. Adapté de Baggio et Drucker 2007.

Enfin, le GLP-1 induit une diminution de la température corporelle et de l'activité locomotrice chez la caille Japonaise (*Coturnix japonica*) (Shousha et al., 2007), limite la prise alimentaire chez le rat (Turton et al., 1996) et diminue la dépense énergétique chez l'Homme (Flint et al., 2000). Le GiP est connu pour stimuler la prolifération cellulaire dans les os et le cerveau, la lipogénèse au sein des adipocytes et atténue la néoglucogénèse (Baggio et Drucker, 2007) (Fig. 10).

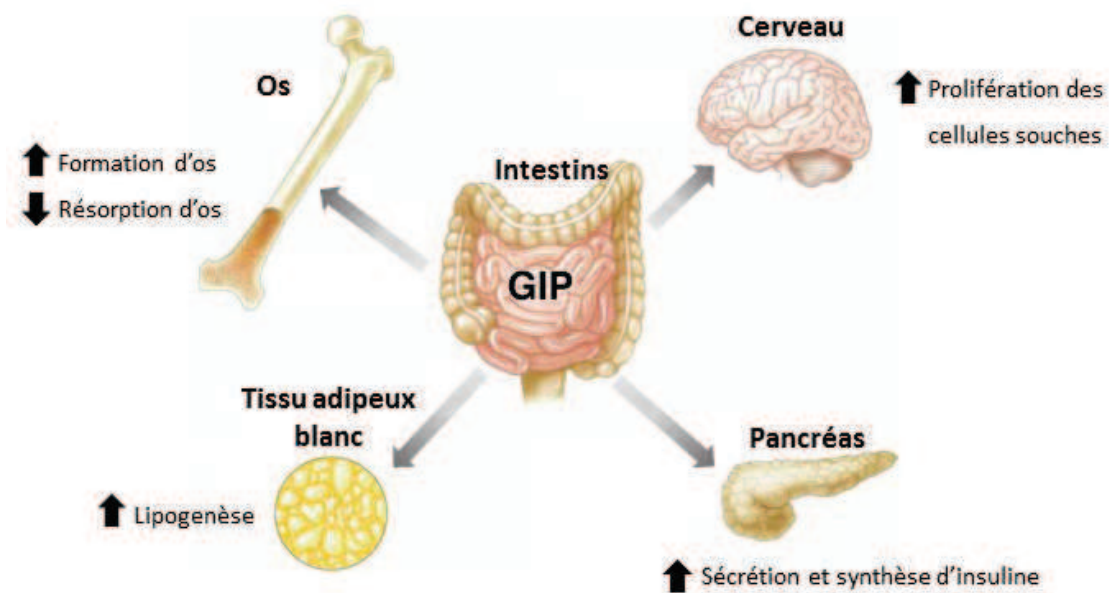


Figure 10 Principales cibles et actions du GIP. Adapté de Baggio et Drucker 2007.

Seule une étude s'est intéressée aux variations de taux des incrétines chez un estivant, le microcèbe mignon (*Microcebus murinus*), mettant en évidence une corrélation négative entre la température minimale au cours des torpeurs et le taux de GLP-1 (Giroud et al., 2008) (Fig. 11). Ces résultats renforcent la possible implication des incrétines dans le contrôle des processus métaboliques au cours de l'hibernation.

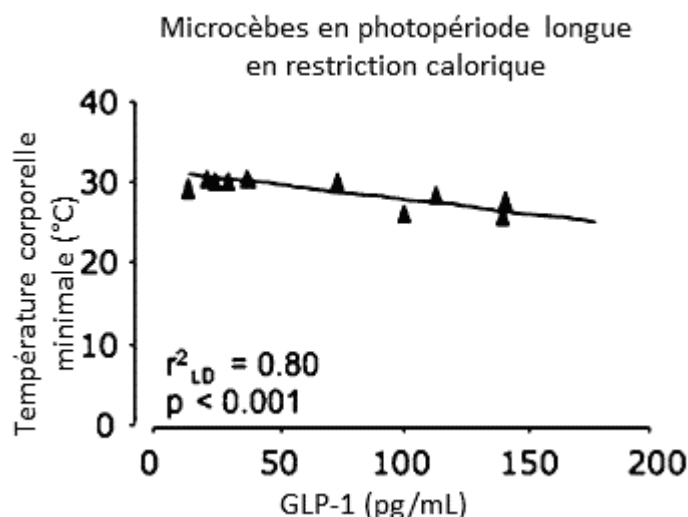


Figure 11 Corrélation entre la température corporelle minimale atteinte au cours des torpeurs et le taux de GLP-1 plasmatique chez le microcèbe mignon (*Microcebus murinus*).

(d) La ghréline

La ghréline est une hormone orexigène principalement produite dans l'estomac mais également dans l'hypothalamus (Sato et al., 2012). Le taux circulant de ghréline augmente généralement lors d'un jeûne et diminue après la prise alimentaire (Cummings, 2006), ce qui pourrait en faire une hormone impliquée dans la régulation de l'hibernation des espèces se nourrissant entre deux épisodes de torpeur. Cette hormone a de nombreuses fonctions, les deux principales étant la stimulation de la sécrétion de l'hormone de croissance et la régulation de l'appétit (Kojima et al., 1999; Nakazato et al., 2001). Elle est également connue pour augmenter l'adiposité et stimuler la minéralisation osseuse chez le rat (Fukushima et al., 2005; Shuto et al., 2002). Le hamster Sibérien présente un taux circulant de ghréline doublé au cours d'un jeûne de 48h mais ne présente pas de variation des taux circulants de ghréline pendant six semaines de restriction alimentaire (Tups et al., 2004). Chez les mammifères diurnes, le taux de ghréline augmente au cours du jeûne nocturne (Cummings, 2006). Une étude chez le spermophile à manteau doré montre que le taux de ghréline circulante est significativement plus élevé en octobre qu'en juillet et diminue encore au

cours de l'hibernation (Healy et al., 2010). La sécrétion de ghréline varie donc en fonction de la saison chez les hibernants et elle pourrait jouer un rôle dans les variations de prise alimentaire.

(e) Les glucocorticoïdes

Ces hormones du stress peuvent affecter à la fois l'adiposité (Dallman et al., 2000) et la reproduction (Rivest et Rivier, 1995; Whirledge et Cidlowski, 2010). Les concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes (GC) sont à leur plus bas niveau à l'émergence chez le spermophile d'Europe (*Spermophilus citellus*) (Shivatcheva et al., 1988) et chez la marmotte à ventre jaune (Armitage, 1991). Elles augmentent au cours de la période pré-hibernatoire, afin de déclencher un comportement de recherche de nourriture et d'assurer un bilan énergétique positif (Shivatcheva et al., 1988). Les réveils inter-torpeurs semblent être positivement corrélés à la sécrétion de glucocorticoïdes (Popova and Koryakina, 1981). Pendant l'hibernation, les niveaux de cortisol dans le sang sont faibles chez le spermophile d'Europe en torpeur, mais augmentent à l'euthermie (Shivatcheva et al., 1988) (Fig. 12).

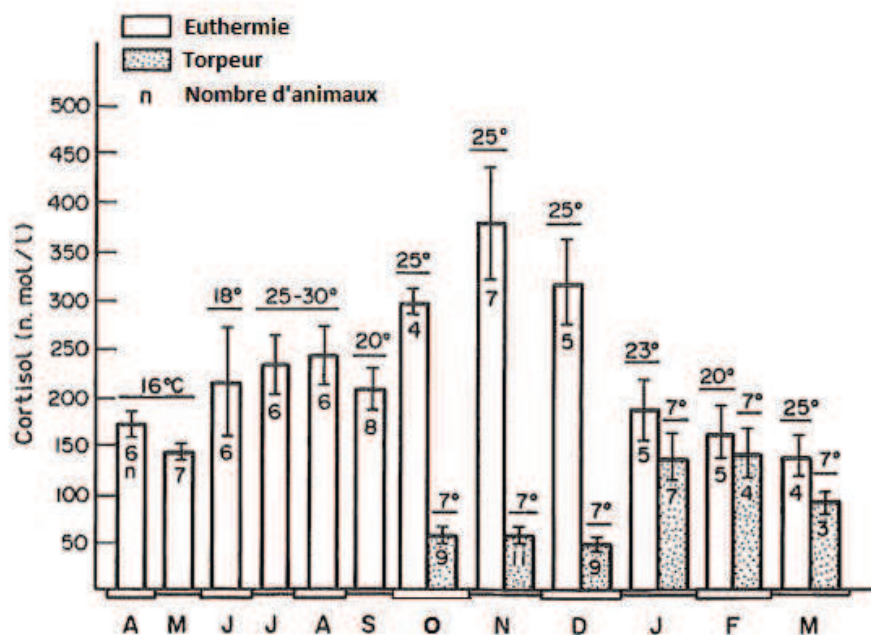


Figure 12 Variations annuelles du taux de cortisol plasmatique chez le spermophile d'Europe à l'euthermie et en torpeur. Adapté de Shivatcheva et al. 1988.

(f) Les hormones thyroïdiennes

Il existe de nombreuses études sur le rôle que tient la glande thyroïde dans la régulation de l'hibernation, mais les résultats sont contradictoires. Parmi les nombreux hibernants saisonniers, comme la marmotte commune (*Marmota monax*) (Krupp et al., 1977), les spermophiles (Hoffman and Zarrow, 1958), et le hérisson Européen (Pinatel et al., 1970), les observations histologiques indiquent que la glande est la plus active au cours de la saison de reproduction au printemps, relativement inactive pendant l'été, en involution en fin d'automne et en début d'hiver, et au repos au cours de la première partie de l'hibernation, l'activité sécrétoire reprenant quelques semaines avant la fin de l'hibernation. Les mesures des taux plasmatiques de thyroxine (T_4) et de triiodothyronine (T_3) chez des spermophiles et des marmottes au cours du cycle biologique annuel indiquent des niveaux élevés pendant l'hibernation et au cours du printemps, et bas durant l'été et l'automne, (Rawson et al., 1998; Wenberg and Holland, 1973). Par contre, le hérisson Européen a un niveau de T_4 faible pendant l'hiver (Fowler, 1988). Ces variations des taux des hormones thyroïdiennes sont dues à l'action de la glande pinéale et la mélatonine, qui sont connues pour moduler l'activité de la thyroïde (Vriend, 1983).

Les différences observées au sein des espèces hibernantes pourraient s'expliquer par la forme des hormones dosées. En effet, les concentrations de T_4 et T_3 totales (formes libres et formes associées aux protéines de transport) sont élevées pendant l'hibernation, tandis que les quantités de T_4 et T_3 libres sont extrêmement faibles lorsqu'elles sont mesurées aux températures corporelles caractéristiques de la torpeur (6°C - 7°C)(Demeneix et Henderson, 1978; Young et al., 1979). La température corporelle basse induit une diminution du taux des formes libres circulantes (d'un facteur 2,5 à 4). Les températures basses facilitent la liaison des hormones libres à leur protéine de transport plasmatique alors que les températures

élevées l'inhibent (Demeneix and Henderson, 1978; Young et al., 1979). Pendant la torpeur, les taux d'hormones libres peuvent être réduits afin de diminuer leurs effets métaboliques. Pendant la sortie de torpeur, lorsque la température du corps augmente progressivement, des quantités croissantes d'hormones libres pourraient être libérées des réserves plasmatiques de T_4 et T_3 sans impliquer de changements de l'activité sécrétoire de la thyroïde.

Chez les hibernants stockant de la nourriture, comme le tamia rayé (Hudson, 1980), les taux de relargage d'iode marquée de la glande thyroïde sont presque identiques entre les animaux à l'euthermie et ceux en torpeur, ce qui indique que la thyroïde reste active. L'exposition de hamsters dorés (*Mesocricetus auratus*) à une photopériode courte et au froid induit une diminution des taux plasmatique de T_4 et T_3 (Ottenweller et al., 1987) mais l'exposition à une photopériode courte uniquement induit une augmentation transitoire des taux de T_3 (Sigurdson and Himms-Hagen, 1988). Chez le hamster d'Europe, l'hibernation est abolie après une thyroïdectomie fonctionnelle avec de l' ^{131}I , mais l'injection de T_4 restaure la fréquence normale des torpeurs (Canguilhem, 1970), indiquant qu'une thyroïde active est nécessaire à l'hibernation. Plus récemment, il a été démontré qu'une injection d'hormone thyroïdienne, connue pour stimuler le métabolisme, dans le ventricule latéral du cerveau du hamster doré induit une émergence de torpeur (Tamura et al., 2005). Cependant, des hamsters dorés en photopériode courte et placés au froid recevant des injections journalières de T_4 présentent une diminution de la masse corporelle et une régression testiculaire identiques à des animaux sans traitement (O'Jile and Bartness, 1992). Les variations des taux d'hormones thyroïdiennes liées à la photopériode ne semblent donc pas jouer un rôle majeur dans le contrôle de la masse corporelle chez cette espèce. Le fait que ces animaux conservent une thyroïde active pendant l'hibernation, au contraire des

spermophiles et des marmottes (Hulbert and Hudson, 1976; Young et al., 1979), pourrait être lié à leur comportement d'accumulation de réserves pré-hibernatoires (Hudson and Wang, 1979). Ils amassent de la nourriture avant l'hibernation et se nourrissent entre les épisodes de torpeur, alors que les spermophiles et marmottes accumulent des réserves internes. Les hormones thyroïdiennes pourraient avoir une action anabolique au cours des phases de réchauffement et d'euthermie.

Chez le loir, un hibernant saisonnier, l'hibernation peut se produire même avec une forte activité de la thyroïde (Lachiver, 1964). Etant une espèce arboricole qui hiberne dans des endroits peu protégés contrairement aux spermophiles et aux marmottes, le loir pourrait avoir besoin d'élever périodiquement sa thermogénèse pour éviter que sa température corporelle ne diminue en-dessous d'un niveau critique (Hudson and Wang, 1979).

(g) Les hormones de la reproduction

Les entrées et sorties d'hibernation sont étroitement liées à la reproduction (Jonasson et Willis, 2011; Michener, 1979), ce qui suggère des fluctuations saisonnières dans la sécrétion d'hormones et la sensibilité des tissus cibles pouvant être impliquées à la fois dans l'hibernation et dans la reproduction (Pévet, 1988). Ainsi, une injection de testostérone inhibe totalement les torpeurs journalières chez le hamster Sibérien (Ouarour et al., 1991; Ruby et al., 1993), et empêche l'entrée en hibernation chez le spermophile à manteau doré (Lee et al., 1990). De même, une castration induit un retard de la sortie d'hibernation chez le hamster Sibérien (Ouarour et al., 1991). Des résultats similaires ont été obtenus chez le hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*) (Darrow et al., 1988). Il semblerait donc que la diminution de la sécrétion de testostérone soit essentielle à l'initiation de l'hibernation et à l'expression des torpeurs. Chez le hamster d'Europe femelle, une inhibition de l'utilisation

des torpeurs peut être induite par un traitement à l'œstradiol mais pas par un traitement à la progestérone, tandis qu'un traitement combiné induit un effet plus fort qu'avec l'œstradiol seul (Darrow et al., 1988). Il a été mis en évidence chez le hamster Sibérien femelle qu'une injection de prolactine induit un arrêt de l'utilisation des torpeurs journalières au cours de l'hiver mais pas au cours de l'été (Ruby et al., 1993). Cela laisse supposer que les torpeurs estivales sont sous contrôle d'un mécanisme moins sensible aux variations de prolactine circulante.

(h) Les protéines HP

Des données suggèrent que chez les tamias (*Tamias sp.*), la variation saisonnière d'un groupe de quatre protéines hépatiques spécifiques de l'hibernation appelées HP (Hibernation proteins) joue un rôle permissif essentiel dans la régulation des torpeurs. Trois des quatre protéines (HP20, 25 et 27) forment un complexe appelé HP20c. Celui-ci est associé dans le sang à une protéine de plus haut poids moléculaire (HP55) pour former un complexe appelé HPc (Hastings et Ebling, 2006; Kondo et Kondo, 1992). Selon un rythme circannuel qui est corrélé avec le cycle d'hibernation, une certaine quantité de HPc sanguin passe dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Ceci est suivi de la dissociation des HP55 du complexe HP20c, ce qui conduit à une augmentation de HP20c dans le LCR. Dans le même temps, la production de protéines HP et leur taux sanguin diminuent (Fig. 13).

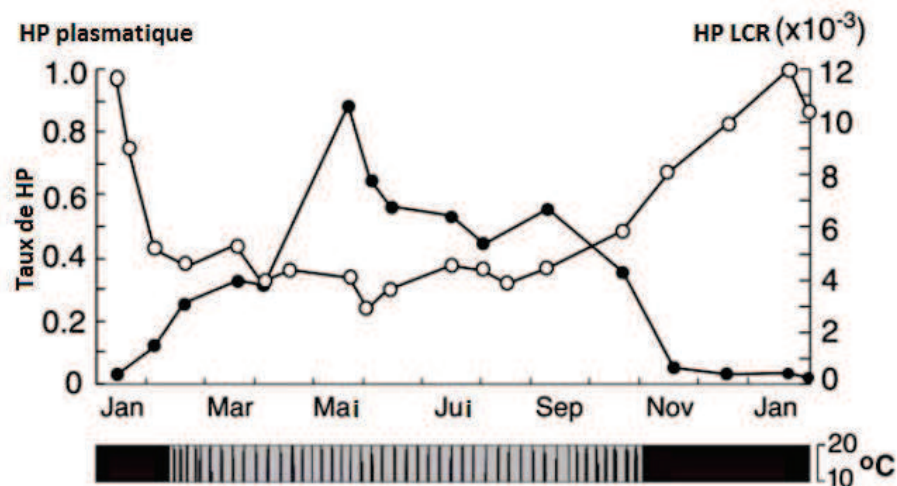


Figure 13 Variation annuelle des taux d'HP plasmatique (disques blancs) et dans le LCR (disques noirs) chez le tamia Asiatique (*Tamias sibiricus*). Le graphique du bas représente la température corporelle correspondante. Adapté de Kondo et al. 2006.

Bien que la fonction de HP20c soit inconnue, on suppose que ce complexe protéique joue un rôle dans la préparation et l'adaptation cellulaire saisonnière nécessaire à l'hibernation. En effet, les animaux qui n'hibernent pas ne présentent pas de diminution de leur taux de protéines HP plasmatique, ni d'augmentation des taux du complexe HP20c dans le LCR. En outre, des anticorps anti-HP20c administrés par voie intracérébroventriculaire (ICV) induisent une émergence de torpeur (Kondo et al., 2006). Le complexe protéique n'induirait pas directement la torpeur puisque la diminution des taux de protéines HP sanguins et leur augmentation dans le LCR sont déclenchées avant le début de l'hibernation et sont maintenues tout au long de la saison d'hibernation malgré les phases d'euthermie périodiques. Le complexe HP fournirait plutôt un signal hormonal permissif, essentiel à l'hibernation et qui est régulé par un rythme circannuel endogène (Kondo et al., 2006).

(i) Les prostaglandines

Les prostaglandines sont des hormones d'action locale issue du métabolisme de l'acide arachidonique par la voie de la cyclooxygénase. Elles jouent un rôle dans des mécanismes variés allant de la vasodilatation, la coagulation, la fonction immunitaire à la contraction des muscles lisses (Friedman et al., 2015; Kawahara et al., 2015; O'Brien et al., 2014; Parajuli et

al., 2014). La prostaglandine D2 (PGD2) est connue pour induire le sommeil, réduire la perception de la douleur, induire une vasodilatation, et jouer un rôle dans la réponse immunitaire (Minami et al., 1996; Ricciotti and FitzGerald, 2011; Urade and Hayaishi, 2000; Xue et al., 2015). La prostaglandine E2 (PGE2) régule la réponse immunitaire, la pression sanguine, la fertilité, l'inflammation mais également la fièvre (Ricciotti and FitzGerald, 2011; Wilhelms et al., 2014). Une étude chez le tamia Asiatique (*Tamias sibiricus*) a mis en évidence une augmentation saisonnière de la PGD2 (Takahata et al., 1996).

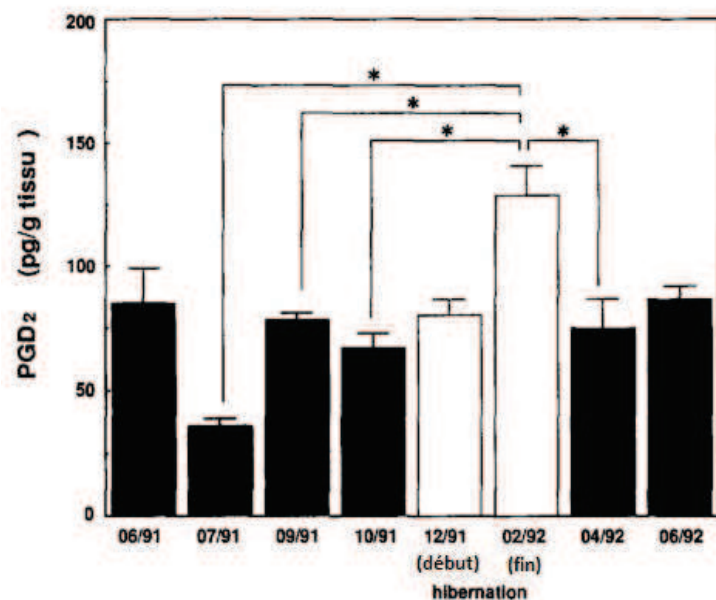


Figure 14 Variation saisonnière du contenu cérébral en PGD2 du tamia Asiatique. Les données sont représentées en moyenne±SEM. L'étoile (*) indique une différence statistiquement significative. Adapté de Takahata et al. 1996.

Chez le spermophile à manteau doré, une diminution de la quantité d'ARNm de la PGD2 synthase est observée au cours de la torpeur avec un retour à un niveau d'expression élevé au cours de la sortie de torpeur dans l'hypothalamus et au cours des phases d'euthermie dans le proencéphale et le cortex (O'Hara et al., 1999); de plus, une injection ICV de prostaglandine E2 provoque une émergence d'hibernation (Prendergast et al., 2002). Le proencéphale est la région la plus sensible à l'action promotrice du sommeil de la PGD2 (Matsumura et al., 1994). Cela pourrait être lié à l'hypersomnie observée en début d'euthermie inter-torpeur (Trachsel et al., 1991).

B. Stratégies d'accumulation de réserves

De nombreuses espèces hibernantes s'engraissent avant l'hibernation et utilisent leurs réserves de lipides endogènes pour survivre à l'hiver. Quelques espèces stockent de la nourriture ou utilisent une combinaison des deux stratégies. On distingue ainsi deux catégories d'hibernants : les fat-storing qui engraisent avant la période d'hibernation, et les food-storing qui stockent de la nourriture (Humphries et al., 2003a).

1. Les espèces hibernantes fat-storing

La grande majorité des hibernants saisonniers sont des fat-storing. Dans ce groupe, on retrouve notamment les marmottes (*Marmota sp.*), les spermophiles (*Spermophilus sp.*), les chauves-souris (famille des *Vespertilionidae* et *Rhinolophus sp.*), et les marsupiaux (*Burramys sp.*, *Cercartetus sp.*, *Tachyglossus*).

La durée des épisodes de torpeur des hibernants fat-storing varient de quelques jours en début et fin d'hibernation à un maximum de plus de vingt jours (French, 1985) en milieu d'hibernation. Les phases d'euthermie observables au cours de l'hibernation ne durent que quelques heures (Humphries et al., 2001) (Fig. 15).

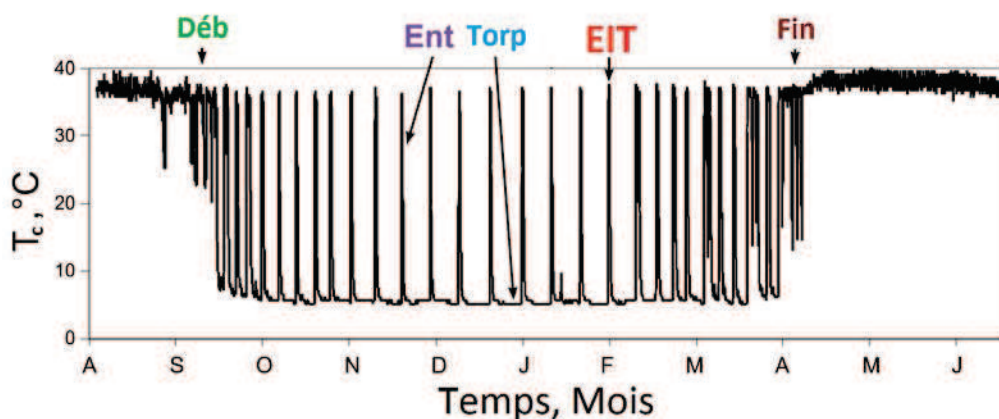


Figure 15 Température corporelle (T_c) d'un hibernant fat-storing (spermophile rayé (*Spermophilus tridecemlineatus*)) au cours de l'année. Une phase d'hibernation est clairement visible. En début (Déb) et en fin (Fin) d'hibernation, les torpeurs sont moins profondes et plus courtes. Les différentes phases de la torpeur sont bien visibles en milieu d'hibernation : l'entrée en torpeur (Ent), la torpeur (ici fin d'un épisode de torpeur (Torp)) et l'euthermie intertorpeur (EIT). Adapté de Epperson et al., 2011.

Une rythmicité est observable chez les animaux fat-storing concernant la variation de leur masse corporelle au cours de l'année. Des phases bien distinctes peuvent être observées chez ces animaux (Fig. 16).

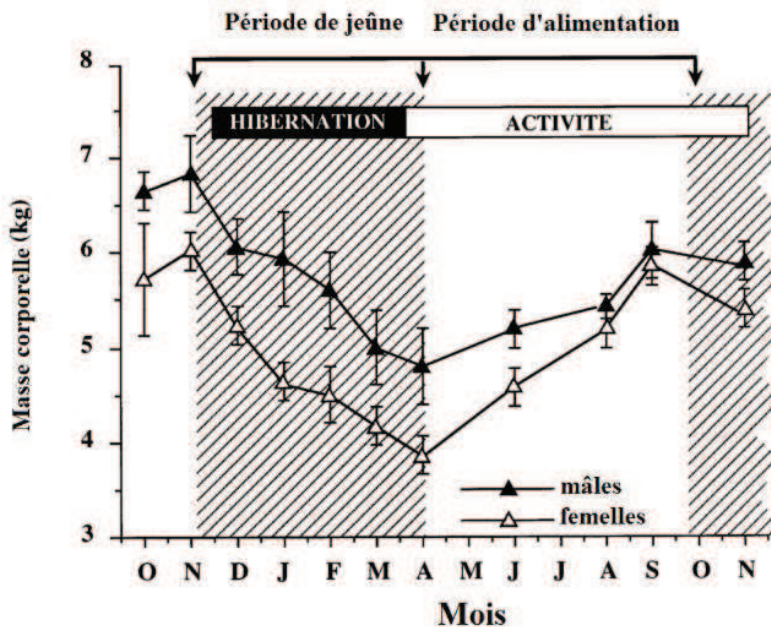


Figure 16 Evolution de la masse corporelle de la marmotte alpine (*Marmota marmota*) au cours d'un cycle annuel. La masse corporelle des mâles (triangles pleins) et des femelles (triangles vides) est exprimée en kilogramme. Adapté de Cochet et al., 1999.

Les animaux présentent avant l'hibernation une phase d'engraissement (Armitage et al., 1976) tout à fait remarquable. Le spermophile à manteau doré double sa masse corporelle et triple son adiposité (qui atteint 35%-40% de la masse corporelle) en cinq à sept semaines avant l'hibernation (Kenagy and Barnes, 1988; Morton, 1975). Le spermophile à longue queue (*Spermophilus undulatus*) double également sa masse corporelle au cours d'une saison active beaucoup plus courte (quatre mois actif, huit mois en hibernation) (Galster et Morrison, 1976). La masse corporelle de la marmotte à ventre jaune augmente de 150% (de 3kg à 4,5kg) en quatre mois et sa masse adipeuse triple (20% de la masse corporelle en début d'hibernation) (Florant et al., 2004). Les variations des taux de lipides plasmatiques reflètent les changements d'adiposité observés au cours de la phase de mise en réserve (Huang et Morton, 1976).

Les spermophiles et marmottes mâles commencent à accumuler des réserves après l'accouplement et la synthèse des acides gras (AG) dans le tissu adipeux brun (TABr), le foie et le TABl augmentent concomitamment (Bintz, 1988; Huang et Morton, 1976). Chez les femelles allaitantes, la synthèse des acides gras diminue jusqu'à ce que les jeunes soient sevrés et l'accumulation de lipides peut ainsi être retardée jusqu'à sept semaines par rapport aux mâles (Bintz, 1988; Huang and Morton, 1976).

Le pic maximal de prise alimentaire, d'adiposité et de masse corporelle ne s'observe pas au même moment, tout comme les valeurs de vallée de ces paramètres (Dark, 1984). La prise alimentaire commence à diminuer bien avant que le maximum de masse corporelle ne soit atteint (Dark, 2005). Ce résultat, qui pourrait sembler contre-intuitif, découle de la baisse de la dépense énergétique pendant la phase de gain de masse corporelle. Au cours de l'année, la consommation d'oxygène (qui retranscrit l'activité métabolique), la prise alimentaire, et le cycle de variation de masse corporelle ne sont pas synchronisés (Armitage et Shulenberg, 1972; Ward et Armitage, 1981). Au printemps, la consommation d'oxygène croît avant l'augmentation de la prise alimentaire, entraînant une baisse de la masse corporelle, tandis qu'au milieu de l'été, une diminution de la dépense énergétique, survenant plusieurs semaines avant la diminution de la prise alimentaire, améliore le stockage de lipides. Les marmottes à ventre jaune présentent une baisse d'intensité métabolique au cours de la phase de gain de masse, celle-ci ayant diminué de près de moitié à la fin de cette phase (Thorp et al., 1994) (Fig. 17).

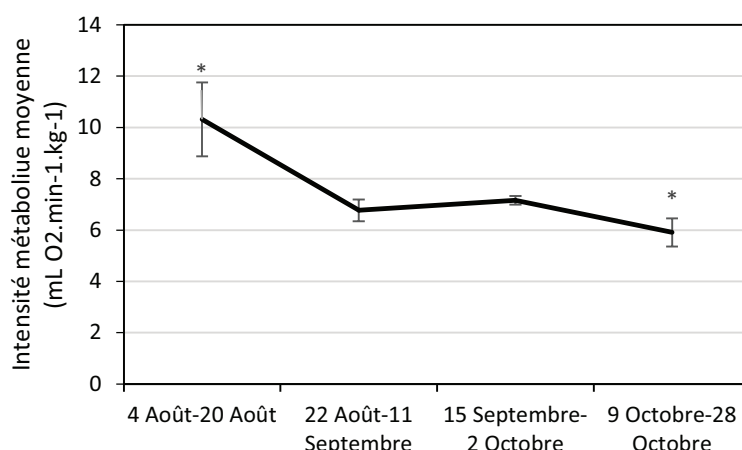


Figure 17 Intensité métabolique moyenne pendant l'été et l'automne chez la marmotte à ventre jaune. Les données sont représentées en moyenne $\pm$ SEM. L'étoile (*) indique une différence statistiquement significative. Adapté de Thorp et al. 1994.

Certains animaux vont encore plus loin dans l'épargne énergétique afin d'optimiser le stockage de réserves corporelles : une chauve-souris, l'oreillard roux (*Plecotus auritus*) utilise la torpeur journalière pour améliorer le stockage de lipides avant la saison d'hibernation (Speakman et Rowlet, 1999).

Les espèces fat-storing comme le spermophile à manteau doré présentent une perte de masse programmée pendant l'hiver, de sorte que les animaux peuvent ajuster la vitesse de perte de masse adipeuse pour atteindre un seuil de réserve à la fin de l'hibernation (Mrosovsky, 1976). Les animaux les plus gras présentent donc une plus grande perte de masse au cours de l'hibernation en comparaison aux animaux plus maigres, en modulant la fréquence et la profondeur des torpeurs.

2. Les espèces hibernantes food-storing

Dans ce groupe, on retrouve notamment certaines espèces de hamsters [d'Europe, doré, nain (*Cricetulus triton*)], les tamias (*Tamias sp.*), ainsi que la souris à abajoues des pinèdes (*Perognathus parvus*).

Plusieurs théories ont été développées pour tenter d'expliquer cette stratégie de stockage externe. French (1988) a proposé que le stockage de nourriture plutôt que l'augmentation

d'adiposité permettrait aux petits mammifères de réaliser un stockage de réserves virtuellement illimité. De plus, l'augmentation d'adiposité entraîne des coûts énergétiques accrus associés à la locomotion, ainsi qu'une augmentation du risque de prédation liée à une perte de mobilité (Witter et Cuthill, 1993). Bien que ces coûts soient peu susceptibles d'être appliqués à la période d'hibernation, ils peuvent influencer sur les avantages de la stratégie fat-storing en raison de l'importance de ces paramètres avant et après la saison d'hibernation. Cependant, ce paramètre peut être grandement influencé par une vie en communauté permettant une meilleure protection face aux prédateurs. A l'inverse, les réserves de nourriture pouvant être pillées ou dégradées et étant moins rapidement disponibles que les réserves corporelles, Davis (1976) a suggéré que le stockage de nourriture serait une stratégie moins efficace pour l'hibernation. En outre, en raison du risque de chapardage, il pourrait y avoir nécessité de les stocker à proximité de l'hibernant, où les conditions environnementales seraient plus adaptées aux besoins physiologiques de l'animal qu'à la conservation optimale des réserves (Wall, 1990). Enfin, les conséquences négatives potentielles du stockage de nourriture au cours de l'hibernation incluent la nécessité du maintien des capacités de digestion et d'absorption durant l'hibernation induisant un coût énergétique supplémentaire pour l'animal. Afin d'évaluer si les stratégies fat-storing et food-storing sont associées à la taille du corps (facteur limitant le volume des réserves internes) ou au régime alimentaire, une revue s'est intéressée aux données concernant le régime alimentaire, la masse corporelle, et le mode de stockage d'énergie pré-hibernatoire chez des mammifères (Humphries et al., 2003a). La conclusion de cette revue est que le recours à la stratégie food-storing coïncide avec les régimes granivores mais pas avec la taille du corps. Quatre des cinq groupes granivores sont food-storing, et les onze groupes non granivores sont fat-storing. Seul le loir poursuit une stratégie intermédiaire, ainsi que quelques

hibernants répertoriés comme fat-storing (par exemple, *Spermophilus sp.*, *Burramys sp.*), complétant leurs réserves corporelles avec de la nourriture amassée. Même chez ces espèces, les graines sont l'aliment qui constitue la majorité des réserves (Wall, 1990), alors qu'elles ne représentent qu'une faible proportion de l'alimentation lors de la période d'activité. L'association entre le régime granivore et le stockage alimentaire reflète le grand intérêt de stocker des graines plutôt que d'autres types d'aliments. Les graines sont maintenues dans un état de dormance pendant de longues périodes (Smith et Reichman, 1984) et font donc partie des aliments les moins périssables consommés par les mammifères hibernants (Wall, 1990). De plus, elles sont riches en énergie et hautement digestibles (Robbins, 1983), présentant donc un rendement énergétique plus grand par volume stocké que les autres types d'aliments. En outre, parce que leur composition est presque exclusivement glucidique et lipidique, la consommation de graines pendant l'hibernation n'impose aucun stress hydrique lié à l'élimination des déchets azotés issus de la dégradation des protéines.

Les épisodes de torpeur des hibernants food-storing sont beaucoup plus courts que ceux des hibernants fat-storing (Humphries et al., 2001). Ces durées varient de quelques heures en début et fin d'hibernation jusqu'à sept à huit jours en milieu d'hibernation (Hut et al., 2002; Wollnik et Schmidt, 1995). Les phases d'euthermie observables au cours de l'hibernation sont plus longues que chez les espèces fat-storing (Humphries et al., 2001) afin de permettre une réalimentation et peuvent durer plus de 24h (Munro et al., 2005)(Fig. 18).

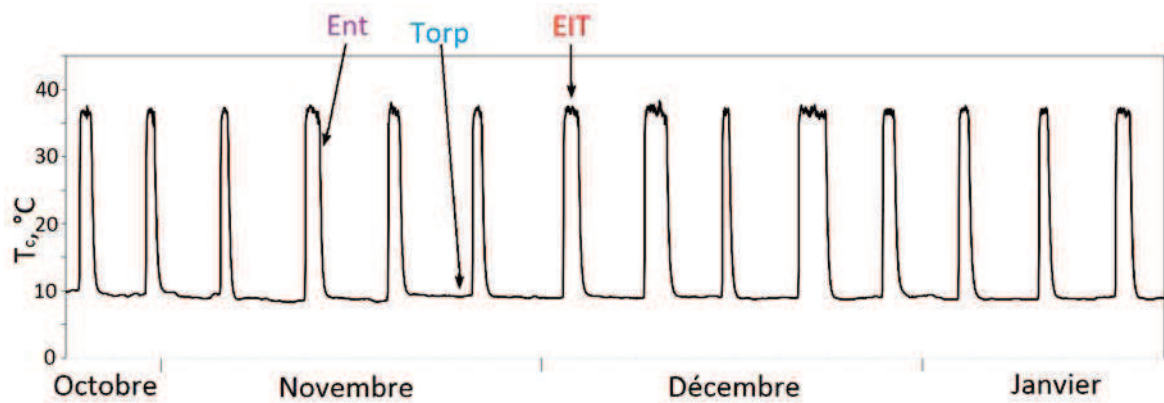


Figure 18 Température corporelle (T_c) d'un hibernant food-storing (Hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*) en milieu de phase d'hibernation. Les différentes phases d'un épisode de torpeur sont bien visibles : l'entrée en torpeur (Ent), la torpeur (ici fin d'un épisode de torpeur (Torp)) et l'euthermie inter-torpeur (EIT). Données personnelles.

Tout comme chez les animaux fat-storing, on observe des variations saisonnières de la masse corporelle chez les hibernants food-storing, mais de plus faible amplitude (15-30% de gain de masse corporelle) (Levesque and Tattersall, 2010; Masson-Pevet et al., 1994a). Même si ces animaux utilisent principalement leurs réserves de nourriture pour subvenir à leurs besoins durant la période d'hibernation, ils présentent une perte de masse au cours de cette phase (Humphries et al., 2003b; Levesque et Tattersall, 2010)(Fig. 19).

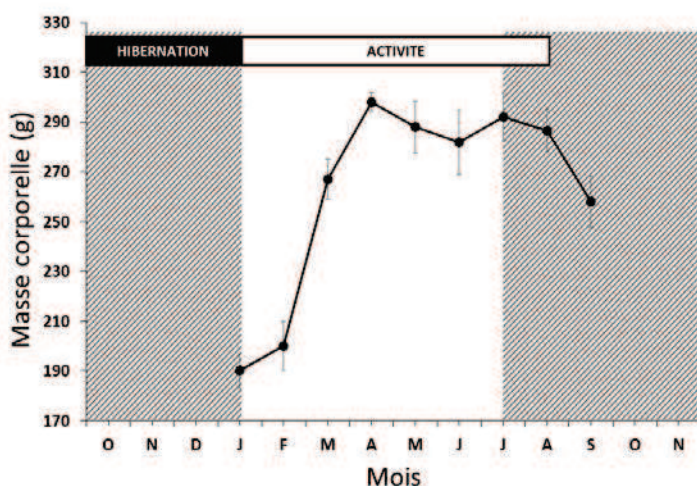


Figure 19 Evolution de la masse corporelle de hamsters d'Europe (*Cricetus cricetus*) femelles ($n=10$) au cours d'un cycle annuel. La masse corporelle est exprimée en gramme ($\pm$ SEM). Les animaux sont soumis à un cycle photopériodique non-naturel dans lequel la photopériode longue (Lumière/Obscurité 14h/10h) débute en janvier pour s'achever en juillet (zone non hachurée), d'où la sortie d'hibernation avancée d'environ 2 mois si on compare ce cycle à celui d'espèces food-storing suivies en conditions naturelles. Données personnelles.

Malgré la disponibilité et la consommation de nourriture au cours de l'hibernation, les espèces food-storing utilisent également leurs réserves adipeuses au cours des épisodes de torpeur (Humphries et al., 2001; Levesque and Tattersall, 2010).

C. Le métabolisme intermédiaire au cours de l'hibernation

Bien qu'elle soit une phase d'économie d'énergie, l'hibernation est également une phase pendant laquelle l'organisme fonctionne et continue de consommer des substrats énergétiques et produire des déchets, en particulier au cours des phases de réchauffement et d'euthermie.

De nombreuses études sont disponibles sur l'utilisation des substrats énergétiques au cours de l'hibernation. Les adaptations des hibernants fat-storing sont similaires aux adaptations que l'on peut observer lors des jeûnes de longue durée (plusieurs mois) : ils privilégient l'utilisation des réserves lipidiques pour couvrir les besoins énergétiques, épargnant les réserves protéiques (Wang et Lee, 2011).

1. Le glucose

La glycémie reste remarquablement stable tout au long de l'hibernation à des niveaux inchangés ou plus élevés par rapport à la période d'activité chez les spermophiles et les marmottes (Florant et al., 1986; Krilowicz, 1985; Nizielski et al., 1989; Tashima et al., 1970; Twente et Twente, 1967). Chez les loirs hibernants, la glycémie est également stable mais à des niveaux réduits en comparaison à la période d'activité (Castex et al., 1984). Ceci s'explique par un maintien de la néoglucogenèse tout au long de l'hibernation des espèces fat-storing afin d'assurer un approvisionnement constant de glucose aux organes l'utilisant préférentiellement pour fonctionner, notamment le système nerveux (Hawkins et Biebuyck, 1979) et les muscles (Krilowicz, 1985). Ceci est permis grâce à l'action du glucagon, comme

détaillé dans la partie « Hormones pancréatiques » (p 19-21). Le glucose se révèle également nécessaire à la fin des phases de réchauffement via l'utilisation de la thermogenèse avec frisson (Hindle et al., 2011) en relais de la thermogenèse sans frisson par le tissu adipeux brun (TABr) (dont le substrat majeur est lipidique) qui permet l'initiation de la phase de réchauffement. Bien que la capacité néoglucogénique à partir des acides aminés soit augmentée pendant l'hibernation (Burlington et Klain, 1967), il n'y a pas ou peu d'atrophie musculaire pendant cette période (Lyman et al., 1982). L'épargne protéique peut facilement s'expliquer par la nécessité de conserver une masse musculaire suffisante pour se réalimenter et se reproduire en fin d'hibernation mais également lors des phases de réchauffement pour utiliser la thermogenèse avec frisson (Hindle et al., 2011). Une étude sur le spermophile Arctique, qui peut présenter une température corporelle inférieure à 0°C au cours des torpeurs, a cependant montré que les substrats de la néoglucogenèse au cours de l'hibernation étaient composés pour un quart de protéines (acides aminés glucoformateurs) et pour trois quarts de lipides (glycérol provenant des triglycérides) (Galster et Morrison, 1975). Cependant, cette espèce présente la particularité de procéder à un accroissement de sa masse musculaire en période pré-hibernatoire (via une augmentation des concentrations circulantes d'androgènes) afin d'accroître ses réserves de protéines et pouvoir ainsi les cataboliser lorsque la néoglucogenèse à partir du glycérol ne fournit pas assez de glucose (Boonstra et al., 2011).

L'oxydation de glucose est réduite pendant l'hibernation chez le spermophile à manteau doré (Tashima et al., 1970), et chez le spermophile rayé (Nizielski et al., 1989). En effet, un certain nombre d'enzymes clés de la glycolyse (par exemple, la pyruvate déshydrogénase et la pyruvate phosphofructokinase) voient leur activité supprimée pendant l'hibernation (Brooks et Storey, 1992; Buck et al., 2002). Bien que la glycolyse puisse être inhibée, cet effet

est réversible car l'oxydation des glucides peut reprendre au cours de la torpeur si un animal est soumis à une température ambiante négative (Buck et Barnes, 2000).

Chez les espèces food-storing (le hamster doré, par exemple), la glycémie pendant la torpeur est maintenue à une valeur similaire à celle observée pendant les phases d'euthermie, ceci étant dû à la glycogénolyse hépatique (Musacchia and Jansky, 1981). Les hamsters utilisent des glucides comme source d'énergie lors des réveils, comme en témoigne la diminution des réserves de glycogène du foie et des muscles lors de la sortie de torpeur (Lyman and Leduc, 1953).

2. Les lipides

Le fait que l'adiposité de la plupart des hibernants, tel que le hérisson Européen augmente pendant l'été et diminue pendant l'hibernation laisse supposer que les lipides stockés sont le principal substrat utilisé pendant l'hibernation (Konttinen et al., 1964). La diminution de l'adiposité est associée à une diminution des concentrations plasmatiques en acides gras libres (AGL) au cours de l'hibernation (Konttinen et al., 1964). Néanmoins, chez certains hibernants, tels que le spermophile de Belding (*Spermophilus beldingi*) et le spermophile rayé (Krulowicz, 1985; Nizielski et al., 1989), les concentrations plasmatiques en AGL au cours de l'hibernation ne diffèrent pas des valeurs observées durant les phases d'euthermie. Ces données sont difficiles à interpréter, car elle témoigne d'une utilisation des TG stockés mais n'informent pas du devenir de ces AGL. Les concentrations en triglycérides diminuent nettement au cours des torpeurs (Nizielski et al., 1989). Les AGL peuvent être oxydés mais contribuent également à la cétogenèse hépatique. Les concentrations plasmatiques des corps cétoniques (acétoacétate et β -hydroxybutyrate) augmentent au cours des torpeurs des hibernants fat-storing (Krulowicz, 1985; Nizielski et al., 1989; Rauch et Behrisch, 1981). Ils

sont utilisés comme combustibles métaboliques dans plusieurs organes, dont le cerveau, et semblent également contribuer à l'épargne de glucose observée au cours de la torpeur en inhibant son absorption par le muscle (Krillowicz, 1985).

Les valeurs de quotient respiratoire (QR) calculées à partir de mesures de la consommation d'O₂ et de la production de CO₂ pendant l'hibernation apportent des preuves convaincantes quant à l'oxydation quasi exclusive des acides gras pendant la torpeur (QR proche de 0,7)(Lyman et Chatfield, 1955; Mokrasch et al., 1960; Snapp et Heller, 1981). Le métabolisme cellulaire, limité durant la torpeur, est donc alimenté par l'oxydation des AGL et/ou leur conversion en corps cétoniques. Ces AGL proviennent *in fine* de la lipolyse au niveau du tissu adipeux blanc (TABl) dont l'enzyme clé, la triacylglycérol lipase (Bauer et al., 2001; Squire et al., 2003), continue de fonctionner à de très basses températures sans contrôle hormonal (Squire et al., 2003), au contraire de la lipase hormono-sensible dont l'activité dépend notamment des niveaux d'insuline et de glucagon (Squire et al., 2003).

La température corporelle continue d'être régulée au cours des torpeurs, de sorte que si la température ambiante induit une diminution de la température corporelle (T_c) en deçà de la température de consigne hypothalamique, l'intensité métabolique augmente pour maintenir la température corporelle. L'augmentation de l'intensité métabolique chez le spermophile Arctique exposé à une température ambiante inférieure à 0°C induit une augmentation de la valeur du QR (jusqu'à environ 1), indiquant une augmentation de l'utilisation des glucides (Buck et Barnes, 2000) ou une élimination du CO₂ accumulé pendant les torpeurs (Wang and Lee, 2011). Les acides gras sont les substrats énergétiques majoritairement utilisés pendant les torpeurs, mais un complément glucidique est requis pour assurer le maintien de la

température de consigne dans des situations extrêmes où la température ambiante est très basse (Buck and Barnes, 2000).

Chez les espèces food-storing, une exposition au froid juste avant l'hibernation du hamster doré induit une augmentation de quatre à six fois des capacités *in vitro* de la lipogenèse à partir d'acétate dans le TABI (Baumber and Denyes, 1964). Cette capacité lipogénique accrue est conservée pendant l'hibernation, contrairement aux espèces fat-storing chez qui la capacité lipogénique est inhibée avec le début de l'hibernation. Compte-tenu du fait que les hamsters ne présentent pas d'engraissement pré-hibernatoire comparable à celui d'hibernants fat-storing, mais utilisent les lipides stockés dans le TABI au cours de l'hibernation (Nedergaard and Cannon, 1984), l'activité lipogénique renforcée pendant la phase d'hibernation peut être fonctionnellement importante pour les hamsters afin de reconstituer des réserves de lipides lors des phases d'euthermie.

D. Les adaptations digestives

Du fait de stratégies d'accumulation d'énergie différentes, les hibernants food-storing et fat-storing présentent des mécanismes d'adaptation différents, notamment au niveau du système digestif. En effet, les espèces food-storing doivent être capables de se réalimenter efficacement lors des épisodes d'euthermie inter-torpeurs.

Les espèces fat-storing présentent une atrophie prononcée du tractus intestinal pendant l'hibernation (Carey, 1990; Carey, 1995; Carey et Sills, 1992; Hume et al., 2002). Chez le spermophile rayé, il a été observé une diminution de la longueur et de la densité des villosités du jéjunum ainsi qu'une diminution de la masse de muqueuse et du contenu en protéines au cours de l'hibernation par rapport à la phase estivale (Carey, 1990) (Fig. 20).

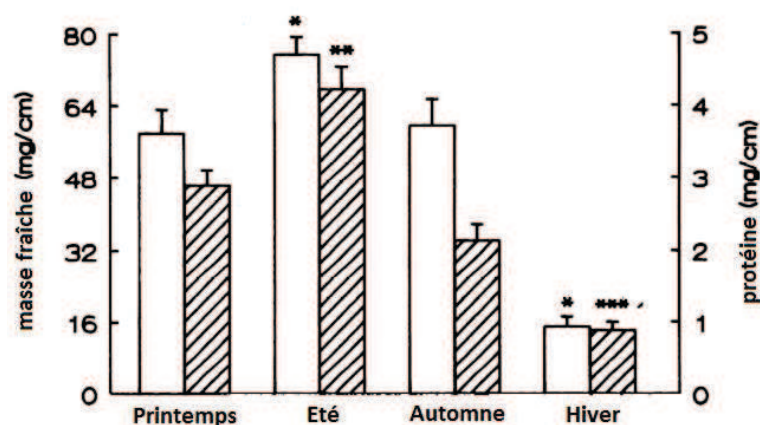


Figure 20 Masse fraîche de muqueuse (histogrammes blancs) et contenu en protéines (histogrammes hachurés) du jéjunum de spermophile rayé au cours de l'année. Les données sont représentées en moyenne $\pm$ SEM. L'étoile (*) indique une différence statistiquement significative. Adapté de Carey 1990.

Chez la marmotte alpine, une diminution de la masse fraîche des tissus de la totalité du tractus digestif (estomac, intestin grêle, caecum et côlon) est observée au cours de l'hibernation (Hume et al., 2002). L'atrophie des organes du système digestif est une conséquence du jeûne et permet de limiter le turnover protéique qui est très coûteux en énergie (Macrae et Loble, 1986; Young et al., 1983). Cependant, une augmentation de la densité des microvillosités a été observée chez ces espèces (Carey and Sills, 1996). Certains gènes codant pour des enzymes intestinales comme la sucrase-isomaltase sont exprimés en continu pendant toute l'hibernation (Carey et Martin, 1996), alors que l'expression du gène codant pour l'amylase est réduite d'environ 40% dans le pancréas (Balslev-Clausen et al., 2003). En outre, des études réalisées sur l'intestin isolé de spermophiles révèlent un maintien de l'absorption du glucose et des acides aminés (à 37°C) jusqu'à au moins six semaines d'hibernation (Carey et Sills, 1992; Carey et Sills, 1996). Comme cela a été suggéré par Carey et Sills (1996), le maintien des capacités d'absorption intestinale au cours de l'hibernation devrait permettre l'absorption assez rapide de nutriments à l'émergence d'hibernation.

Au contraire des individus fat-storing dont le tractus digestif s'atrophie au cours de l'hibernation, les animaux food-storing semblent maintenir un système digestif totalement fonctionnel pendant cette période. Une étude de modélisation a montré que l'efficacité

digestive était renforcée par l'expression de torpeurs chez le tamia rayé (Humphries et al., 2001). L'activité des enzymes digestives (saccharase isomaltase et aminopeptidase) est conservée pendant la torpeur chez les espèces food-storing, comme observé chez le hamster d'Europe par des mesures *in vitro* (Galluser et al., 1988). Cependant, l'ingestion d'aliments est ralentie par une perte de coordination musculaire pendant la torpeur (Choi et al., 1998). Ainsi, les contraintes sur les capacités maximales d'ingestion et de vidange de l'estomac pendant les phases d'euthermie inter-torpeurs ont pour effet une plus grande fréquence de phases d'euthermie chez les hibernants food-storing que chez les hibernants fat-storing (Humphries et al., 2001). Il en résulte un coût énergétique supplémentaire pour maintenir un système digestif fonctionnel tout au long de l'hiver (Cossins et Roberts, 1996).

E. L'influence de l'alimentation sur le cycle annuel

La composition des aliments consommés avant ou pendant l'hibernation, ainsi que l'état des réserves des hibernants, sont des facteurs primordiaux conditionnant le déroulement de l'hibernation mais également de la reproduction.

1. Impact de l'alimentation sur l'hibernation

L'énergie utilisée pendant l'hibernation provient principalement des lipides stockés dans le TABI sous forme de triglycérides (TG), composés d'une molécule de glycérol et de trois molécules d'acide gras. La nature des acides gras contenus dans le tissu adipeux est variable et dépend du régime alimentaire. Bien que les mammifères puissent synthétiser des acides gras saturés (AGS), monoinsaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI) *de novo*, ils ne peuvent pas synthétiser certains AGPI (ω -6 et ω -3). Or, ceux-ci sont essentiels, notamment parce qu'ils entrent dans la composition des membranes cellulaires mais également car ils sont les précurseurs de molécules régulant certaines fonctions cellulaires, comme les

prostaglandines impliquées dans le comportement thermorégulateur (Gurr et al., 2002; Wathes et al., 2007). Comme la température corporelle (T_c) peut diminuer durant les torpeurs jusqu'à 1°C - 3°C , soit 20°C à 25°C en-dessous du point de fusion des lipides que l'on trouve chez les mammifères non-hibernants, la relation entre les T_c faibles et la perte de fluidité lipidique dans le TABI, ainsi que dans les membranes cellulaires, pourrait poser un problème en termes de maintien des fonctions cellulaires (Aloia et Raison, 1989; Geiser, 1990) : la fluidité membranaire dépend du degré de saturation des acides gras qui les composent, le point de fusion des TG diminuant avec l'augmentation du contenu en AGPI (Frank and Storey, 1995; Geiser, 1990). Le maintien de la fluidité membranaire permet le maintien des fonctions cellulaires et mitochondriales à basse température (Aloia et Raison, 1989; Armstrong et al., 2011; Cremel et al., 1979) dont la lipolyse dans le TABI (Frank et Storey, 1995; Geiser, 1990).

L'acide palmitique, l'acide oléique et l'acide linoléique –respectivement un AGS, UN AGMI, et un AGPI- représentent environ 95% des acides gras trouvés dans l'alimentation et dans les lipides composant le TABI (Florant et al., 1990; Frank, 1994). Le contenu en AGMI et en AGPI du TABI est comparable et est plus élevé que le contenu en AGS (Dark, 2005). Les régimes riches en AGPI affectent de façon similaire l'hibernation des spermophiles à manteau doré, des marmottes à ventre jaune, des chiens de prairie à queue noire (*Cynomys ludovicianus*) et des spermophiles Arctiques (Florant et al., 1993; Frank, 1994; Frank et al., 2008; Harlow et Frank, 2001) en induisant une augmentation de la durée des épisodes de torpeur et une diminution de la T_c (Frank, 1992). Les marmottes recevant un régime alimentaire pauvre en AGPI continuent d'hiberner, mais leur T_c minimale observée est augmentée et la durée des torpeurs presque diminuée de moitié (Florant et al., 1993; Thorp et al., 1994). L'intensité métabolique au cours des torpeurs est significativement augmentée chez les animaux

déficients en AGPI, ce qui augmente concomitamment la dépense énergétique totale pendant l'hibernation, entraînant ainsi une accélération de la perte de masse corporelle. Comme on vient de le voir pour une consommation trop faible d'AGPI, une consommation excessive (plus de 62mg/g d'aliment) augmente la Tc minimale et diminue la durée des épisodes de torpeur (Frank et Storey, 1995), sauf chez le spermophile Arctique (Frank et al., 2008) où seule la durée des torpeurs est affectée. Il semble donc y avoir un taux optimal d'AGPI requis pour améliorer la qualité de l'hibernation. Par le biais d'expériences de préférences alimentaires, il a été mis en évidence que les spermophiles favorisent un régime modérément riche en AGPI presque trois fois plus qu'un régime très riche en AGPI. Si deux régimes sont proposés, l'un très riche en AGPI et l'autre très pauvre en AGPI, ils consomment des quantités approximativement égales de chacun (Frank et al., 1998). Pour le spermophile Arctique, il semblerait que cet optimum soit compris entre 33 et 74mg d'AGPI par gramme d'aliments (Frank et al., 2008).

L'AGPI prédominant obtenu à partir des plantes est l'acide linoléique (famille C18: 2 n-6, ω -6); toutefois, la nourriture des hibernants dans la nature présente des quantités mesurables d'un autre AGPI, l'acide linolénique (famille C18:3 n-3, ω -3). Or, il a été montré qu'une supplémentation de l'alimentation avec de l'huile de lin (riche en acide linolénique) augmente la proportion d'acide linolénique dans le TABI et diminue simultanément sa teneur en acide linoléique, provoquant une inhibition de l'hibernation chez la marmotte à ventre jaune mais également chez le hamster doré (Giroud et al., 2013; Hill et Florant, 2000). Les effets bénéfiques de l'acide linoléique sur l'hibernation pourraient simplement être considérés comme une adaptation aux changements saisonniers dans la composition en acides gras de l'alimentation, au moins chez les herbivores (ou chez leurs prédateurs). Ainsi, au printemps, les plantes sont majoritairement composées de parties vertes riches en n-3,

tandis que les n-6 devient de plus en plus abondant dans les fleurs et les graines en été (Hill et Florant, 1999). Cependant, une étude chez la marmotte Alpine démontre que les changements saisonniers dans la composition en acides gras du TABI péritonéal et sous-cutané ne reflètent pas les changements dans la composition du régime (Bruns et al., 2000). Les analyses des régimes alimentaires naturels de marmottes et de chiens de prairie indiquent que la consommation d'AGPI n-6 et n-3 est constante (Hill et Florant, 1999) ou fluctue de manière non systématique entre les saisons (Lehmer et Horne, 2001). En fait, l'évolution des teneurs en n-6 dans le contenu stomacal et dans les membranes des cellules cardiaques en période pré-hibernatoire chez la marmotte Alpine laisse supposer que ces animaux peuvent sélectionner les aliments riches en n-6 et augmenter l'incorporation de n-6 dans les membranes des cellules cardiaques juste avant l'hibernation (Arnold et al., 2011; Ruf et Arnold, 2008). Des augmentations de la composition en n-6 et des diminutions en n-3 ont également été observées dans le cœur de spermophiles hibernants soumis à un régime constant tout au long de l'année (Aloia et Pengelly, 1979). Cela laisse supposer une incorporation sélective des n-6 en préparation à l'hibernation, ce qui permettrait le fonctionnement d'une enzyme du réticulum sarcoplasmique, la Ca^{2+} ATPase 2a (SERCA), assurant le transport du calcium dans les cardiomyocytes et permettant le fonctionnement du cœur à des températures corporelles basses (Belke et al., 1991; Yatani, 2004). L'activité de la SERCA est en effet inhibée par les AG n-3 (Swanson et al., 1989; Taffet et al., 1993) alors qu'une proportion importante de n-6 dans les phospholipides de la membrane sarcoplasmique induit une augmentation de l'activité de la SERCA (Giroud et al., 2013) (Fig. 21) et détermine la Tc minimale qu'un hibernant peut tolérer au cours de la torpeur.

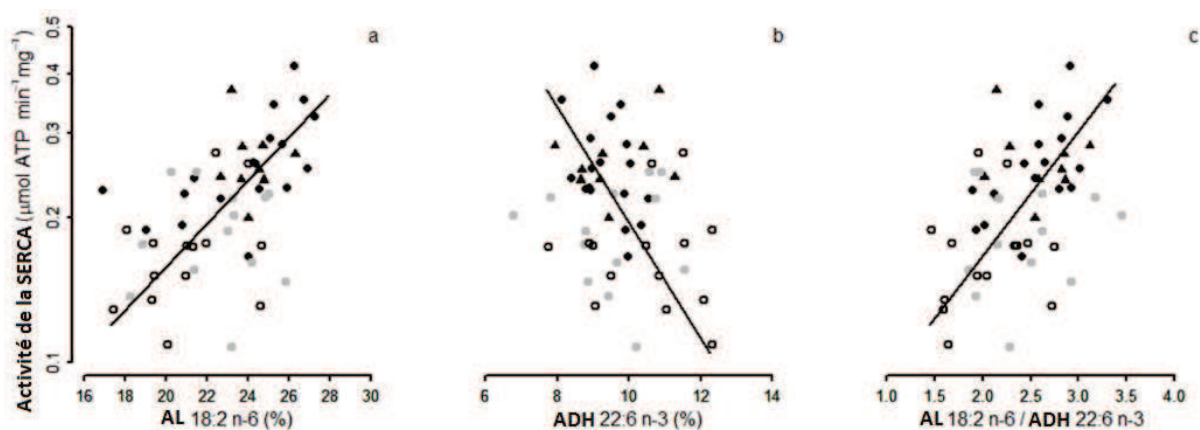


Figure 21 Activité de la SERCA en fonction des proportions (% du total d'acides gras) (a) d'acide linoléique (AL 18 :2 n-6), (b) d'acide docosahexanoïque (ADH 22 :6 n-3), et (c) du ratio AL/ADH dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. Les points noirs indiquent les données des animaux en torpeur, les triangles noirs celles des animaux en phase de refroidissement, les points gris celles des animaux en euthermie inter-torpeurs, et les cercles celles des animaux en été et non-hibernants en hiver. Adapté de Giroud et al. 2013.

L'enrichissement modéré de l'alimentation en acides gras polyinsaturés et leur stockage dans le tissu adipeux des hibernants permet une réduction du point de fusion de ces dépôts adipeux et leur mobilisation à basse température (Frank & Storey, 1995). En outre, les AGPI (n-6) permettent d'abaisser la température corporelle de consigne des hibernants et ainsi de diminuer leur dépense énergétique. Ceci permet d'allonger les périodes de torpeur, de réduire le nombre de réveils, d'économiser davantage d'énergie au cours du cycle, et d'acquérir une meilleure condition corporelle à l'émergence (Dark, 2005). L'utilisation des AGPI durant les torpeurs présente cependant un inconvénient majeur : en effet, les AGPI ont une plus grande propension à la peroxydation que les AGS ou les AGMI (Catalá, 2013). En outre, la torpeur induit une augmentation du taux de peroxydation, et les peroxydes formés par ce processus sont des toxines cellulaires (Carey et al., 2000; Frank et al., 1998). Cependant, les taux d'antioxydants cellulaires (par exemple, l'ascorbate) augmentent pendant l'hibernation (Drew et al., 2002; Tøien et al., 2001), et les hibernants consomment une quantité optimisée d'AGPI. La consommation d'AGPI par les hibernants résulte donc

d'un compromis entre les bénéfices et le stress oxydant engendré par ces molécules au cours de l'hibernation (Frank et al., 1998). Des expériences ont montré que lorsque la teneur en AGPI de l'alimentation en période pré-hibernatoire est augmentée, le taux de peroxydation lipidique et les dommages cellulaires associés augmentent dans le TABr lors des torpeurs (Frank et Storey, 1995). Frank et al. (2008) ont fait l'hypothèse que la peroxydation pourrait expliquer la réduction de la durée des épisodes de torpeur chez les animaux ayant reçu un régime alimentaire très riche en AGPI.

Il existe une utilisation séquentielle des AG au cours de l'hibernation. Ainsi, les hibernants semblent conserver spécifiquement les AGPI, en oxydant préférentiellement des AGS puis des AGMI au cours de l'hibernation. La composition du TABI change donc au cours de l'hibernation, si on se base sur le degré d'insaturation des acides gras. La proportion relative d'AGS diminue, celle d'AGMI reste constante, tandis que celle d'AGPI augmente (Florant et al., 1990; Florant et al., 1993). Les AG libérés par le TABI entourant les gonades sont surtout des AGS entraînant un enrichissement relatif du TABI gonadique en acide linoléique (Florant et al., 1990). On ignore si les AGPI sont conservés pour leur rôle bénéfique sur l'hibernation ou pour limiter la peroxydation.

Le volume maximal des réserves (lipidiques principalement) des hibernants fat-storing avoisine généralement 40% de leur masse corporelle totale (Humphries et al., 2003a). En revanche, les hibernants food-storing ont une capacité de réserves potentielles illimitée (Humphries et al., 2003a; Humphries et al., 2003b). Si l'expression de la torpeur est effectivement régie par un compromis coût-bénéfice, dont l'issue est définie par le volume des réserves d'énergie, les animaux fat-storing aux réserves limitées devraient exprimer des torpeurs plus profondes, tandis que les individus food-storing devraient avoir une plus

grande flexibilité leur permettant d'adapter la profondeur et la durée de leur torpeur en réponse à des changements dans le volume de leurs réserves.

Chez les espèces food-storing, les AGPI contenus dans les lipides des aliments stockés ont des effets prononcés sur la torpeur (Geiser, 1990; Geiser et Kenagy, 1987; Geiser et al., 1994) (French, 2000; Humphries et al., 2003b). Des régimes supplémentés avec de l'huile de tournesol (riche en acide linoléique) augmentent la durée des épisodes de torpeur chez le tamia amène (*Tamias amoenus*), comparativement à ceux nourris avec un régime supplémenté avec de la graisse de mouton (riche en AGS), tandis que ceux recevant un régime standard présentent un profil d'hibernation intermédiaire aux deux autres (Geiser, 1990). Le régime supplémenté en AGS induit une augmentation de la consommation d'O₂, qui est presque doublée en comparaison de celle des tamias sous régime supplémenté en AGPI. Chez ces derniers, la diminution du métabolisme est liée à une baisse de la Tc induite par les AGPI (d'un facteur 4 par rapport aux animaux supplémentés en AGS) (Geiser et Kenagy, 1987; Geiser et al., 1994). Ceci induit une augmentation de la durée des épisodes de torpeur et en définitive une diminution de la dépense énergétique au cours de l'hibernation.

Le volume des réserves contenues dans le terrier influence également de manière significative les paramètres de l'hibernation chez le tamia rayé (Munro et al. 2005). Plus précisément, les animaux avec les réserves externes les plus importantes expriment des torpeurs plus courtes et des épisodes d'euthermie plus longs que les autres animaux (Fig. 22). Les auteurs font l'hypothèse que comme les animaux n'ont pas besoin de minimiser leur dépense énergétique du fait de leurs réserves très importantes, il apparaît qu'ils n'ont pas d'intérêt à exprimer des torpeurs longues et profondes.

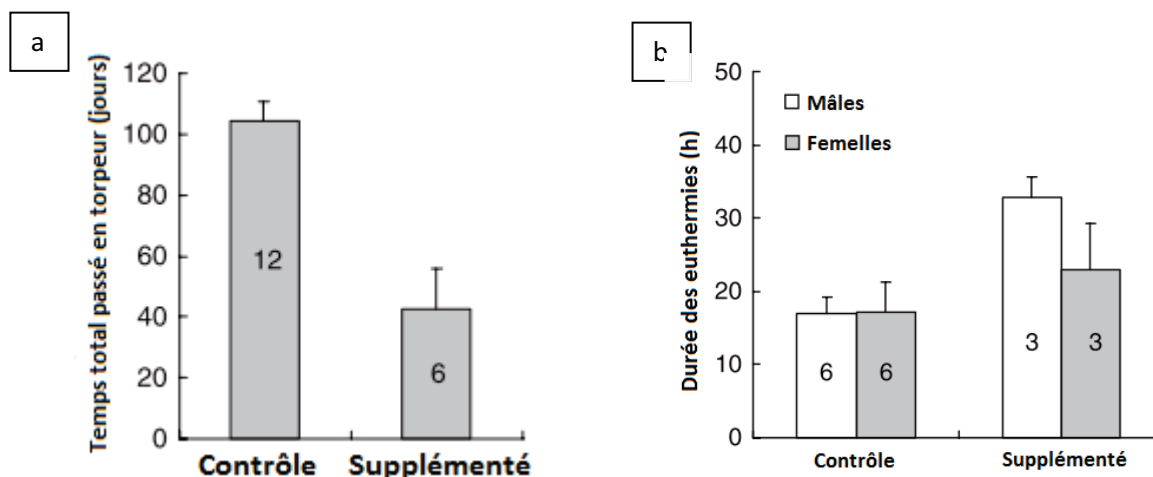


Figure 22 (a) Temps total passé en torpeur (moyenne $\pm$ SEM) au cours de la période d'hibernation et (b) durée moyenne des euthermies (moyenne $\pm$ SEM) en fonction du sexe chez des *Tamias rayés* présentant des réserves externes limitées (Contrôle) et illimités (Supplémenté). La taille des groupes est indiquée dans les barres. Adapté de Munro et al. 2005

2. Impact de l'alimentation sur la reproduction des espèces

hibernantes

a) Effets sur les femelles

La période de reproduction représente une période de forte dépense énergétique pour les femelles, à la fois pendant la gestation mais également au cours de l'élevage des jeunes, notamment lors de la lactation (Speakman, 2008). Du fait de ces besoins énergétiques très importants, les femelles ne peuvent pas uniquement compter sur leurs réserves énergétiques pour la reproduction. Les femelles terminent ainsi généralement leur période d'hibernation plusieurs semaines après les mâles (Bintz, 1988; Davis, 1976; French, 1982; Huang et Morton, 1976), lorsque les ressources alimentaires sont de nouveau disponibles. De même, les femelles peuvent prolonger leur hibernation afin de conserver leurs réserves corporelles pour la gestation et la lactation si les ressources alimentaires ne sont pas suffisantes. Par exemple, les spermophiles de Richardson (*Spermophilus richardsonii*) mâles émergent généralement en mars, tandis que les femelles émergent quelques semaines plus

tard et sont presque toutes gestantes en avril (Bintz, 1988). Un ajout de nourriture dans le terrier de femelles en fin d'hibernation induit la fin de celle-ci, tandis qu'un retrait prolonge l'hibernation (French, 1982). Il a pu être constaté que, comme chez les mâles, les femelles qui émergent le plus tôt présentent le meilleur succès reproducteur (Franceschini-Zink et Millesi, 2008; Millesi et al., 1999) : plus d'opportunités d'accouplement pour les mâles et plus de portées pour les femelles. En outre, les jeunes nés plus tôt dans l'année disposent d'une plus longue phase d'accumulation de réserves.

La composition du lait varie au cours de la lactation : chez le tamia amène, la valeur énergétique du lait est plus que doublée entre le début et la fin de la lactation du fait d'un enrichissement en lipides (de 10% à 30% de la masse sèche) et en protéines (de 5% à 10% de la masse sèche) (Veloso et al., 2003) (Fig. 23).

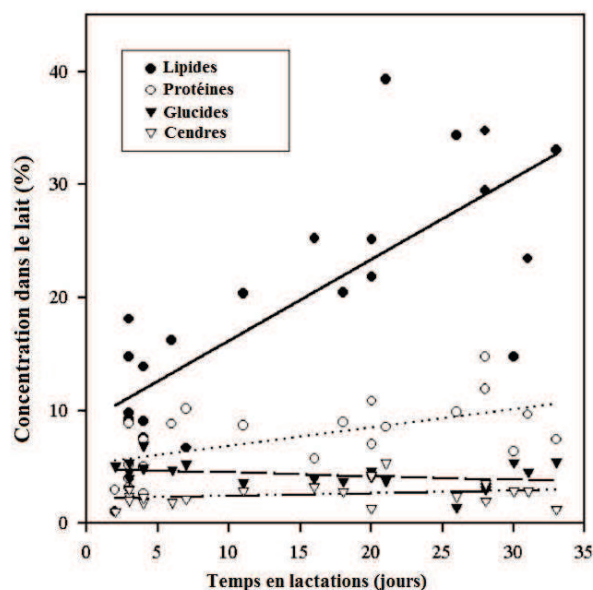


Figure 23 Concentration (pourcentage de la masse fraîche) de lipides, protéines, glucides, et cendres dans le lait de tamia amène au cours de la lactation. Les lignes suivant les points de données sont des droites de régressions. Adapté de Veloso et al. 2003.

Ceci n'entraîne pourtant pas de diminution de la masse corporelle de la mère (Veloso et al., 2003). Chez le spermophile Colombien (*Spermophilus columbianus*), le taux de lipides du lait diminue au cours de la lactation et le taux de protéines augmente, ceci afin d'assurer une croissance très rapide des jeunes (Skibiell et Hood, 2013). Ce résultat est étonnant car étant

une espèce fat-storing, le spermophile Colombien ne dispose que de ses réserves corporelles pour survivre à l'hibernation. On pourrait donc s'attendre à de forts taux de lipides dans le lait pour assurer de bonnes réserves de lipides aux jeunes avant l'hibernation (Dobson et al., 1992). Les auteurs font l'hypothèse que le spermophile Colombien femelle préserve ses réserves adipeuses, car elle aurait moins de temps pour reconstituer des réserves avant l'hibernation que n'en auraient ses jeunes. Il a pu être mis en évidence chez cette espèce (spermophile Colombien) que le nombre de juvéniles qui survivent à l'hibernation est dépendant de leur taux de croissance au cours de la lactation (Skibiél et al., 2009). Du fait des variations importantes de composition du lait au cours de la lactation et des réserves adipeuses corporelles des mères limitées en fin d'hibernation, les apports alimentaires au cours de la phase de reproduction sont déterminants.

b) Effets sur les mâles

Les hibernants mâles reproducteurs arrêtent d'hiberner plus tôt que les femelles (Bintz, 1988; Davis, 1976; French, 1982; Munro et al., 2005). Souvent, ils émergent d'hibernation alors que les conditions extérieures ne permettent pas une bonne disponibilité alimentaire (Davis, 1976). Le retour à la normothermie et la croissance testiculaire se produisent avant la sortie du terrier. En conséquence, à la première sortie du terrier, la spermatogenèse est terminée et le taux de testostérone est déjà maximal (Bronson, 1979; McKeever, 1964). Toutefois, chez le spermophile à manteau doré, la masse testiculaire passe d'environ 500 mg en début d'hibernation à environ 1100 mg à l'émergence d'hibernation (Barnes et al., 1986).

Ce sont généralement les mâles les plus gros (espèces fat-storing) ou qui disposent de réserves plus importantes dans leur terrier (espèces food-storing) qui sortent en premier

d'hibernation (Barnes, 1984; French, 1982; Munro et al., 2005) et sont prêts pour la reproduction.

Le développement testiculaire est positivement corrélé avec la masse corporelle et l'adiposité avant l'hibernation (Forger et al., 1986). En effet, aussi bien le jeûne que la lipectomie avant le début de l'hibernation inhibent la reproduction des mâles au printemps, et ce, quelle que soit la durée de l'hibernation.

Chez les mâles, puisque la régénérescence testiculaire et la spermatogenèse nécessitent une période prolongée d'euthermie (sans laquelle le tissu testiculaire est insensible à l'action de l'hormone lutéinisante (LH)), il existe des interactions fortes entre réserves énergétiques, horloge circannuelle et axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope. L'horloge circannuelle augmente la sensibilité hypothalamique à la rétroaction des stéroïdes sexuels, de sorte que des taux de testostérone très faibles sont suffisants pour inhiber la libération des gonadotropines la majeure partie de l'année (Zucker et Licht, 1983). À l'approche de la saison de reproduction, l'horloge circannuelle diminue l'hypersensibilité hypothalamique, entraînant une augmentation de la libération de gonadotropine, malgré l'augmentation des concentrations plasmatiques de testostérone (Michener, 1992). La libération de testostérone et la spermatogenèse nécessitent l'euthermie des tissus car les tissus testiculaires sont insensibles aux effets stimulants de la LH aux Tc caractéristiques de la torpeur (Barnes et al., 1987). Les taux de testostérone plasmatique et de LH (stimulant la production de testostérone) restent à des valeurs basses tout au long de l'hibernation (Barnes et al., 1988), ceci jusqu'à environ trois semaines avant l'émergence d'hibernation, lorsque les concentrations de ces hormones augmentent progressivement, mais seulement pendant les euthermies (Barnes et al., 1988). A l'euthermie correspondant à l'émergence

d'hibernation, on peut supposer que la sensibilité hypothalamique à la rétroaction des stéroïdes a diminué dans la mesure où les concentrations de testostérone augmentent suffisamment pour prévenir de nouveaux épisodes de torpeur. Une relation négative entre la testostérone et l'hibernation a été avancée, sur la base que la reproduction et l'hibernation sont incompatibles (Wimsatt, 1969), un traitement à la testostérone empêchant l'hibernation (Hall et Goldman, 1980; Lee et al., 1990).

c) Effets mixtes

Il a été montré que la leptine joue un rôle dans la reproduction. Elle signale si des réserves adéquates sont présentes pour assurer la fonction de reproduction (Moschos et al., 2002). Il a été montré qu'un traitement à la leptine augmente le relargage de l'hormone de libération des gonadotropines hypophysaires (GnRH) responsable de la synthèse et de la sécrétion de la LH par l'hypophyse (Cunningham et al., 1999; Lebrethon et al., 2000; Magni et al., 1999). En plus de son action centrale, la leptine peut agir directement sur les organes de la reproduction, notamment les ovaires, les testicules ou les glandes mammaires, en stimulant leur croissance et leur développement (Karlsson et al., 1997; Laud et al., 1999; Mounzih et al., 1998).

Ces résultats confortent l'idée qu'aussi bien chez les mâles que chez les femelles, une forte interdépendance existe entre les différentes phases du cycle annuel. Par exemple, la constitution de réserves insuffisantes va induire une hibernation prolongée, ce qui va impacter négativement la saison de reproduction. De plus, une reproduction tardive va réduire le temps alloué à la constitution de réserves pour l'hibernation des jeunes comme de leurs parents, pouvant entraîner une forte mortalité hivernale.

F. Problématique de recherche

La torpeur est une stratégie d'économie d'énergie qui permet aux animaux endothermes de faire face aux baisses saisonnières des ressources alimentaires par un ralentissement du métabolisme et une diminution de leur température corporelle. Les deux stratégies d'accumulation de réserves détaillées dans cette revue sont des exemples d'adaptation à un jeûne plus ou moins long. Si les mécanismes métaboliques sous-jacents ont été assez précisément décrits chez les espèces fat-storing, les capacités de résistance au jeûne et d'alternance de périodes de jeûne et de réalimentation chez les espèces food-storing ont été peu étudiées. Or, ces dernières doivent présenter des adaptations métaboliques mais également digestives particulières, leur permettant une assimilation de nutriments et une restauration des réserves corporelles optimales lors des courtes phases de réalimentation inter-torpeurs.

La qualité des aliments stockés dans le terrier ou sous forme de réserves corporelles conditionne la qualité de l'hibernation. L'influence de la qualité de l'alimentation, notamment la composition en acides gras a également été beaucoup étudiée, mais encore une fois, surtout chez les espèces fat-storing. Par ailleurs, peu d'études se sont intéressées à l'influence de la composition en macronutriments de l'alimentation sur l'hibernation et les conséquences évolutives sur le cycle de vie des hibernants.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail a été de mettre en lumière les particularités des hibernants food-storing et l'influence de l'alimentation sur leur cycle annuel. Trois études ont été réalisées avec les objectifs suivants :

Etude 1 : Déterminer quels sont les substrats énergétiques déterminants au cours de l'hibernation et quelles sont les adaptations digestives des hibernants food-storing aux alternances de périodes de jeûne et de réalimentation.

Etude 2 : Déterminer quelle est l'influence du régime alimentaire (en termes qualitatifs) sur le déroulement de l'hibernation (fréquence, durée et intensité des torpeurs).

Etude 3 : Déterminer quelles sont les relations entre régime alimentaire, condition corporelle, déroulement de l'hibernation et succès reproducteur.

Un bon modèle pour étudier de tels mécanismes sont les hamsters, des rongeurs hibernants food-storing recourant à la torpeur pour survivre à la baisse de disponibilité alimentaire hivernale.

G. Modèles d'étude

1. Hamster doré (*Mesocricetus auratus*)

a) Morphologie

Le hamster doré présente un pelage roux-fauve dorsalement et blanc-gris ventralement (coloration la plus commune retrouvée dans les élevages destinés à la recherche biomédicale). Les adultes ont un corps petit et trapu avec des pattes courtes. Les adultes aussi bien mâle que femelle mesurent de 14 à 19cm (longueur de la queue non incluse) pour une masse corporelle variant de 114 à 140g (Fig. 9). Leur durée de vie moyenne en captivité est d'environ 2 ans (Suckow et al., 2012).

b) Distribution et habitat

Originellement, on retrouvait ces animaux dans le Nord-ouest de la Syrie (Smith, 2012). Leur habitat naturel est composé de steppes rocheuses et de pentes broussailleuses. Ils construisent des terriers profonds et compartimentés dans lesquels ils stockent des

provisions (Smith, 2012). Ces hamsters sont principalement granivores mais consomment également des parties vertes de plantes, des pousses, des racines, des insectes et des fruits (Smith, 2012).

c) *Hibernation*

L'exposition à une photopériode comportant une durée du jour inférieure à 13h induit une régression testiculaire, une diminution de la prise alimentaire et de la masse corporelle, puis l'hibernation (Jansky et al., 1984).

2. Hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*)

a) *Morphologie*



Figure 24. Hamster d'Europe adulte (au fond) à côté d'un hamster doré adulte (Fenyk-Melody, 2012).

Le hamster d'Europe est le plus grand représentant de la famille des hamsters, il a une taille similaire à celle d'un cochon d'Inde (*Cavia porcellus*) (environ trois fois celle d'un hamster doré) (Fig. 9). Sa fourrure est intégralement noire sur la face

ventrale, à l'exception d'un patch blanc sur le torse. Le reste du corps est de couleur fauve à gris-brun (Reznik et al., 1978) .

Les adultes ont un corps trapu avec une queue courte. Leurs yeux sont de couleur noire, leur nez dépourvu de poils comporte des vibrisses s'étendant latéralement. Les mâles sont plus grands que les femelles. Leur masse corporelle est la plus élevée au cours de la saison de reproduction (printemps et été) et la plus basse au cours de l'hibernation (automne et

hiver). Leur masse corporelle maximale ne cesse d'augmenter chaque année (Masson-Pevet et al., 1994b). La longueur moyenne du corps des mâles adultes est comprise entre 27cm et 32cm et celui des femelles adultes entre 22 et 25cm (longueur de la queue non incluse) (Fenyk-Melody, 2012). Leur durée de vie moyenne en captivité est d'environ 2,5 ans pour les femelles et 2 ans pour les mâles (Monecke et al., 2010).

b) Comportement

Dans la nature, ils collectent de grandes quantités de nourriture (jusqu'à 90kg) qu'ils stockent dans leurs terriers (Fenyk-Melody, 2012). Le mâle s'accouple avec plusieurs femelles et son territoire peut couvrir le territoire de trois femelles ou plus. Ce n'est pas un animal nocturne au sens strict du terme : en effet, au cours de la saison de reproduction, ils sont plus actifs au cours des quelques heures avant le coucher du soleil et avant l'aube. Le reste de l'année, ils présentent un cycle arythmique, sans phase de repos ou d'activité clairement définies (Monecke et Wollnik, 2005).

c) Hibernation

Dans la nature et en environnement semi-naturel, le hamster d'Europe est un animal hibernant. La réduction de la durée du jour induit une régression testiculaire, une diminution de la prise alimentaire et de la masse corporelle, ainsi que l'hibernation (Fenyk-Melody, 2012). Une photopériode avec 13h de lumière ou plus est nécessaire pour stimuler la croissance des gonades chez les animaux préalablement exposés à des photopériodes courtes (Monecke et Wollnik, 2004; Monecke et al., 2009).

Matériels et Méthodes

Choix des modèles

Les expériences présentées dans ce manuscrit ont été menées sur deux modèles d'hibernants food-storing différents. L'étude du statut hormonal a été menée sur des hamsters dorés (*Mesocricetus auratus*). Ce modèle a été choisi car il est facile d'induire chez ces animaux une entrée en hibernation par une diminution de la durée du jour.

L'étude des capacités d'absorption intestinale et l'étude de l'influence du régime alimentaire ont été réalisées sur des hamsters d'Europe (*Cricetus cricetus*). Ce modèle a été choisi car sa taille le rend plus apte à des expériences de perfusion intestinale *in-vivo* et cette espèce s'inscrivait dans un nouveau projet au sein du laboratoire.

Lots d'individus

Expériences		Nombre d'individus
Statut hormonal		26♂
Absorption intestinale		20♀
Influence du régime alimentaire	Hibernation/Condition corporelle	34 ♀
	Reproduction	19♂ / ♀24

Tableau 1 Effectif des groupes expérimentaux et sex-ratio des groupes pour chaque expérience. Chaque animal n'a participé qu'à une seule expérience.

Statut hormonal

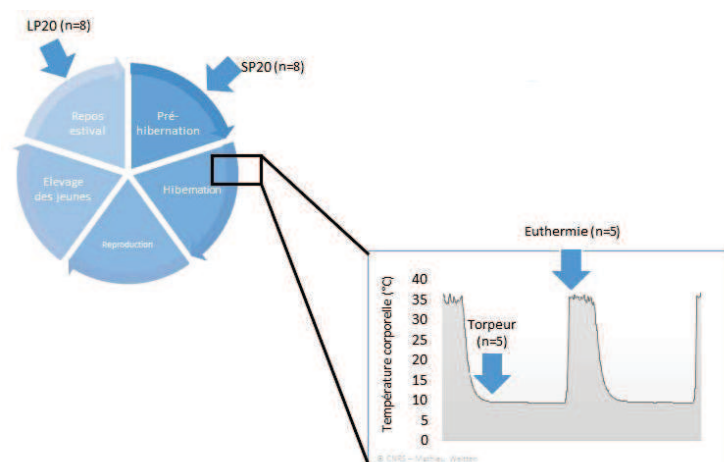


Figure 25 Les différents groupes d'animaux sur lesquels ont été menées les expériences, reportés sur un cycle annuel. Les animaux de chaque groupe ont été placés dans des conditions de photopériode et de température ambiante visant à mimer les conditions environnementales que l'on retrouve au cours des différentes phases du cycle annuel (conditions détaillées dans le tableau 2).

Groupes	LP20	SP20	Torpeur	Euthermie
Photopériode	Jour/Nuit 14h/10h	Jour/Nuit 10h/14h	Jour/Nuit 10h/14h	Jour/Nuit 10h/14h
Température ambiante	20°C	20°C	8°C	8°C

Tableau 2 Détails des conditions environnementales auxquels ont été exposés les différents groupes d'animaux

Perfusion intestinale *in-vivo*

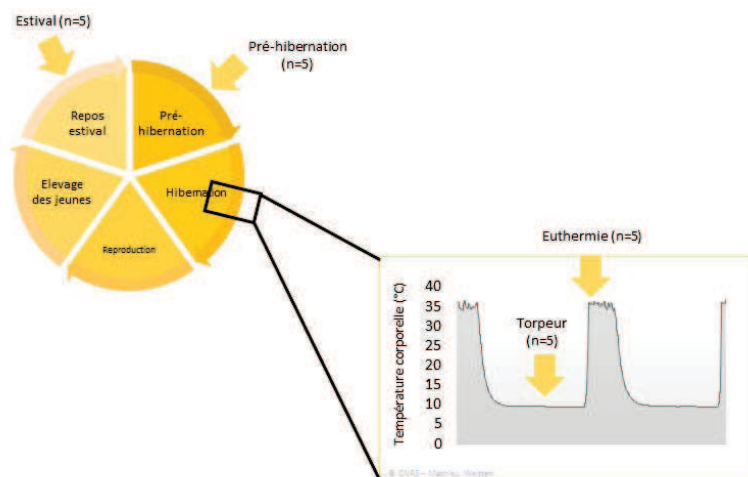


Figure 26 Prélèvement des animaux reportés sur un cycle annuel. En encart, une alternance torpeur/euthermie. Les expériences de perfusion intestinale ont été réalisées sur des animaux prélevés à des moments clés du cycle annuel, en repos estival (groupe Estival), juste avant l'hibernation (groupe Pré-hibernation), et en hibernation lors d'une torpeur (groupe Torpeur) ou lors d'une euthermie inter-torpeurs (groupe Euthermie).

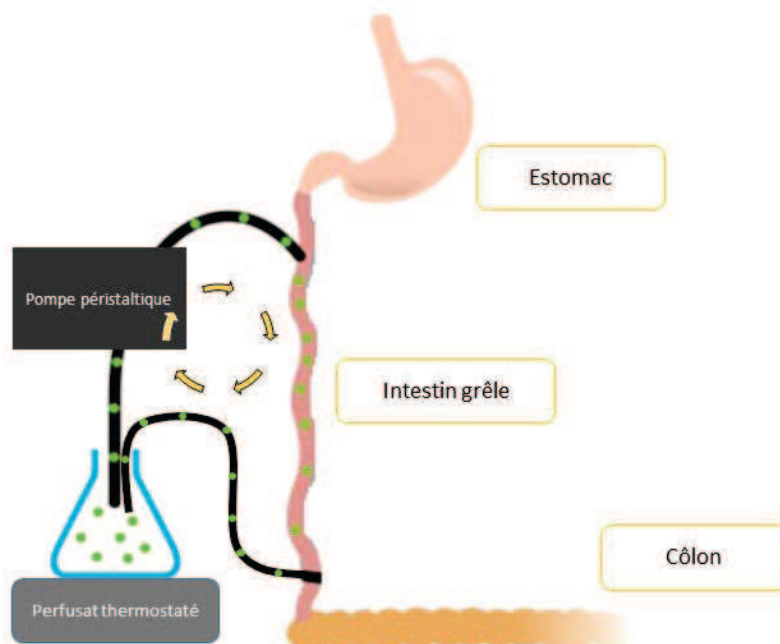


Figure 27 Schéma montrant le principe de l'expérience de perfusion intestinale *in-vivo*. L'expérience a consisté à perfuser l'intestin grêle avec un perfusat de composition connue pendant 1h. La perfusion a été réalisée en circuit fermé.

Influence du régime alimentaire

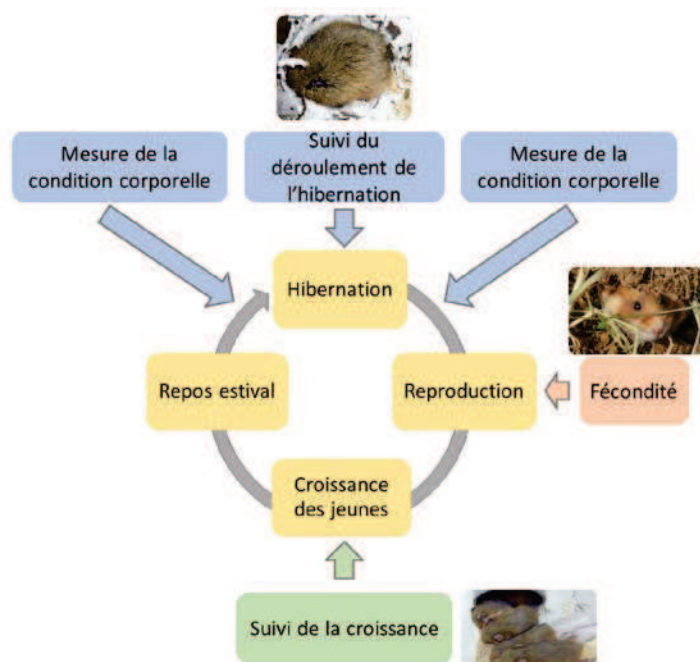


Figure 28 Schéma représentant le déroulement de l'étude de l'influence du régime alimentaire, reporté sur un cycle annuel. Cette étude s'est déroulée en deux temps et sur des groupes d'animaux différents, les rectangles bleus correspondent à l'étude de l'impact du régime sur la condition corporelle avant et après hibernation et sur le déroulement de l'hibernation ; les rectangles oranges et verts correspondent à l'étude de l'impact du régime sur la reproduction et la croissance des jeunes, respectivement.

Résultats

Etude 1: Hormonal changes and energy substrates' availability during the hibernation cycle of Syrian hamsters.

Changements hormonaux et utilisation des substrats énergétiques au cours de l'hibernation chez le hamster doré (*Mesocricetus auratus*)

Introduction

L'hibernation est l'une des adaptations les plus efficaces pour faire face aux contraintes de la période hivernale. Elle se caractérise par une diminution importante de la dépense énergétique au cours des périodes de torpeur (périodes d'hypométabolisme et de diminution de la température corporelle) entrecoupées de périodes de retour à l'euthermie. Certaines espèces hibernantes dites food-storing se nourrissent pendant ces retours périodiques à l'euthermie, et présentent donc des adaptations métaboliques différentes des espèces hibernantes fat-storing qui jeûnent pendant toute la période d'hibernation. Notre étude vise à définir ces adaptations métaboliques, à travers l'étude des taux plasmatiques d'hormones impliquées dans le métabolisme énergétique (l'insuline, le glucagon, la leptine, l'adiponectine, le GLP-1 et le GIP) et de métabolites associés (glucose, acides gras libres, triglycérides, urée) au cours de l'hibernation chez une espèce food-storing, le hamster doré. De plus, nous avons étudié la réponse de l'intestin grêle aux alternances de périodes de jeûne et d'alimentation par des mesures de taille des villosités intestinales.

Matériels & Méthodes

Des hamsters dorés ont été exposés à des conditions de photopériode et de température mimant les différentes phases clés du cycle annuel: en photopériode longue à 20°C (groupe LP20), en photopériode courte à 20°C (groupe SP20), et en photopériode courte à 8°C (SP8). Les animaux SP8 ont été échantillonnés soit au début d'un épisode de torpeur (groupe Torpeur) ou au début d'une euthermie (groupe Euthermie). Le sang tronculaire a été prélevé au moment de l'euthanasie. Les mesures d'hormones et de

métabolites ont été conduites sur le plasma. Un segment d'un centimètre de jéjunum a été prélevé et préparé pour procéder à la mesure de la longueur des villosités au microscope optique.

Résultats & Discussion

Une baisse de l'insulinémie et de la glucagonémie a été observée chez les hamsters dorés en période pré-hibernatoire et en hibernation par rapport à la période estivale. Des variations similaires se retrouvent chez un grand nombre d'espèces fat-storing et sont associées à une diminution de l'activité du pancréas. En accord avec les données de la littérature chez des espèces fat-storing, la leptinémie est deux fois plus basse chez les animaux pré-hibernants et hibernants par rapport aux animaux en repos estival, et ce malgré une adiposité maximale juste avant l'hibernation. Une telle dissociation entre leptinémie et adiposité avant l'hibernation a déjà été rapportée. Elle permet d'éviter les voies d'actions induites par la leptine, de stimulation de la dépense énergétique et d'inhibition des entrées en torpeur. La concentration plasmatique d'adiponectine est similaire entre les groupes et tend même à augmenter chez les animaux en torpeur, laissant supposer un rôle de l'adiponectine dans la régulation de l'utilisation des réserves notamment par la stimulation de la lipolyse. Les taux plasmatiques d'incrétines (GLP1 et GiP) sont presque dix fois plus faibles chez les animaux hibernants en comparaison aux animaux en repos estival, ce qui est cohérent compte-tenu du rôle anabolique de ces hormones. L'utilisation principale des réserves lipidiques lors des torpeurs entraîne une diminution (d'un facteur 2) de la triglycéridémie et une augmentation des taux circulants d'acides gras (d'un facteur 4) contribuant à la cétogenèse hépatique. Contrairement aux espèces fat-storing, la glycémie diminue pendant les épisodes de torpeur, ce qui pourrait induire le réveil et la ré-

alimentation chez cette espèce food-storing. Enfin, lors des euthermies inter-torpeurs, la ré-alimentation entraîne une augmentation de la glycémie et de la triglycéridémie. Aucune variation de l'urémie n'a été constatée au cours du cycle annuel du hamster doré, suggérant une épargne protéique pendant l'hibernation. Enfin, l'étude histologique des villosités intestinales a révélé un maintien de leur longueur tout au long du cycle annuel, laissant supposer un maintien des capacités digestives pendant l'hibernation.

Conclusion

La plupart des variations hormonales et des concentrations plasmatiques de métabolites que nous avons observées pendant la torpeur sont caractéristiques d'un jeûne court suivi d'un état postprandial lors des épisodes d'euthermie inter-torpeurs. Comme chez les petits hibernants fat-storing, la diminution du taux plasmatique de leptine serait nécessaire pour permettre l'hibernation. De plus, cette étude a permis de mettre en lumière de nouveaux acteurs potentiels de la régulation du métabolisme énergétique au cours du cycle annuel chez les hibernants food-storing tels que l'adiponectine permettant la mobilisation des réserves énergétiques pendant les torpeurs, et les incrétines permettant à l'inverse la mise en réserve pendant la période de repos estival. Enfin, l'observation du maintien de la longueur des villosités intestinales suggère un maintien de la fonctionnalité du système digestif pendant l'hibernation chez les hibernants food-storing, qui sera analysée au cours de l'étude suivante.



Contents lists available at ScienceDirect

Hormones and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yhbeh

Hormonal changes and energy substrate availability during the hibernation cycle of Syrian hamsters



Mathieu Weitten^{a,b}, Jean-Patrice Robin^{a,b}, Hugues Oudart^{a,b}, Paul Pévet^c, Caroline Habold^{a,b,*}

^a Université de Strasbourg, IPHC-DEPE, 23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

^b CNRS, UMR 7178, 23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

^c CNRS, Département de Neurobiologie des Rythmes, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR-3212, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 May 2013

Revised 23 August 2013

Accepted 24 August 2013

Available online 1 September 2013

Keywords:

Mesocricetus auratus

Torpor bout

Periodic arousal

Adipokines

Incretins

Food-storing behavior

ABSTRACT

Animals have to adapt to seasonal variations in food resources and temperature. Hibernation is one of the most efficient means used by animals to cope with harsh winter conditions, wherein survival is achieved through a significant decrease in energy expenditure. The hibernation period is constituted by a succession of torpor bouts (hypometabolism and decrease in body temperature) and periodic arousals (eumetabolism and euthermia). Some species feed during these periodic arousals, and thus show different metabolic adaptations to fat-storing species that fast throughout the hibernation period. Our study aims to define these metabolic adaptations, including hormone (insulin, glucagon, leptin, adiponectin, GLP-1, GIP) and metabolite (glucose, free fatty acids, triglycerides, urea) profiles together with body composition adjustments. Syrian hamsters were exposed to varied photoperiod and temperature conditions mimicking different phases of the hibernation cycle: a long photoperiod at 20 °C (LP20 group), a short photoperiod at 20 °C (SP20 group), and a short photoperiod at 8 °C (SP8). SP8 animals were sampled either at the beginning of a torpor bout (Torpor group) or at the beginning of a periodic arousal (Arousal group). We show that fat store mobilization in hamsters during torpor bouts is associated with decreased circulating levels of glucagon, insulin, leptin, and an increase in adiponectin. Refeeding during periodic arousals results in a decreased free fatty acid plasma concentration and an increase in glycemia and plasma incretin concentrations. Reduced incretin and increased adiponectin levels are therefore in accordance with the changes in nutrient availability and feeding behavior observed during the hibernation cycle of Syrian hamsters.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Hibernation enables small mammals to cope with seasonal changes in food resources and allows them to limit energy expenditure for heat production in a cold environment. It is a succession of periods of hypometabolism associated with decreases in body temperature, called torpor bouts, and periodic arousals during which the animal returns to eumetabolism and euthermia (reviewed in: Heldmaier et al., 2004). Most species do not feed during hibernation and only rely on body reserves to fulfill energy requirements (fat-storing species), whereas other species hoard food in a burrow (food-storing species) and feed between torpor bouts (reviewed in: Humphries et al., 2001; Geiser, 2004). In both cases, hibernation can be considered as a fasting state of variable duration (from 1 day in food-storing to several months in fat-storing species; Humphries et al., 2003).

Many studies have focused on the use of energy substrates during different phases of the hibernation period. Measurements of the respiratory quotient (RQ) of an organism show that during torpor bouts, energy expenditure is almost exclusively provided by the oxidation of lipids (RQ close to 0.7) (Buck and Barnes, 2000; Kayser, 1952). During early periodic arousal (the warming-up phase), the increase in body temperature to 12–16 °C is accompanied by an increase of the RQ to 1.0, indicating the oxidation of carbohydrate (Heldmaier et al., 2004) and/or ventilation of CO₂ accumulated during torpor (Malan et al., 1988). Another approach to the study of energy substrate use during the hibernation cycle consists of measuring the activity of key enzymes involved in metabolic pathways, and more recently, the measurement of gene expressions during hibernation versus the active phase. These studies show that overall glucose utilization is reduced in favor of fat oxidation during torpor bouts (reviewed in: Dark, 2005). This shift of energy metabolism is accompanied by a decrease in net protein synthesis due to a decrease in transcription and translation of mRNAs, which, however, see their half-life increase (Van Breukelen and Martin, 2002).

Hormonal changes that may account for the reorientation of intermediary metabolism during the hibernation cycle have not been extensively studied to date, and the majority of data concerns fat-storing species and the regulation of glucose metabolism (see Table 1). An SP-induced

Abbreviations: SP, short photoperiod; LP, long photoperiod; RQ, respiratory quotient; WAT, white adipose tissue; GC, glucocorticoid; GLP-1, glucagon-like peptide 1; GIP, glucose dependant insulinotropic polypeptide.

* Corresponding author at: Université de Strasbourg, IPHC-DEPE, 23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France. Fax: +33 3 88 10 69 06.

E-mail address: caroline.habold@iphc.cnrs.fr (C. Habold).

Table 1
Blood concentrations of hormones implicated in the regulation of energy metabolism in hibernating species from existing literature (AU: arbitrary units; LD: light–dark; –: no data available). Different superscript letters show significant differences ($p < 0.05$).

Hormones	LP	SP warm	SP cold		Re-warm		Arousal	Species	Photoperiod/temperature	References
			Torpor							
FAT-STORING SPECIES	Insulin (pg·mL ⁻¹)	–	–	2.26 ± 0.38 ^a	12.7 ± 3.5 ^b	3.2 ± 0.9 ^a		<i>Glis glis</i>	LP LD natural/SP LD 9:17 (5 °C)	Castex et al. (1984)
		–	–	0.73 ± 0.14	0.90 ± 0.10	0.73 ± 0.10		<i>Marmota flaviventris</i>	SP LD 8:16 (5 ± 2 °C)	Florant et al. (1986)
	Glucagon (pg·mL ⁻¹)	–	–	206 ± 14 ^a	334 ± 36 ^b	268 ± 21 ^b		<i>Glis glis</i>	LP LD natural/SP LD 8:16 (5 °C)	Hoo-Paris et al. (1985)
		–	–	82 ± 9	75 ± 8	94 ± 6		<i>Marmota flaviventris</i>	SP LD 8:16 (5 ± 2 °C)	Florant et al. (1986)
	Adiponectin (AU)	1.2	1.2	–	–	–		<i>Marmota flaviventris</i>	LP LD natural (20 ± 3 °C)/SP LD 0:24 (5 °C)	Florant et al. (2004)
	Leptin (ng·mL ⁻¹)	3.2 ^a	–	10.7 ^b	–	–		<i>Marmota flaviventris</i>	LP LD natural (20 ± 3 °C)/SP LD 0:24 (5 °C)	Florant et al. (2004)
FOOD-STORING SPECIES	Ghrelin (ng·mL ⁻¹)	3.6 ^{a†}	5.6 ^{b†}	~3 ^a	–	~4 ^b		<i>Citellus lateralis</i>	LP LD natural (20 ± 2 °C)/SP LD 0:24 (5 °C)	Healy et al. (2010)
	Cortisol (ng·mL ⁻¹)	77.3 ± 20.3	51.2 ± 3.8	19.2 ± 0.5 ^a	–	36.2 ± 2.2 ^b		<i>Citellus citellus</i>	LP LD natural (16–26 °C)/SP LD 0:24 (7 ± 1 °C)	Shivatcheva et al. (1988)
	Insulin (pg·mL ⁻¹)	~3500	–	–	–	–		<i>Mesocricetus auratus</i>	LP LD 16:8 (22 °C)	Schneider et al. (2000)
	Adiponectin (ng·mL ⁻¹)	53.1 ± 10.4	–	–	–	–		<i>Mesocricetus auratus</i>	LP LD 12:12	Lasa et al. (2009)
	Leptin (ng·mL ⁻¹)	~6 ^a	~10.5 ^a	–	–	–		<i>Mesocricetus auratus</i>	LP LD 16:8/SP LD 6:18	Horton et al. (2000)
		0.12 ± 0.04	–	–	–	–		<i>Mesocricetus auratus</i>	LP LD 12:12	Lasa et al. (2009)
		~3	–	–	–	–		<i>Mesocricetus auratus</i>	LP LD 16:8 (22 °C)	Schneider et al. (2000)
	Visfatin (ng·mL ⁻¹)	21.3 ± 1.2	–	–	–	–		<i>Mesocricetus auratus</i>	LP LD 12:12	Lasa et al. (2009)
Apelin (ng·mL ⁻¹)	6.13 ± 1.46	–	–	–	–		<i>Mesocricetus auratus</i>	LP LD 12:12	Lasa et al. (2009)	
Testosterone (ng·mL ⁻¹)	2.54 ± 0.67 ^a	–	–	0.37 ± 0.08 ^b	–	–		<i>Cricetus cricetus</i>	LP LD 16:8 (22 °C)/SP LD 10:14 (6 °C)	Darrow et al. (1988)

decrease has been described in the plasma concentrations of insulin and glucagon of these species (edible dormouse (*Glis glis*): Castex et al., 1984; golden-mantled ground squirrel (*Citellus lateralis*): Bauman et al., 1987). During torpor bouts, insulinemia decreases and tissues also develop insulin resistance, whilst gluconeogenesis increases. As a consequence, circulating glucose is preserved (Wang and Lee, 2011). By contrast, insulin and glucagon concentrations increase during periodic arousals. During this period, blood glucose and glucose turnover rate also increase, as glucose is intensively oxidized during shivering thermogenesis (Wang and Lee, 2011).

The hibernation cycle in fat-storing species is also characterized by drastic changes in the white adipose tissue (WAT) mass (reviewed in Dark, 2005). An increase in plasma leptin has been observed in the pre-hibernation phase (Florant et al., 2004). In little brown bats (*Myotis lucifugus*), however, this increase in leptinemia occurs before the increase in adiposity and does not lead to increased energy expenditure or decreased food intake (Kronfeld-Schor et al., 2000). This suggests that leptin may be dissociated from WAT mass during the hibernation cycle (reviewed in Dark, 2005). Another adipokine, adiponectin, has been much less studied in relation to hibernation. Only one study in yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*) describes a decrease in serum adiponectin from summer to winter parallel to fat mass gain (Florant et al., 2004). This hormone is thought to stimulate thermogenesis (Masaki et al., 2003), and to induce a decrease in body mass and fat mass by stimulating fatty acid oxidation (Fruebis et al., 2001). Ghrelin, secreted mainly by the stomach and generally considered as the counterpart of leptin, increases during a short photoperiod in the golden-mantled ground squirrel and could thus account for the pre-hibernation increase in fat mass (Healy et al., 2010).

Glucocorticoid (GC) plasma concentrations are at their lowest levels at emergence in fat-storing species (European ground squirrel (*Spermophilus citellus*): Shivatcheva et al., 1988; yellow-bellied marmots: Armitage, 1991). They increase during the pre-hibernation period, then trigger food foraging behavior and promote positive energy balance. During hibernation, blood cortisol levels are low in torpid European ground squirrels but increase at arousal (Shivatcheva et al., 1988).

Despite similarities between fat- and food-storing species, particularly for their respective hibernation behaviors, these species show several differences in energy metabolism. At first, food-storing species store much less body fat than fat-storing species (Humphries et al., 2003). Secondly, food-storing species have to maintain a functional digestive tract during hibernation, whereas the digestive system of fat-storing species undergoes a marked atrophy (Carey, 1995). These differences in feeding behavior during the hibernation cycle (long fasting in fat-storing species versus alternate fasting–feeding in food-storing species) and differences in the size of endocrine tissues such as the WAT and the digestive tract must lead to differences in energy substrate availability and circulating hormone levels. The current study therefore aims to provide new knowledge concerning plasma hormone levels and energy substrate availability in a food-storing species, the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*), during different phases of the hibernation cycle: during a long photoperiod at 20 °C mimicking the summer period (LP20), during a short photoperiod at 20 °C in the prehibernation phase (SP20), and during a short photoperiod at 8 °C (SP8), or during hibernation. SP8 animals were sampled either at the beginning of a torpor bout or at the beginning of a periodic arousal. Changes in the mass of fat depots and in the size of intestinal villi were recorded as well as plasma metabolite and hormone levels. Among the hormone studied, we measured plasma adipokines, as well as pancreatic hormones and incretin levels. Incretins are secreted by the gut in response to food intake (Baggio and Drucker, 2007) and may thus be involved in the response to the alternate feeding–fasting behavior of hibernating hamsters.

Materials and methods

Animals

Experiments were performed on 26 male Syrian hamsters provided by Chronobiotron (Strasbourg, France), aged 18 to 22 weeks upon arrival and each weighing 110 to 155 g.

The animals were housed individually and had free access to water and food throughout the experiments (105 pellets from Safe, Augy, France) consisting of 19.3% (by mass) protein, 54.9% carbohydrates, 5.1% fat, 4.2% cellulose, 5.0% minerals, and 11.5% water. The experimental protocol followed the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments and the care and use of laboratory animals, and was approved by the Ethical Committee under the agreement number AL/13/02/2013.

Experimental procedures

Hamsters were implanted intraperitoneally with a temperature sensor (iButton®, DS1922L model, Maxim Integrated Products, Sunnyvale, CA, USA, weighing 3.2 ± 0.1 g after paraffin ELVAX® inclusion) to monitor changes in body temperature (reflecting the different phases of the hibernation cycle). Two weeks after implantation, the animals were then randomly assigned to four experimental groups and submitted to different conditions of photoperiod and temperature: long photoperiod (LP: light from 4 am to 6 pm) and ambient temperature (T_a) of 20°C = LP20 group; short photoperiod (SP: light from 8 am to 6 pm) and T_a of 20°C = SP20 group; short photoperiod (SP: light from 8 am to 6 pm) and T_a of 8°C (SP8) in early torpor = Torpor group; and SP8 during intertorpor arousal = Arousal group. At the beginning of the experiment, the four groups had the same mean body mass: LP20: 135.1 ± 4.2 g, SP20: 135.5 ± 4.8 g, Torpor: 134.7 ± 6.4 g and Arousal: 133.8 ± 5.2 g ($p = 0.9937$). After 6 weeks in their experimental conditions, the LP20 ($n = 8$) and SP20 ($n = 8$) animals were euthanized by decapitation under 2% isoflurane anesthesia. All hamsters were euthanized 5 h after the beginning of the light phase. Hibernating animals in SP8 conditions were euthanized after 8 weeks of exposure to SP, either in early torpor ($n = 5$) or arousal ($n = 5$). We used the sawdust technique (Jansky et al., 1984) to check whether hamsters were in torpor without handling them. Furthermore, this stage was confirmed a posteriori by the iButton data, which furnished precise information concerning the hibernation cycle of each animal (Fig. 1). Hamsters belonging to the Torpor group were all euthanized during the 2nd torpor bout (10.2 ± 1.7 h after reaching a body temperature $<32^\circ\text{C}$). Hamsters belonging to the Arousal group were euthanized during the 1st or 2nd periodic arousal (5.4 ± 1.4 h after reaching euthermia i.e. a body temperature $>32^\circ\text{C}$).

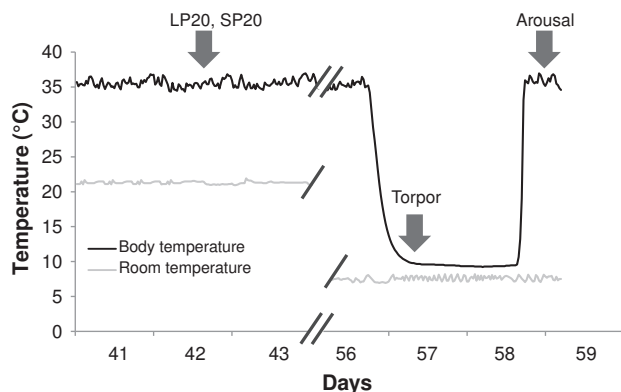


Fig. 1. Body temperature of a Syrian hamster during the different experimental conditions (black curve) and room temperature (gray curve). The arrows indicate the time the different experimental groups were euthanized. Body temperature was recorded from intraperitoneally implanted iButtons.

Body mass, testis length and food intake measurements

Body mass was recorded weekly (± 0.1 g) and the daily body mass loss dM / dt ($\text{g} \cdot \text{day}^{-1}$) was calculated for each animal (dM represents body mass loss during the experiment).

At the same time, testis major axis length was determined in triplicate through the skin with a caliper by the same investigator (range ± 3 mm). An index of sexual development was calculated from the ratio of average testis length to body mass. Food intake was recorded weekly. For the Arousal group, food intake for each individual was divided by the number of days spent over 36°C because no food consumption was observed when the body temperature was below 36°C .

Plasma measurements

At euthanasia, troncular blood was collected for measurements of concentrations of hormones and metabolites. Plasma glucose, non-esterified fatty acids, triglycerides, ketone bodies, glycerol and urea were measured using colorimetric kits from BioAssay Systems, Hayward, CA, USA. Plasma hormone concentrations were measured using commercially available ELISA kits (insulin: EZRMI-13K, leptin: EZRL-83K, adiponectin: EZRADP-62K, GLP-1: EZGLP1T-36K, Millipore, Billerica, MA USA; testosterone: ADI-901-065, corticosterone: ADI-901-097, Enzo Life Science, Lyon, France; glucagon and GiP: ELISA Milliplex® kit MMHMAG-44K, Millipore Billerica, MA, USA). These ELISA kits were formulated for measurements on rat samples. The use of leptin and adiponectin kits had already been tested and validated in Syrian hamsters (Lasa et al., 2009). All the assays were further validated in so far that serial dilutions of the Syrian hamster plasma showed linear changes in sample values that were parallel with standard curves produced according to the manufacturer's standards. All measures were made in duplicate; the intra-assay variation coefficient was comprised between 2% and 5%.

Histology and measurements of intestinal villi length

After euthanasia, a 1 cm-long segment of the jejunum was collected for histological measurements. The samples were fixed for 2 h at room temperature in 3% paraformaldehyde, then dehydrated and embedded in paraffin for tissue sectioning. Six-micrometer-thick tissue sections were then cleared of paraffin, rehydrated, and stained following the trichrome technique of Masson and Goldner. Jejunal villi length was measured with Sigma Scan Pro 5® from the crypt-villus junction to the villus tip on 10 transversal sections of jejunum per animal. Jejunal villi length was used to evaluate changes in the intestinal morphology of hibernating hamsters.

Body composition assessment

The retro-peritoneal and peri-epididymal adipose tissues were dissected and weighed (± 0.01 g). The remaining carcass was freeze-dried to constant mass and ground under liquid nitrogen to obtain a homogeneous powder for analysis. Nitrogen content was determined in triplicate using 150–200 mg aliquots and following the Kjeldahl method. Protein content was calculated as nitrogen $\times 6.25$ (Campbell and Leatherland, 1980).

Statistical analysis

Data presented are means $\pm$ SEM. Statistical comparisons were performed using Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks and Dunn's post hoc test. Correlation analyses were performed using Spearman's rank test. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

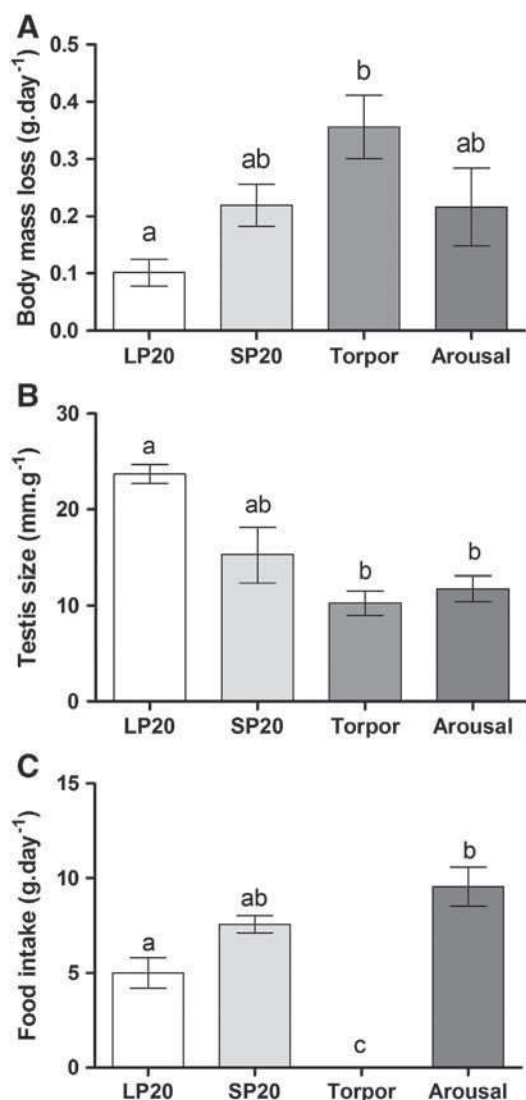


Fig. 2. A: Daily body mass loss, B: testis size per gram body mass and C: daily food intake of Syrian hamsters during a long photoperiod at 20 °C (LP20, $n = 8$), a short photoperiod at 20 °C (SP20, $n = 8$), at torpor ($n = 5$) and at arousal ($n = 5$). Different letters show significant differences ($p < 0.05$). Results are represented as means $\pm$ SEM.

Results

Variations in body mass and fat-free mass, and changes in reproductive state

After exposure to the different conditions of photoperiod and temperature, body mass became significantly different between the four groups: LP20: 131.6 ± 3.1 g, SP20: 123.6 ± 3.5 g, Torpor: 105.5 ± 3.5 g and Arousal: 114.6 ± 0.8 g ($p < 0.001$). The daily body mass loss

(Fig. 2A) increased during the short photoperiod, reaching the highest value in the Torpor group (3.6-fold increase compared to the LP20 group, $p < 0.01$). This corresponds to a 21.7% decrease in body mass in the Torpor group in comparison with LP20 animals. There was no difference in food consumption between the LP20 and SP20 groups (Fig. 2C, $p = 0.67$). The animals did not feed during torpor, but fed more during periodic arousals than under LP20 conditions ($p < 0.01$).

No variations were observed in fat-free mass between the groups: LP20: 21.2 ± 0.9 g; SP20: 20.5 ± 0.2 g; Torpor: 18.8 ± 0.3 g; Arousal: 20.0 ± 0.2 g ($p > 0.05$).

Testis size per gram body mass was significantly reduced in the Torpor and Arousal groups compared to the LP20 group (Fig. 2B; $p < 0.001$ and $p = 0.004$ respectively). Plasma testosterone concentrations (Table 2) were correlated with variations in testis length (Spearman $p < 0.001$, $R = 0.658$).

Variations in plasma corticosterone and pancreatic hormone levels

Plasma corticosterone concentration was significantly lower in the Torpor group compared to the arousal and SP20 groups (Table 2; $p = 0.027$ and $p = 0.001$, respectively).

Insulinemia was lower in the SP20 and Arousal groups than in the LP20 group (respectively, by 3.6-fold, $p = 0.006$ and 4-fold, $p = 0.019$). In the Torpor group, insulinemia was not significantly different from the three other groups. The plasma glucagon level followed the same variation profile, with a 4.6-fold decrease in the SP20 compared to the LP20 group ($p = 0.01$) and a 6.2-fold decrease in the Arousal group compared to the LP20 group ($p = 0.031$).

Energy substrates' availability

A 2-fold decrease in triglyceridemia was observed in the Torpor group compared to the LP20 and SP20 groups (Table 3). In the Arousal group, triglyceridemia increased again, reaching a value that was not significantly different from the SP20 value. By contrast, a fourfold increase was seen in plasma-free fatty acid concentration during torpor compared to the LP20 condition, but returned to a value similar to the LP20 value at arousal ($p > 0.999$).

Glycemia was similar in the LP20, SP20 and Arousal groups, but a 3-fold decrease was observed in torpid animals compared to the LP20 and SP20 groups.

No significant variations in uremia could be observed between the different groups ($p = 0.18$).

Concerning ketone bodies, acetoacetate (AcAc) and β -hydroxybutyrate (β -OHB) showed different variation patterns: AcAc levels increased in the Torpor group compared to the LP20 group (by 1.2-fold, $p = 0.033$), whereas β -OHB levels did not vary ($p = 0.0727$).

Variations in fat mass and plasma levels of adipokines

Variations in the masses of the periepididymal and retro-peritoneal fat depots (absolute values and the fat to body mass ratio) were similar

Table 2
Plasma hormone levels (means $\pm$ SEM) of Syrian hamsters during a long photoperiod at 20 °C (LP20), a short photoperiod at 20 °C (SP20) and a short photoperiod at 8 °C in Torpor or Arousal. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Hormones	LP20	SP20	Torpor	Arousal
Insulin (ng·mL ⁻¹)	1.60 $\pm$ 0.34 ^a	0.44 $\pm$ 0.06 ^b	0.86 $\pm$ 0.08 ^{ab}	0.39 $\pm$ 0.04 ^b
Glucagon (pg·mL ⁻¹)	238.4 $\pm$ 62.3 ^a	51.8 $\pm$ 23.2 ^b	53.2 $\pm$ 13.7 ^{ab}	38.2 $\pm$ 12.0 ^b
GLP-1 (pg·mL ⁻¹)	108.53 $\pm$ 24.50 ^a	6.31 $\pm$ 3.25 ^b	2.24 $\pm$ 0.26 ^b	14.39 $\pm$ 3.49 ^{bc}
GiP (pg·mL ⁻¹)	21.79 $\pm$ 4.90	6.62 $\pm$ 2.09	5.35 $\pm$ 1.03	13.09 $\pm$ 5.15
Leptin (ng·mL ⁻¹)	1.61 $\pm$ 0.10 ^a	0.58 $\pm$ 0.02 ^b	0.80 $\pm$ 0.09 ^{ab}	0.78 $\pm$ 0.06 ^{ab}
Adiponectin (ng·mL ⁻¹)	89.4 $\pm$ 2.3	95.1 $\pm$ 3.8	125.6 $\pm$ 6.6	75.9 $\pm$ 2.0
Testosterone (ng·mL ⁻¹)	3.57 $\pm$ 0.18 ^a	0.72 $\pm$ 0.03 ^b	0.61 $\pm$ 0.07 ^b	1.08 $\pm$ 0.15 ^{ab}
Corticosterone (ng·mL ⁻¹)	5.93 $\pm$ 0.45 ^{ab}	9.23 $\pm$ 0.42 ^a	1.00 $\pm$ 0.06 ^b	8.39 $\pm$ 0.67 ^a

Table 3

Plasma concentration of metabolites (means $\pm$ SEM) in Syrian hamsters during a long photoperiod at 20 °C (LP20), a short photoperiod at 20 °C (SP20) and a short photoperiod at 8 °C in Torpor or Arousal. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Metabolites	LP20	SP20	Torpor	Arousal
TG (mg·dL ⁻¹)	211.0 $\pm$ 12.0 ^a	191.0 $\pm$ 11.7 ^{ac}	104.3 $\pm$ 4.1 ^b	129.9 $\pm$ 12.3 ^{bc}
FFA (mg·dL ⁻¹)	2.81 $\pm$ 0.48 ^a	3.96 $\pm$ 0.71 ^{ab}	13.98 $\pm$ 5.01 ^b	1.34 $\pm$ 0.11 ^a
Glucose (mg·dL ⁻¹)	187.6 $\pm$ 16.7 ^a	214.5 $\pm$ 16.9 ^a	73.4 $\pm$ 3.8 ^b	185.8 $\pm$ 11.5 ^{ab}
Urea (mg·dL ⁻¹)	59.3 $\pm$ 3.0	63.2 $\pm$ 3.5	58.2 $\pm$ 4.4	69.7 $\pm$ 4.9
AcAc (mg·dL ⁻¹)	1.25 $\pm$ 0.07 ^a	1.41 $\pm$ 0.04 ^{ab}	1.61 $\pm$ 0.07 ^b	1.55 $\pm$ 0.08 ^{ab}
β -OHB (mg·dL ⁻¹)	0.47 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.06	0.43 $\pm$ 0.07

to body mass variations between the four groups (Fig. 3A); they were significantly lower in the Torpor and Arousal groups compared to SP20 and LP20 groups.

There was a 3-fold decrease in leptinemia in the SP20 group compared to the LP20 animals (Fig. 3B, Table 2). Even if leptinemia remained low in the Torpor and Arousal groups, no statistical difference was observed between these and the LP20 group. The plasma adiponectin concentration (Fig. 3B, Table 2) did not vary significantly among the four groups ($p = 0.065$). However, the value at arousal tended to decrease compared to the Torpor group ($p = 0.055$).

Morphology of the small intestine and plasma levels of incretins

Jejunal villi length did not vary between LP20, SP20 and Arousal groups (Fig. 4A). However, a 1.4-fold increase was observed in torpid animals compared to the LP20 group ($p = 0.003$).

A significant decrease (over 10-fold) of GLP-1 plasma concentration was observed in the SP20 and Torpor groups compared to the LP20 group (respectively, $p = 0.003$ and $p = 0.006$) (Fig. 4B, Table 2). At arousal, GLP-1 plasma concentration increased slightly and was not statistically different to the LP20 value ($p = 0.92$). A similar variation

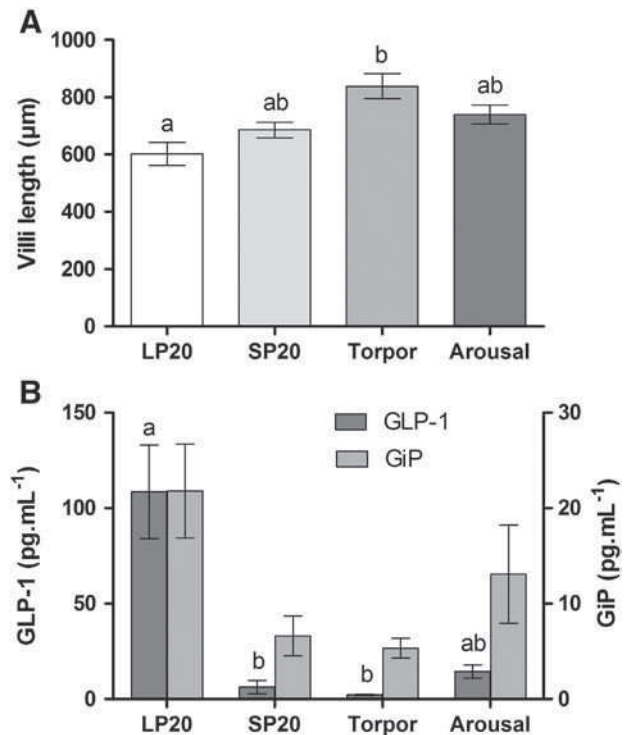


Fig. 4. A: Jejunal villi length, B: plasma GLP-1 and GiP concentrations (means $\pm$ SEM) of Syrian hamsters during a long photoperiod at 20 °C (LP20, $n = 8$), a short photoperiod at 20 °C (SP20, $n = 8$), at torpor ($n = 5$) and at arousal ($n = 5$). Different letters show significant differences ($p < 0.05$). Results are represented as means $\pm$ SEM.

pattern was observed for GiP plasma concentrations, but without statistical significance (Fig. 4B, Table 2).

Discussion

Variations in body mass, reproductive function and hormonal levels during the pre-hibernation period in Syrian hamsters

The decrease in testis size and plasma testosterone concentration indicated that short photoperiod causes a loss of reproductive function in Syrian hamsters. This is a pre-requisite for beginning hibernation (Pévet, 1988). Syrian hamsters also present a SP20-induced decrease in insulin and glucagon plasma levels that is consistent with previous studies (Bauman et al., 1987; Castex et al., 1984) and can be attributed to a decrease in the mass and activity of the pancreas (Bauman et al., 1987).

Contrary to fat-storing species that store large amounts of body fat during the pre-hibernation period (SP20) (golden-mantled ground squirrels: Kauffman et al., 2004; Alpine marmots (*Marmota marmota*): Ortman and Heldmaier, 2000; Richardson's ground squirrels (*Urocitellus richardsonii*): Michener and Locklear, 1990), Syrian hamsters do not gain body mass before hibernation. During the same period, plasma leptin levels significantly decrease in hamsters, whereas they increase in fat-storing species (Dark, 2005; Florant et al., 2004).

Consumption of lipid reserves during torpor bouts

During torpor, Syrian hamsters present a significant loss in body mass that can be mainly attributed to the consumption of fat reserves, as reflected by the loss in retroperitoneal and periepididymal fat pad masses, which is paralleled by an increase in circulating free fatty acids. Indeed, various studies have shown that lipids are the main energy substrate during torpor for food- as well as fat-storing species (reviewed in: Dark, 2005; Melvin and Andrews, 2009).

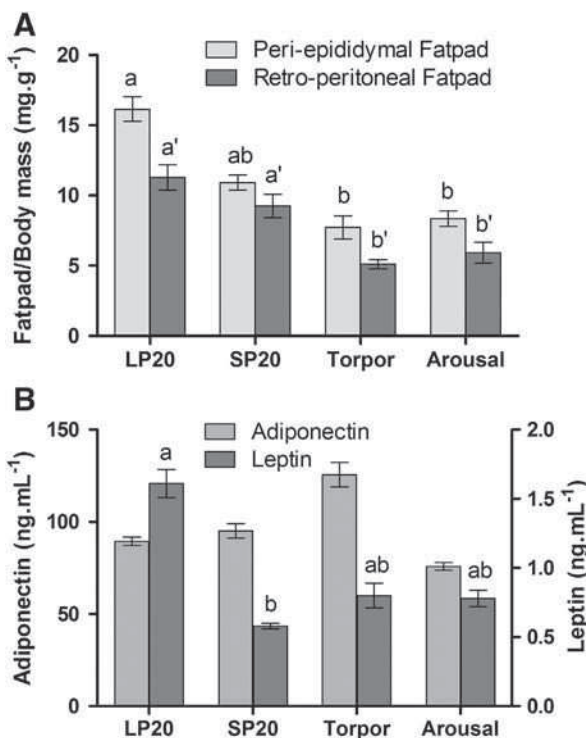


Fig. 3. A: Mass of the periepididymal and retroperitoneal fat pads relative to total body mass (means $\pm$ SEM), and B: plasma leptin and adiponectin concentrations of Syrian hamsters during a long photoperiod at 20 °C (LP20, $n = 8$), a short photoperiod at 20 °C (SP20, $n = 8$), at torpor ($n = 5$) and at arousal ($n = 5$). Different letters show significant differences ($p < 0.05$). Results are represented as means $\pm$ SEM.

Parallel to the decrease in fat mass in the Torpor group, plasma adiponectin tends to increase. This relationship is consistent, since adiponectin secretion is inversely proportional to the amount of white adipose tissue (Gavrila et al., 2003; Lafontan and Viguerie, 2006). Adiponectin has been shown to stimulate lipolysis (Fruebis et al., 2001; Masaki et al., 2003) and to inhibit gluconeogenesis (Combs et al., 2001; Yamauchi et al., 2002). Therefore, the increase in adiponectin during torpor can account for low glycemia and high levels of fatty acid disposal. Elevated adiponectin levels can also enable animals to maintain body temperature a few degrees above the ambient temperature, as shown in studies wherein adiponectin injections have stimulated thermogenesis in mice (Masaki et al., 2003; Qi et al., 2004). By contrast, a previous study in a fat-storing species (yellow-bellied marmots) reports an increase in serum adiponectin during the late active and fattening season compared to the lethargic season (Florant et al., 2004). Again, this result suggests different types of metabolic regulation in fat- and food-storing hibernators.

In the fasting state, circulating fatty acids are oxidized in muscles and/or converted to ketones in the liver (Cahill, 1970). Since torpor is a period of low energy needs and reduced enzymatic activities, muscle fatty acid oxidation and liver ketogenesis should, however, be limited compared to other fasting situations. This is also suggested in the current study, which reveals a high level of circulating fatty acids and high levels of insulinemia, which is generally associated with a decrease in the rate of fatty acid oxidation (reviewed in Dimitriadis et al., 2006). During fasting, plasma-free fatty acids can also be driven to the liver which converts them into ketone bodies. Indeed, an increase in plasma AcAc level is observed during torpor in Syrian hamsters, which is statistically significant compared to the LP20 group. Previous studies in fat-storing species also show a significant increase in plasma ketone bodies during torpor, but mostly β -OHB (Andrews et al., 2009; Krilowicz, 1985).

During torpor, the increase in plasma-free fatty acids is paralleled by a significant decrease in glycemia. This result is in agreement with observations made in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*; Dark et al., 1999) indicating a 28% decrease in blood glucose during daily torpor. However, it differs from results obtained in fat-storing hibernators, in which glycemia is preserved during torpor (Wang and Lee, 2011). The hypothesis can therefore be made that in food-storing species, low glycemia could be a signal to arise and re-feed.

Uremia has also been measured in fat-storing species (for example in the golden-mantled ground squirrel; Wit and Twente, 1983), and does not increase during torpor in the Syrian hamster, suggesting that proteins are not more catabolized than under LP20 and SP20 conditions. This is confirmed by body composition measurements indicating that total body protein does not decrease in torpid hamsters. This result coincides with a decrease in corticosteronemia, generally associated with protein sparing during fasting conditions (Challet et al., 1995).

Globally, these results show that seasonal torpor in the Syrian hamster can be compared to a short fasting phase, with elevated fatty acid disposal and ketogenesis, but the decreasing glycemia could be a signal for arousal and re-feeding. However, this last hypothesis remains to be proven through further studies aiming at measuring precisely the mechanisms of glucose metabolism, since gluconeogenesis is generally known to be enhanced during hibernation.

Jejunal villi length and plasma incretin levels during torpor bouts

A striking result of the current study is the increase of jejunal villi length during torpor compared to animals in long photoperiod. The digestive system thus seems to be preserved and even triggered during hibernation in food-storing species, in contrast to fat-storing species (Carey, 1990). This could allow increased digestive efficiency at arousal, as shown earlier by Humphries et al. (2001).

A significant decrease in plasma GLP-1 concentration is observed in the Torpor group compared to the LP20 group. This decrease is

concomitant with the decreasing size of fat depots and body mass and is consistent with the fact that GLP-1 has mainly a stimulatory role on anabolic processes (Baggio and Drucker, 2007). Remarkably, plasma GLP-1 levels already start decreasing during the pre-hibernation period, at the beginning of the body mass loss phase. Circulating levels of GiP show a similar variation trend. As GLP-1, GiP is mainly involved in anabolic pathways (Baggio and Drucker, 2007), including the incorporation of TG into adipocytes. GiP is also known to stimulate cell proliferation in bones and brain (Baggio and Drucker, 2007). Thus, this decrease could be interpreted as a further means to spare energy during torpor bouts through the lowering of the cell division rate in these organs.

Energy profiles during intertorpor arousal

All the measurements made in aroused Syrian hamsters in the current study are representative of a postprandial state: these animals have increased body mass compared to animals in torpor, due to food and water intake without fecal excretion (as indicated by food intake measurements and the mass of the content of the different parts of the digestive tract; data not shown). In addition, an increase in glycemia paralleled a decrease in plasma-free fatty acids. This latter result differs from previous observations in fat-storing animals that do not feed during periodic arousals and show high plasma-free fatty acid levels (Nelson et al., 2010). The postprandial state in Syrian hamsters during periodic arousal is also confirmed by a rise in plasma GLP-1, which secretion is generally stimulated by food intake (Baggio and Drucker, 2007). However, plasma triglycerides are still low and similar to those of animals in torpor, probably because these animals were euthanized soon after re-feeding.

Conclusion

The aim of the current study was to investigate the changes in energy substrate availability and plasma hormone levels during different phases of the hibernation cycle of the Syrian hamster, and to compare these results with fat-storing species that do not show the same feeding behavior. Variations in body composition and plasma adipokine levels were completely different in hamsters compared to fat-storing hibernators, even if our study reveals an increase in lipid availability during torpor bouts that is common to all species. Among the hormones that have never been measured previously in hibernating species, GLP-1 and GiP that are mostly involved in anabolic pathways, see their plasma levels decrease during the short photoperiod.

It would be interesting to further investigate the digestive and absorptive capacities during intertorpor arousals in food-storing species and to decipher the underlying mechanisms. In that way, we could establish whether the changes in incretin levels and more generally, the balance between catabolic and anabolic hormones' profiles observed in this study, could account for the reorientation of intermediary metabolism during the annual cycle of hamsters, including arousal and re-feeding behavior. However, further investigations are necessary to clearly demonstrate the role of each hormone and how it acts.

We are grateful to Aurélie Hranitzky for animal care, Mathilde Arrivé for her helpful advice for hormone measurements, and Dominique Ciocca for her helpful advice about hamster breeding, and the use and implantation of iButtons.

References

- Andrews, M.T., Russeth, K.P., Drewes, L.R., Henry, P.-G., 2009. Adaptive mechanisms regulate preferred utilization of ketones in the heart and brain of a hibernating mammal during arousal from torpor. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R383–R393.
- Armitage, K.B., 1991. Factors affecting corticosteroid concentrations in yellow-bellied marmots. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 98, 47–54.
- Baggio, L.L., Drucker, D.J., 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132, 2131–2157.

- Bauman, W. a, Meryn, S., Florant, G.L., 1987. Pancreatic hormones in the nonhibernating and hibernating golden mantled ground squirrel. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 86, 241–244.
- Buck, C.L., Barnes, B.M., 2000. Effects of ambient temperature on metabolic rate, respiratory quotient, and torpor in an arctic hibernator. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R255–R262.
- Cahill, G.J., 1970. Starvation in man. *N. Engl. J. Med.* 282, 668–675.
- Campbell, R.R., Leatherland, J.F., 1980. Estimating body protein and fat from water content in lesser snow geese. *J. Wildl. Manag.* 44, 438–446.
- Carey, H.V., 1990. Seasonal changes in mucosal structure and function in ground squirrel intestine. *Am. J. Physiol.* 259, R385–R392.
- Carey, H.V., 1995. Gut feelings about hibernation. *News Physiol. Sci.* 10, 55–61.
- Castex, C., Tahri, A., Hoo-Paris, R., Sutter, B.C., 1984. Insulin secretion in the hibernating edible dormouse (*Glis glis*): in vivo and in vitro studies. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 79, 179–183.
- Challet, E., le Maho, Y., Robin, J.P., Malan, A., Cherel, Y., 1995. Involvement of corticosterone in the fasting-induced rise in protein utilization and locomotor activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50, 405–412.
- Combs, T.P., Berg, A.H., Obici, S., Scherer, P.E., Rossetti, L., 2001. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J. Clin. Invest.* 108, 1875–1881.
- Dark, J., 2005. Annual lipid cycles in hibernators: integration of physiology and behavior. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 469–497.
- Dark, J., Lewis, D.A., Zucker, L., 1999. Hypoglycemia and torpor in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol.* 276, R776–R781.
- Darrow, J.M., Duncan, M.J., Bartke, A., Bona-Gallo, A., Goldman, B.D., 1988. Influence of photoperiod and gonadal steroids on hibernation in the European hamster. *J. Comp. Physiol. A* 163 (3), 339–48.
- Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Boutati, E., Maratou, E., Panagiotakos, D.B., Koukkou, E., Tzanela, M., Thalassinou, N., Raptis, S. a, 2006. Insulin action in adipose tissue and muscle in hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 4930–4937.
- Florant, G.L., Hoo-Paris, R., Castex, C., Bauman, W.A., Sutter, B.C., 1986. Pancreatic A and B cell stimulation in euthermic and hibernating marmots (*Marmota flaviventris*): effects of glucose and arginine administration. *J. Comp. Physiol. B* 156 (3), 309–14.
- Florant, G.L., Porst, H., Peiffer, A., Hudachek, S.F., Pittman, C., Summers, S.A., Rajala, M.W., Scherer, P.E., 2004. Fat-cell mass, serum leptin and adiponectin changes during weight gain and loss in yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*). *J. Comp. Physiol. B* 174, 633–639.
- Fruebis, J., Tsao, T.S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R., Yen, F.T., Bihani, B.E., Lodish, H.F., 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2005–2010.
- Gavrilu, A., Chan, J.L., Yiannakouris, N., Kontogianni, M., Miller, L.C., Orlova, C., Mantzoros, C.S., 2003. Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 4823–4831.
- Geiser, F., 2004. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu. Rev. Nutr.* 66, 239–274.
- Healy, J.E., Ostrom, C.E., Wilkerson, G.K., Florant, G.L., 2010. Plasma ghrelin concentrations change with physiological state in a sciurid hibernator (*Spermophilus lateralis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 372–378.
- Heldmaier, G., Ortmann, S., Elvert, R., 2004. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 141, 317–329.
- Hoo-Paris, R., Castex, C., Hamsany, M., Thari, A., Sutter, B., 1985. Glucagon secretion in the hibernating edible dormouse (*Glis glis*). *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 81 (2), 277–281.
- Horton, T.H., Buxton, O.M., Losee-Olson, S., Turek, F.W., 2000. Twenty-four-hour profiles of serum leptin in siberian and golden hamsters: photoperiodic and diurnal variations. *Horm. Behav.* 37 (4), 388–398.
- Humphries, M.M., Thomas, D.W., Kramer, D.L., 2001. Torpor and digestion in food-storing hibernators. *Physiol. Biochem. Zool.* 74, 283–292.
- Humphries, M.M., Thomas, D.W., Kramer, D.L., 2003. The role of energy availability in mammalian hibernation: a cost-benefit approach. *Physiol. Biochem. Zool.* 76, 165–179.
- Jansky, L., Haddad, G., Kahlerova, Z., Nedoma, J., 1984. Effect of external factors on hibernation of golden hamsters. *J. Comp. Physiol. B* 154, 427–433.
- Kauffman, A.S., Paul, M.J., Zucker, L., 2004. Increased heat loss affects hibernation in golden-mantled ground squirrels. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R167–R173.
- Kayser, C., 1952. Les échanges respiratoires du hamster doré (*Mesocricetus auratus*) en léthargie hivernale. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil. CXLVI.* 929.
- Krilowicz, B.L., 1985. Ketone body metabolism in a ground squirrel during hibernation and fasting. *Am. J. Physiol.* 249, R462–R470.
- Kronfeld-Schor, N., Richardson, C., Silvia, B.A., Kunz, T.H., Widmaier, E.P., 2000. Dissociation of leptin secretion and adiposity during prehibernatory fattening in little brown bats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R1277–R1281.
- Lafontan, M., Viguier, N., 2006. Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 580–585.
- Lasa, A., Churrua, I., Simón, E., Macarulla, M.T., Fernández-Quintela, A., Rodríguez, V.M., Portillo, M.P., 2009. Effects of high-fat high-sucrose feeding, energy restriction, and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on visfatin and apelin in hamsters. *J. Am. Coll. Nutr.* 28, 627–635.
- Malan, A., Mioskowski, E., Calgari, C., 1988. Time-course of blood acid-base state during arousal from hibernation in the European hamster. *J. Comp. Physiol. B* 158, 495–500.
- Masaki, T., Chiba, S., Yasuda, T., Tsubone, T., Kakuma, T., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Yoshimatsu, H., 2003. Peripheral, but not central, administration of adiponectin reduces visceral adiposity and upregulates the expression of uncoupling protein in agouti yellow (Ay/a) obese mice. *Diabetes* 52, 2266–2273.
- Melvin, R.G., Andrews, M.T., 2009. Torpor induction in mammals: recent discoveries fueling new ideas. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 490–498.
- Michener, G., Locklear, L., 1990. Over-winter weight loss by Richardson's ground squirrels in relation to sexual differences in mating effort. *J. Mammal.* 71, 489–499.
- Nelson, C.J., Otis, J.P., Carey, H.V., 2010. Global analysis of circulating metabolites in hibernating ground squirrels. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 5, 265–273.
- Ortmann, S., Heldmaier, G., 2000. Regulation of body temperature and energy requirements of hibernating alpine marmots (*Marmota marmota*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R698–R704.
- Pévet, P., 1988. The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species. *Reprod. Nutr. Dev.* 28, 443–458.
- Qi, Y., Takahashi, N., Hileman, S.M., Patel, H.R., Berg, A.H., Pajvani, U.B., Scherer, P.E., Ahima, R.S., 2004. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat. Med.* 10, 524–529.
- Schneider, J.E., Blum, R.M., Wade, G.N., 2000. Metabolic control of food intake and estrous cycles in syrian hamsters I. Plasma insulin and leptin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278 (2), R476–85.
- Shivatcheva, T.M., Ankov, V.K., Hadjioloff, A.I., 1988. Circannual fluctuations of the serum cortisol in the European ground squirrel, *Citellus citellus* L. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 90, 515–518.
- Van Breukelen, F., Martin, S.L., 2002. Invited review: molecular adaptations in mammalian hibernators: unique adaptations or generalized responses? *J. Appl. Physiol.* 92, 2640–2647.
- Wang, L.C.H., Lee, T.F., 2011. Torpor and hibernation in mammals: metabolic, physiological, and biochemical adaptations. *Compr. Physiol.* John Wiley & Sons, Inc., pp. 507–532.
- Wit, L.C., Twente, J.W., 1983. Metabolic responses of hibernating golden-mantled ground squirrels *Citellus lateralis* to lowered environmental temperatures. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 74, 823–827.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B.B., Kadowaki, T., 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 8, 1288–1295.

Etude 2: Intestinal absorptive capacities of a food-storing hibernator, the European hamster, during hibernation.

Maintien d'un système digestif fonctionnel au cours du cycle annuel chez un hibernant food-storing, le hamster d'Europe

Introduction

La diminution de la dépense énergétique pendant l'hibernation s'accompagne d'un ralentissement des fonctions de l'organisme et d'une atrophie de certains organes dont le système digestif chez les espèces hibernantes fat-storing qui ne se nourrissent plus pendant l'hibernation. Les espèces hibernantes food-storing, qui s'alimentent pendant les phases d'euthermie inter-torpeurs, maintiennent à l'inverse un système digestif fonctionnel pendant l'hibernation, en dépit du coût énergétique occasionné. Le but de notre étude est donc d'évaluer les capacités d'absorption d'une espèce food-storing, le hamster d'Europe, tout au long de son cycle annuel.

Matériels & Méthodes

Des perfusions intestinales *in vivo* ont été menées sur quatre groupes de hamsters (n = 5): avant l'hibernation, au cours de la torpeur, au cours de l'euthermie inter-torpeurs et au cours du repos estival. Les concentrations de triglycérides, d'acides gras libres, d'amidon, de glucose et de protéines des perfusats ont été mesurées avant et après une perfusion intestinale d'une heure effectuée en circuit fermé, à un débit constant de 2mL/min. Les taux d'hydrolyse des triglycérides, de l'amidon et des protéines, ainsi que l'absorption intestinale de glucose et d'acides gras ont été calculés à partir de ces mesures. Après la perfusion, l'ensemble de la muqueuse intestinale a été prélevée et pesée. Du sang a également été prélevé dans le sinus veineux sublingual avant et après perfusion afin de mesurer les variations de concentrations en glucose occasionnées par l'absorption de nutriments pendant la perfusion.

Résultats & Discussion

La masse de la muqueuse intestinale est significativement inférieure chez les animaux en hibernation (groupes torpeur et euthermie) par rapport aux animaux en repos estival. Cette différence n'est en revanche plus significative si les animaux en hibernation sont comparés à ceux avant hibernation. Malgré cela, les capacités d'hydrolyse intestinale des triglycérides, de l'amidon et des protéines sont maintenues pendant l'hibernation à des valeurs similaires à celles des animaux hors hibernation. De même, le taux d'absorption des acides gras reste stable tout au long du cycle annuel. Par contre, l'absorption du glucose est augmentée chez les animaux en torpeur et en euthermie inter-torpeurs par rapport aux animaux avant hibernation (+140%) et en repos estival (+175%), permettant une augmentation de la glycémie similaire dans les quatre groupes. Ces résultats suggèrent une activité accrue des enzymes et transporteurs intestinaux pendant l'hibernation. Une augmentation de l'absorption de glucose permettrait une restauration très rapide des réserves endogènes du glucose consommé lors des périodes de réchauffement, et permettrait de limiter l'utilisation des réserves lipidiques au cours de l'hibernation.

Conclusion

En lien avec leur stratégie d'accumulation d'énergie différente avant l'hibernation, ces résultats montrent qu'à la différence des espèces fat-storing, les capacités d'hydrolyse et d'absorption intestinales des espèces food-storing sont totalement maintenues voire exacerbées pendant l'hibernation pour optimiser l'assimilation des nutriments lors des courts réveils inter-torpeurs.



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpa

Maintenance of a fully functional digestive system during hibernation in the European hamster, a food-storing hibernator

Mathieu Weitten^{a,b,*}, Hugues Oudart^c, Caroline Habold^{a,b,*}^a Université de Strasbourg, IPHC, 23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France^b CNRS, UMR 7178, 67037 Strasbourg, France^c INSERM U1118/UdS, Mécanismes centraux et périphérique de la neurodégénérescence, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2015

Received in revised form 14 December 2015

Accepted 10 January 2016

Available online 13 January 2016

Keywords:

Cricetus cricetus

Food-storing

Small intestine

In vivo intestinal uptake measurements

Torpor

Arousal

ABSTRACT

Some small mammals limit energy expenditure during winter conditions through torpor bouts, which are characterized by a decrease in body temperature and metabolic rate. Individuals arise periodically from torpor to restore critical functions requiring euthermia. Although most of the species involved do not feed during hibernation and rely on body reserves to fulfil energy requirements (fat-storing species), others hoard food in a burrow (food-storing species) and can feed during interbout euthermia. Whereas fat-storing species undergo a marked atrophy of the digestive tract, food-storing species have to maintain a functional digestive system during hibernation. Our study aimed to evaluate the absorption capacities of a food-storing species, the European hamster, throughout the annual cycle. In vivo intestinal perfusions were conducted in different groups of hamsters ($n = 5$) during the different life periods, namely before hibernation, in torpor, during interbout euthermia, and during summer rest. The triglyceride, non-esterified free fatty acid, starch, glucose and protein composition of the perfusate was evaluated before and after the 1 h perfusion of a closed intestinal loop. Triglyceride, starch and protein hydrolysis rates were similar in hibernating (torpid and euthermic) and non-hibernating hamsters. Intestinal absorption of free fatty acid was also similar in all groups. However, glucose uptake rate was higher during hibernation than during the summer. In contrast with fat-storing species, the intestinal absorption capacities of food-storing species are fully maintained during hibernation to optimize nutrient assimilation during short interbout euthermia. In particular, glucose uptake rate is increased during hibernation to restore glycaemia and ensure glucose-dependent pathways.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Seasonal decrease in food resources is a challenge for animals living under temperate latitudes. Specific adaptations such as hibernation have remained throughout evolution to enable individuals to limit energy expenditure and cope with winter conditions. Hibernation is a period of hypometabolism associated with decreased metabolic rate and body temperature. Hibernating rodents periodically arise from these hypothermic states, called *torpor bouts*, then return to eumetabolism and euthermia (reviewed in: Heldmaier et al., 2004). The majority of hibernating species do not feed during hibernation and rely solely on body reserves for their energy requirements (fat-storing species), whereas other hibernating species such as hamsters or chipmunks hoard food in a burrow (food-storing species) and feed between torpor bouts

(reviewed in: Humphries et al., 2001; Geiser, 2004). In both cases, hibernation can be considered as a fasting state of variable duration [from 4 days in food-storing to several months in fat-storing species (Humphries et al., 2003)].

The absorption of food by the digestive tract depends on the intestinal surface area and the activities of digestive enzymes and intestinal transporters. The mechanisms involved in digestion and absorption when food is abundant have already been investigated in depth (Eckert et al., 1978; Kellett and Helliwell, 2000; Kellett, 2001; Hirsch and Cheeseman, 1998; Stahl et al., 1999, 2001; Bonen et al., 2007; Munck et al., 2000; Verrey et al., 2000). Carbohydrate digestion begins in the mouth, and continues in the small intestine (Eckert et al., 1978). The resulting monosaccharides are mainly glucose, and are absorbed through the apical wall of the enterocytes via energy-dependent or facilitative transporters (Kellett and Helliwell, 2000; Kellett, 2001). Triglycerides are digested by pancreatic lipase to yield monoacylglycerol and non-esterified fatty acids (NEFA), both of which can efficiently diffuse or be transported into the enterocytes (Hirsch and Cheeseman, 1998; Stahl et al., 1999, 2001; Bonen et al., 2007). Finally, proteins are hydrolysed into short peptides and amino acids by pancreatic and intestinal peptidases, respectively (Eckert et al., 1978) before being absorbed

Abbreviations: IBE, interbout euthermia; L/D, light/dark; NEFA, non-esterified fatty acid; TG, triglyceride.

* Corresponding authors at: Université de Strasbourg, IPHC, 23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France.

E-mail addresses: mathieu.weitten@iphc.cnrs.fr (M. Weitten), caroline.habold@iphc.cnrs.fr (C. Habold).

through ion cotransport by specific transporters (Munck et al., 2000; Verrey et al., 2000).

Many studies have explored morphological changes (Carey, 1989, 1990; Hume et al., 2002; Fleck and Carey, 2005) and food absorption capacities (Carey and Sills, 1992; Carey and Martin, 1996; Carey, 2001; Balslev-Clausen et al., 2003; Carey et al., 2012) in hibernating, fat-storing species. A marked atrophy of the small intestine occurs during hibernation in thirteen-lined ground squirrels (*Ictidomys tridecemlineatus*), with a decrease in jejunal villi length and density, and lower mucosal wet weight and protein content (Carey, 1990). In alpine marmots (*Marmota marmota*), a decrease was observed in the fresh tissue mass of all digestive organs (stomach, intestine, caecum and colon) during hibernation (Hume et al., 2002). The atrophy of the digestive organs is a consequence of fasting, and allows individuals to limit protein turnover, which is extremely costly in energy (Young et al., 1983; Macrae and Lobley, 1986). Contrariwise, some genes encoding for intestinal enzymes like sucrase or isomaltase are still expressed continuously throughout hibernation in thirteen-lined ground squirrels (Carey and Martin, 1996), whereas amylase gene expression is reduced by ~40% (Balslev-Clausen et al., 2003). Furthermore, studies performed on isolated ground squirrel intestine reveal a maintenance of glucose and amino acid absorption (at 37 °C) until at least the sixth week of hibernation (Carey and Sills, 1992, 1996). As suggested by Carey and Martin (1996), the maintaining of intestinal absorptive capacities throughout hibernation should enable the immediate absorption of nutrients when the individual emerges in spring.

Contrary to fat-storing species, some food-storing species preserve their intestinal morphology (jejunal villi length) throughout the hibernation period (Weitten et al., 2013). Their digestive enzyme activities also continue, as shown through in vitro measurements of sucrase, isomaltase, lactase and aminopeptidase activities in European hamsters (Galluser et al., 1988) and illustrated by a modelling study demonstrating a positive relationship between digestibility and torpor in chipmunks (Humphries et al., 2001). The maintenance of intestinal structure and function might allow the immediate absorption of food by animals refeeding during euthermic phases (Humphries et al., 2001). Indeed, the interbout euthermic phases are too short [less than 48 h (Fig. 1)] to ensure a complete restoration of small intestine morphology and function. We hypothesised that food-storing species are able to optimize food digestion and absorption during short IBE thanks to the maintenance of a fully functional digestive tract throughout the hibernation period. To test our hypothesis, we evaluated the food digestion and absorption capacities of European hamsters throughout the annual cycle through in vivo intestinal perfusion.

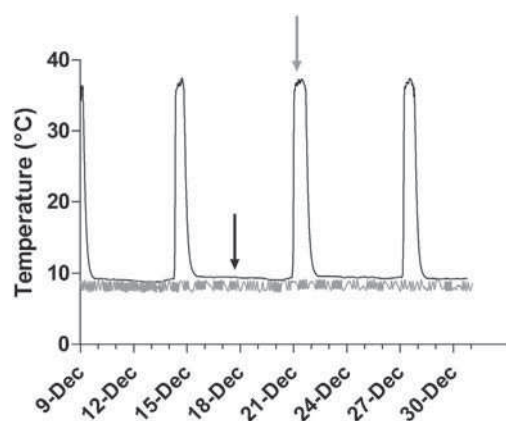


Fig. 1. Core temperature (black line) (°C) of one European hamster in midwinter, recorded over a three-week period. The grey line shows air temperature. The average time at which anaesthesia was carried out is indicated with a black arrow (Torpor group) and a grey arrow (IBE group).

2. Material and methods

The experimental protocol followed the EU Directive 2010/63/UE for animal experiments and the care and use of laboratory animals, and was validated by an Ethical Committee under agreement AL/03/32/12/12.

2.1. Animals

Twenty female European hamsters (*Cricetus cricetus*) were studied, aged 41 weeks and weighing 202.4 ± 6.3 prior to the experiment. All animals were supplied by Chronobiotron (Strasbourg, France). The hamsters were housed individually in standard cages and had ad libitum access to water and food (pellet N° 105 from Safe, Augy, France). Animals were placed in the photoperiodic and thermal conditions described in Table 1 to reproduce the environmental conditions of the annual hamster cycle. Hibernation in this species is controlled by an endogenous circannual clock (Monecke et al., 2015), and occurs from mid-October to mid-March.

2.1.1. Experimental groups

To evaluate the absorption capacity throughout the annual cycle, experimental procedures were conducted on hamsters at four different physiological states. Two of these states occur during the hibernation period, i.e. torpor (in the middle of a torpor bout, i.e. after 48 h of torpor, considering that the average duration of a torpor bout is $4.5 \text{ days}/108 \pm 2.5 \text{ h}$ in European hamsters) and interbout euthermia (IBE) (Fig. 1). The other two states occur prior to hibernation (in September, Pre-hib) and one after reproduction (in June, Summer).

Before starting the perfusion experiment, all torpid animals were quickly warmed under an infrared lamp, and the experiment started when rectal temperature exceeded 35 °C.

2.1.2. Intestinal perfusion

The experiments were conducted between 10.00 and 12.00 am. After an overnight fast to ensure that the digestive tract was empty, the animals were anaesthetised (5% isoflurane in $1.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ oxygen for induction, followed by an intraperitoneal injection of 200 mg/kg Ketamine–0.1 mL/kg Xylasin), weighed (to the nearest 0.1 g) and placed in the supine position under an oxygen flux ($1.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) on a warm surgery table (37 °C) to maintain body temperature.

Sublingual blood samples (100 µL) were taken (as describe by Heimann et al., 2009) with a heparinized capillary tube before and after the intestinal perfusion. All the blood samples were conserved on ice in heparinized microtubes until centrifugation (1500g, 15 min), and plasma was conserved at -80 °C until glycaemia measurements were performed.

The abdomen was shaved and a midline laparotomy was performed from below the umbilicus gland to the xyphoid appendicle. The small intestine was isolated and the luminal content was removed by gently flushing with saline solution at 37 °C. An intestinal loop (from the cardia to the ilio-caecal junction) was cannulated to allow a continuously recirculating perfusion at 37 °C at a flow rate of 2 mL/min with a 30 mL perfusion solution. The perfusion solution was composed of 0.9% NaCl, 10% starch (88% purity, ref: 102955, MP Biomedicals, USA), 8.2% soy proteins (92% purity, ref: 905456, MP Biomedicals, USA), 5% oil (Frial, Lesieur, France, 10% saturated fatty acid, 44% mono-unsaturated acid, 46% polyunsaturated acid), 0.8% AIN-76 mineral mixture (ref: 905455, MP Biomedicals, USA) and 76% H_2O –NaCl 0.9% (in % of mass). After 1 h of perfusion, all remaining perfusate was collected and its volume was measured.

Perfusate samples were taken before and after the perfusion. They were immediately frozen in liquid nitrogen then stored at -80 °C until analysis.

The animals were killed after the absorptive period. The small intestine was excised and the mucosa was scraped free of the underlying tissue and weighed.

Table 1

Photoperiodic and thermal conditions for each group.

Groups	Pre-hib n = 5	48 h torpor n = 5	IBE n = 5	Summer n = 5
Conditions				
Ambient temperature	8 °C	8 °C	8 °C	20 °C
Photoperiod	L/D:10 h/14 h	L/D:10 h/14 h	L/D:10 h/14 h	L/D:14 h/10 h

2.2. Rates of TG, starch and protein hydrolysis and NEFA and glucose absorption

The concentrations of TG, NEFA, starch, glucose and proteins were measured using commercial kits (BioAssaySystems: ETGA-200, EFAA-100, E2ST, DIGL-100 and Uptima interchim: BCA Assay UP95424A, respectively).

Triglyceride, starch and protein hydrolysis rates are expressed in mg hydrolysed per minute of perfusion, following Eq. (1):

$$\text{Triglyceride, starch or protein hydrolysis rate} = \frac{\text{Amount before perfusion (mg)} - \text{amount after perfusion (mg)}}{\text{Duration of perfusion (min)}} \quad (1)$$

Glucose absorption rate was calculated using the concentrations of starch and glucose in the perfusate before and after perfusion, following Eq. (2):

$$\begin{aligned} \text{Absorbed glucose } (\text{g} \cdot \text{mg mucosa}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) &= (\text{Starch prior perfusion } (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})) \\ &\quad * \text{Volume of perfusate prior perfusion (L)} \\ &\quad - (\text{Starch after perfusion } (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})) \\ &\quad + \text{Glucose after perfusion } (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})) \\ &\quad * \text{Volume perfusate after perfusion (L)} \\ &\quad * \text{Molar Mass of Glucose } (\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}) \\ &\quad * \text{Duration of perfusion (min}^{-1}) \\ &\quad * \text{Intestinal mucosal wet mass (mg}^{-1}). \end{aligned} \quad (2)$$

Glucose prior to perfusion was equal to zero and was therefore removed from Eq. (2). The same equation was used to calculate total intestinal glucose absorption, but without dividing by intestinal mucosal wet mass.

The NEFA absorption rate was calculated using the concentrations of TG and NEFA in the perfusate before and after perfusion, according to Eq. (3):

$$\begin{aligned} \text{Absorbed NEFA } (\text{mol} \cdot \text{mg mucosa}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) &= (\text{Triglyceride before perfusion (mol)}) \\ &\quad - \text{Triglycerides after perfusion (mol)} \\ &\quad * 2 + \text{NEFA before perfusion (mol)} - \text{NEFA after perfusion (mol)} \\ &\quad * \text{Duration of perfusion (min}^{-1}) \\ &\quad * \text{Intestinal mucosal wet mass (mg}^{-1}). \end{aligned} \quad (3)$$

The same equation was used to calculate total intestinal NEFA absorption, but without dividing by intestinal mucosal wet mass.

A glucometer was used to measure glycaemia before and after perfusion, and the difference between these values was calculated.

2.3. Statistical analyses

Statistical analyses of all data were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. One-way ANOVA and a LSD post-hoc test were performed, followed by a Benjamini–Hochberg false discovery rate correction (Benjamini and Hochberg, 1995). Differences were considered significant when $p < 0.05$. All results are represented as mean values $\pm$ SEM.

3. Results

3.1. Intestinal mucosal fresh mass

A Benjamini–Hochberg correction produced a q^* value of 0.017 for these data. A significant 2-fold increase in mucosal fresh mass could be observed between the Torpor and Summer groups ($p = 0.003$) and between the IBE and Summer groups ($p = 0.01$) (Fig. 2). However, no significant differences appeared between the Pre-hib and other groups ($p = 0.049$, $p = 0.15$, $p = 0.54$ with the Torpor, IBE and Summer groups, respectively).

3.2. Intestinal triglyceride hydrolysis and NEFA uptake rates

TG hydrolysis rate was similar in all groups ($p = 0.28$) (Fig. 3A). NEFA uptake rate per mg of mucosa did not vary between groups ($p = 0.33$) (Fig. 3B), and no significant variations were observed in total intestinal NEFA uptake among groups ($p = 0.29$) (Fig. 3C).

3.3. Rates of intestinal starch hydrolysis and glucose uptake

Intestinal starch hydrolysis did not vary throughout the annual life cycle of hamsters ($p = 0.08$) (Fig. 4A). Glucose uptake rate during in vivo intestinal perfusion was calculated according to Eq. (2). Similar glucose uptake rates per mg mucosa were observed in the Torpor and IBE groups ($p = 1$), and also in the Pre-hib and Summer groups ($p = 1$) (Fig. 4B). The values were significantly higher in the Torpor and IBE groups compared to the Pre-hib ($p < 0.001$) and Summer groups

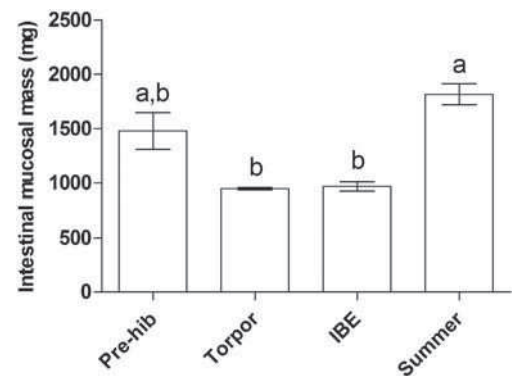


Fig. 2. Intestinal mucosal fresh mass (mg) of European hamsters in the pre-hibernation season (Pre-hib, $n = 5$), in torpor (Torpor, $n = 5$), in interbout euthermia (IBE, $n = 5$) and during the summer (Summer, $n = 5$). Different letters show significant differences ($p < 0.05$). Results are represented as mean values $\pm$ SEM.

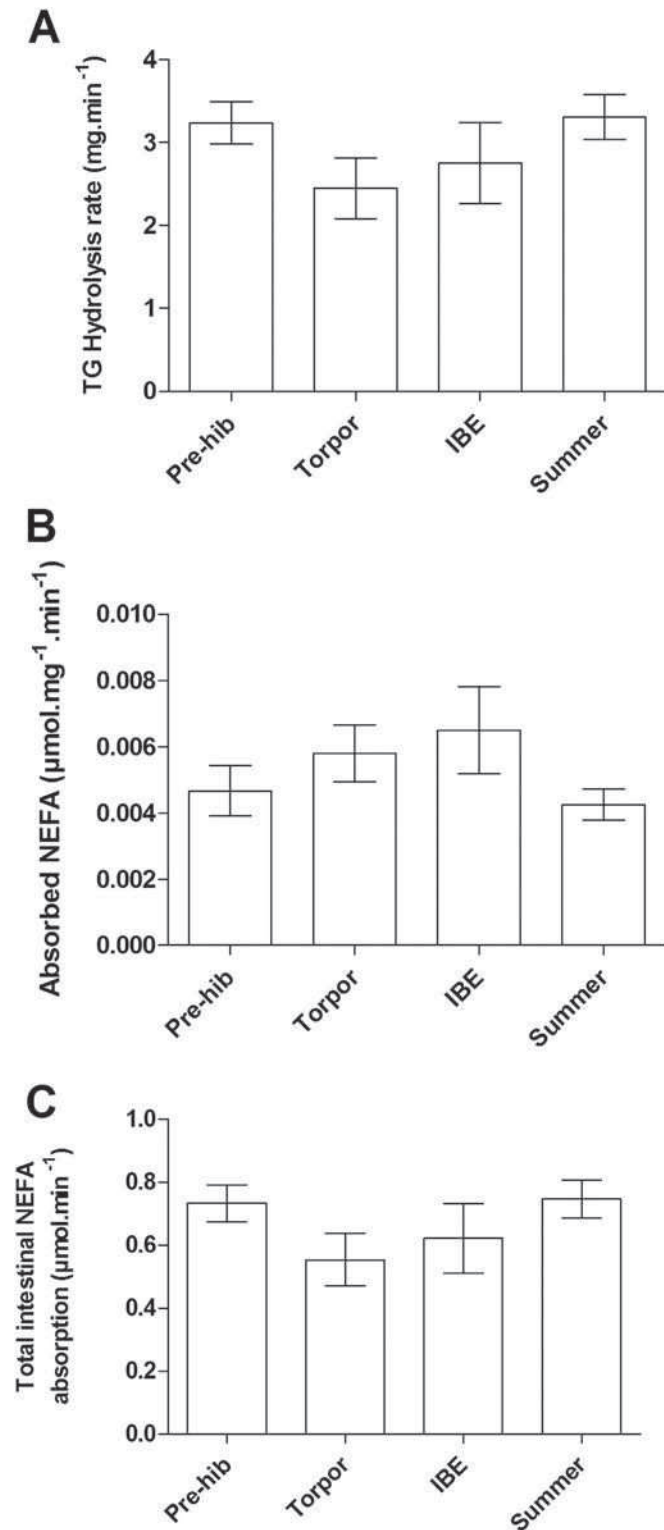


Fig. 3. A: Triglyceride hydrolysis rate ($\text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$), B: NEFA uptake rate ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) per mg of intestinal mucosa, and C: total intestinal NEFA uptake rate ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) of European hamsters during the pre-hibernation season (Pre-hib, $n = 5$), torpor (Torpor, $n = 5$), interbout euthermia (IBE, $n = 5$) and summer time (Summer, $n = 5$). Different letters show significant differences ($p < 0.05$). Results are represented as mean values $\pm$ SEM.

($p = 0.0001$), with values 2.4 and 3 times higher, respectively. The Benjamini–Hochberg correction produced a q^* value equal to 0.033 for these data. Total intestinal glucose uptake was also significantly different

between the IBE and Summer groups ($p = 0.018$) and between the Torpor and Summer groups ($p = 0.008$) (Fig 4C). The Benjamini–Hochberg correction produced a q^* value equal to 0.018 for these data.

Finally, the increase in glycaemia according to perfusion was similar in all groups ($p = 0.55$) (Fig. 4D).

3.4. Protein hydrolysis rate

Protein hydrolysis rate did not vary between groups after statistical analysis ($p = 0.1$) (Fig. 5).

4. Discussion

This study demonstrates the capacity of a food-storing hibernator to assimilate food efficiently during hibernation. An increase in glucose absorption rate during interbout euthermia has been shown to restore the glycogen supply and ensure glucose-dependent functions such as shivering thermogenesis during rewarming (Musacchia and Jansky, 1981). Maintaining food assimilation during hibernation entails morphological and functional adaptations of the digestive tract, thus ensuring the maintenance of absorptive surface area and of molecules involved in digestion and absorption processes.

Intestinal digestion and the absorption of nutrients are achieved through the involvement of proteins located in intestinal cell membranes. Their conformation and/or interactions are affected by not only the fluidity and composition of the phospholipid bilayer, but also the interactions between phospholipid fatty acids and proteins (Lee, 2004; Arnold et al., 2015). During hibernation, cell membrane fluidity is preserved at all body temperatures (reviewed in Aloia, 1980 or Azzam et al., 2000), making enzyme activities and cell membrane trafficking pathways possible. We hypothesise that the occurrence of other functional adaptations during hibernation may model gene or protein expression levels and/or intestinal surface area, thus ensuring the rapid and efficient hydrolysis and absorption of nutrients when animals re-feed. These adaptations may differ according to the class of nutrient (lipids, carbohydrates and proteins) and the way they are hydrolysed and absorbed (i.e. through active or passive pathways).

4.1. TG hydrolysis and NEFA absorption

No decrease was observed in TG hydrolysis rate during hibernation in European hamsters. These findings could reinforce those of previous studies, and may suggest that neither the synthesis and secretion of pancreatic lipase nor bile composition is affected by torpor. Indeed, although a decrease was observed in pancreatic mass during hibernation (Bauman et al., 1987), this does not necessarily lead to decreased lipase content, as shown in three-day starved rats experiencing a similar decrease in pancreatic mass (Nagy et al., 1989). It is also important to note that pancreatic lipase mRNA in hibernating species has been shown to be continuously synthesized and translated into protein (Squire and Andrews, 2003), whereas bile composition does not vary compared to summer values (Baker and van Breukelen, 2009).

NEFA and monoacylglycerol resulting from the TG emulsification process and digestion by pancreatic lipase are mainly absorbed by enterocytes via passive transport, proportionally to intestinal surface area. In the current study, NEFA absorption remained unchanged during hibernation despite decreased mucosal mass. This result strongly suggests an increase in transporter-mediated NEFA absorption during hibernation.

4.2. Starch hydrolysis and glucose absorption

The maintenance of starch hydrolysis observed in hibernating European hamsters in the current study is in accordance with the results of Galluser et al. (1988), who measured intestinal enzyme activities ex vivo in the same model. Among the enzymes studied by these

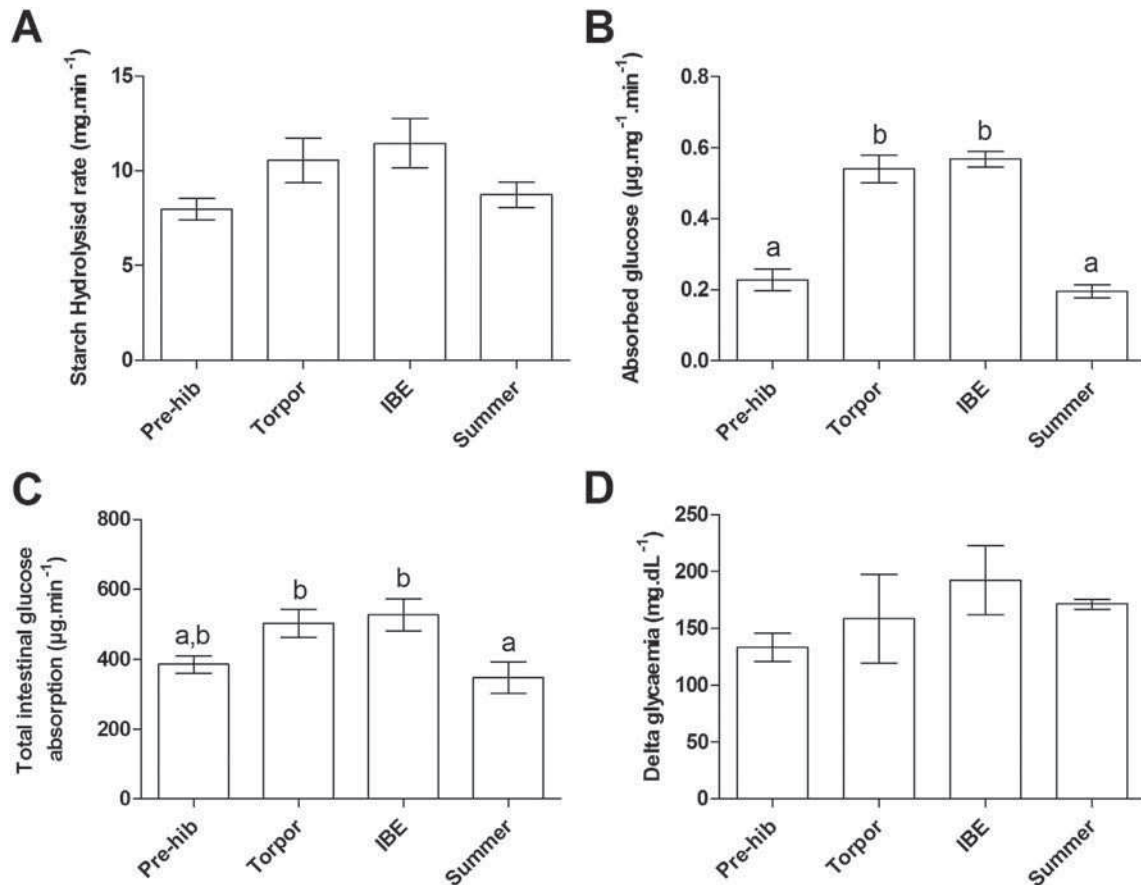


Fig. 4. A: Starch hydrolysis rate ($\text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$), B: glucose uptake rate ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$) per mg of intestinal mucosa, C: total intestinal glucose uptake rate ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$), and D: delta glycaemia (values prior to intestinal perfusion deducted from post-perfusion values; $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$) of European hamsters during pre-hibernation season (Pre-hib, $n = 5$), torpor (Torpor, $n = 5$), interbout euthermia (IBE, $n = 5$) and summer time (Summer, $n = 5$). Different letters show significant differences ($p < 0.05$). Results are represented as mean values $\pm$ SEM.

authors, sucrase and isomaltase activities are maintained during hibernation, whereas lactase activity is even enhanced (Galluser et al., 1988). Similarly, a study conducted on a fat-storing species, the thirteen-lined ground squirrel, reveals the maintenance of sucrase-isomaltase gene expression during hibernation (Carey and Martin, 1996). In contrast with these results and also with ours, lower levels

of specific pancreatic amylase activity have been observed during hibernation in ground squirrels than during the summer period (Balslev-Clausen et al., 2003), doubtlessly linked to the lower pancreatic mass (Bauman et al., 1987).

Parallel to the maintained starch hydrolysis, we observed a higher intestinal glucose uptake rate during hibernation compared to the summer period. Such increase in glucose absorption normalized to intestinal mass has already been measured in vitro on isolated intestines at 37°C in a fat-storing species (Carey and Sills, 1996). Since mucosal mass, and thus mucosal surface area, decreases during hibernation (Carey, 1990, this study), it is likely that the underlying mechanisms involve active transport rather than passive diffusion. Indeed, a previous study shows the maintenance of the protein level of $\text{Na}^+/\text{glucose}$ cotransporter 1 (SGLT1) in the intestine of a fat-storing species during hibernation (Carey and Martin, 1996). However, the level of facilitative hexose transporters (GLUT family) during hibernation remains unexplored.

While NEFA uptake remains unchanged during interbout euthermia, the glucose uptake increases. This is possibly a means to restore the carbohydrate reserves used as energy substrate during torpor and also re-warm individuals in food-storing species (Mokrasch et al., 1960; Musacchia and Jansky, 1981). Indeed, we observed that a decrease occurred in glycaemia during torpor in the golden hamster, while plasma NEFA levels remained constant. We therefore hypothesised that reaching a low glycaemia threshold during torpor could be an endogenous signal for this food-storing species to arise and refeed (Weitten et al., 2013). The restoring of glycaemia and glucose stores may thus be crucial at arousal, and is facilitated by the absorption capacities of the small intestine.

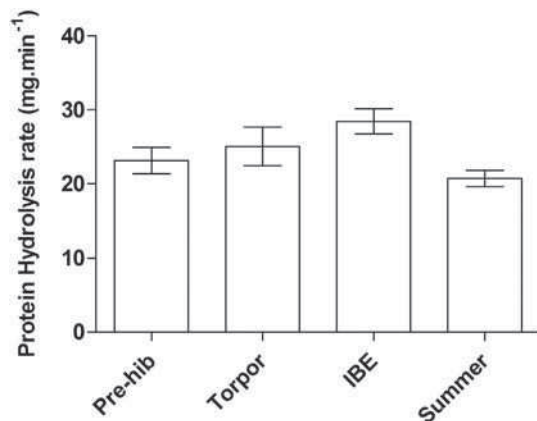


Fig. 5. Protein hydrolysis rate ($\text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$) of European hamsters during the pre-hibernation season (Pre-hib, $n = 5$), torpor (Torpor, $n = 5$), interbout euthermia (IBE, $n = 5$) and summer time (Summer, $n = 5$). Different letters show significant differences ($p < 0.05$). Results are represented as mean values $\pm$ SEM.

4.3. Protein hydrolysis

The intestinal protein hydrolysis rate remained unchanged throughout the annual lifecycle of European hamsters, which is consistent with the maintenance of aminopeptidase activity observed in the same species during hibernation (Galluser et al., 1988). Since body proteins seem to be efficiently spared during hibernation (Galster and Morrison, 1976), an increase in amino acid absorption would not necessarily be required during interbout euthermia.

4.4. Morphological adaptations

It is generally assumed that fat-storing hibernators display a decrease in the mass of digestive organs during hibernation (Hume et al., 2002), as observed in non-hibernating animals experiencing long-term fasting (Altmann, 1972). In the current study, we also observed a decrease in the intestinal mucosal mass of a food-storing hibernator during hibernation (torpor) compared to the summer period. Decreased intestinal mucosal mass can be explained by a decrease in intestinal villi length, as observed in thirteen-lined ground squirrels during hibernation (Carey, 1990), or by a shortening of enterocyte microvilli, as shown in golden hamsters submitted to a 48-hour fast (Misch et al., 1980). However, in the first case, the size of enterocyte microvilli is maintained (Carey and Sills, 1996), whereas in the second case, intestinal villi length is preserved (Weitten et al., 2013). This finally leads to enhanced area-specific absorption during interbout euthermia that may represent a compensatory response to the pronounced mucosal atrophy occurring during hibernation (Carey, 1990; Carey and Sills, 1996). The paracellular absorption of molecules such as glucose that generally occurs in fasting animals (Boza et al., 1999) could also explain the higher intestinal glucose uptake rate in European hamsters during interbout euthermia. However, an increase in the number of tight junctions and phosphorylation of occludin during hibernation does not support this hypothesis (Carey et al., 2012).

One can therefore assume that, despite the temporary or total interruption of food intake during hibernation, some species display intestinal morphological adaptations that may ensure food absorption, either during short interbout euthermia for food-storing species or at final emergence from hibernation for fat-storing species.

4.5. Other mechanisms

Intestinal flora plays an important role in nutrient assimilation through the fermentation of undigested carbohydrates and the subsequent absorption of NEFA (Holzapfel et al., 1998). Variations in the abundance of microbial populations of the gut in a fat-storing species during hibernation (e.g. increase in Bacteroidetes, decrease in Firmicutes) have been attributed to the lack of nutrients in the intestinal lumen over several months (Carey et al., 2013). To the best of our knowledge, no study has been conducted to date on the evolution of gut microflora in a food-storing hibernator. One can hypothesise that variations in body temperature and alternate fasting/refeeding could also affect microbial gut populations in these species, but to a lesser extent than in fat-storing species. This is an important point to investigate, since changes in gut microflora could play a major role in improving carbohydrate digestion during hibernation.

4.6. Conclusion

This study provides new insights into the specific adaptations of food-storing species during hibernation. Based on the study of intestinal absorption, we observed that nutrient assimilation capacities are maintained in the European hamster throughout the hibernation cycle. This could ensure an optimal food assimilation during the short interbout refeeding phases in order to cover immediate energy requirements and restore glycaemia and energy stores, in particular glucose. To the

best of our knowledge, this is the first in vivo demonstration of the maintenance of intestinal macronutrient digestion and absorption during hibernation. Further studies should be conducted on amino acid uptake during hibernation, as well as on the mechanisms involved in glucose and NEFA transport across the enterocyte brush border membrane to decipher the underlying mechanisms.

Acknowledgements

We are grateful to Aurélie Hranitzky for the animal care and to BTS students Siham El Barbari, Valentin Meyer and Camille Pascal for the biochemical measurements. This article benefitted greatly from the critical comments of two anonymous reviewers.

References

- Aloia, R.C., 1980. The role of membrane fatty acids in mammalian hibernation. *Fed. Proc.* 39, 2974–2979.
- Altmann, G.G., 1972. Influence of starvation and refeeding on mucosal size and epithelial renewal in the rat small intestine. *Am. J. Anat.* 133, 391–400. <http://dx.doi.org/10.1002/aja.1001330403>.
- Arnold, W., Giroud, S., Valencak, T.G., Ruf, T., 2015. Ecophysiology of omega fatty acids: a lid for every jar. *Physiology* 30, 232–240. <http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00047.2014>.
- Azzam, N.A., Hallenbeck, J.M., Kachar, B., 2000. Membrane changes during hibernation. *Nature* 407, 317–318. <http://dx.doi.org/10.1038/35030294>.
- Baker, J.A., van Breukelen, F., 2009. Bile constituents in hibernating golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Comp. Hepatol.* 8, 2. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-5926-8-2>.
- Balslev-Clausen, A., McCarthy, J.M., Carey, H.V., 2003. Hibernation reduces pancreatic amylase levels in ground squirrels. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 134, 573–578. [http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00363-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00363-X).
- Bauman, W.A., Meryn, S., Florant, G.L., 1987. Pancreatic hormones in the nonhibernating and hibernating golden mantled ground squirrel. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 86, 241–244.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57, 289–300.
- Bonen, A., Chabowski, A., Luiken, J.J.F.P., Glatz, J.F.C., 2007. Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. *Physiology (Bethesda)* 22, 15–29.
- Boza, J.J., Mönnö, D., Vuichoud, J., et al., 1999. Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J. Nutr.* 129, 1340–1346.
- Carey, H.V., 1989. Seasonal variation in intestinal transport in ground squirrels. In: Malan, A., Canguilhem, B. (Eds.), *Living in the Cold II*, pp. 225–233.
- Carey, H.V., 1990. Seasonal changes in mucosal structure and function in ground squirrel intestine. *Am. J. Physiol.* 259, R385–R392.
- Carey, H.V., 2001. Changes in gut function during hibernation: implications for bowel transplantation and surgery. *Gut* 49, 459–461. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.49.4.459>.
- Carey, H.V., Martin, S.L., 1996. Preservation of intestinal gene expression during hibernation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 271, G805–G813.
- Carey, H.V., Sills, N.S., 1992. Maintenance of intestinal nutrient transport during hibernation. *Am. J. Physiol.* 263, R517–R523.
- Carey, H.V., Sills, N.S., 1996. Hibernation enhances D-glucose uptake by intestinal brush border membrane vesicles in ground squirrels. *J. Comp. Physiol. B* 166, 254–261.
- Carey, H.V., Pike, A.C., Weber, C.R., et al., 2012. Impact of hibernation on gut microbiota and intestinal barrier function in ground squirrels. In: Ruf, T., Biebrer, C., Arnold, W., Millesi, E. (Eds.), *Living in a Seasonal World*. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 281–291.
- Carey, H.V., Walters, W.A., Knight, R., 2013. Seasonal restructuring of the ground squirrel gut microbiota over the annual hibernation cycle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304, R33–R42. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00387.2012>.
- Eckert, R., Randall, D., Burggren, W., French, K., 1978. *Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*, Edens.
- Fleck, C.C., Carey, H.V., 2005. Modulation of apoptotic pathways in intestinal mucosa during hibernation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R586–R595. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00100.2005>.
- Galluser, M., Raul, F., Canguilhem, B., 1988. Adaptation of intestinal enzymes to seasonal and dietary changes in a hibernator: the European hamster (*Cricetus cricetus*). *J. Comp. Physiol. B* 158, 143–149. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01075827>.
- Galster, W., Morrison, P., 1976. Seasonal changes in body composition of the arctic ground squirrel, *Citellus undulatus*. *Can. J. Zool.* 54, 74–78. <http://dx.doi.org/10.1139/z76-008>.
- Geiser, F., 2004. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu. Rev. Nutr.* 66, 239–274. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.115105>.
- Heimann, M., Käsermann, H.P., Pfister, R., et al., 2009. Blood collection from the sublingual vein in mice and hamsters: a suitable alternative to retrobulbar technique that provides large volumes and minimizes tissue damage. *Lab. Anim.* 43, 255–260. <http://dx.doi.org/10.1258/la.2008.007073>.

- Heldmaier, G., Ortmann, S., Elvert, R., 2004. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 141, 317–329. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2004.03.014>.
- Hirsch, A.J., Cheeseman, C.I., 1998. Cholecystokinin decreases intestinal hexose absorption by a parallel reduction in SGLT1 abundance in the brush-border membrane. *J. Biol. Chem.* 273, 14545–14549. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.23.14545>.
- Holzapfel, W.H., Holzapfel, W.H., Haberer, P., et al., 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 85–101.
- Hume, D., Beiglböck, C., Ruf, T., et al., 2002. Seasonal changes in morphology and function of the gastrointestinal tract of free-living alpine marmots (*Marmota marmota*). *J. Comp. Physiol. B.* 172, 197–207. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-001-0240-1>.
- Humphries, M.M., Thomas, D.W., Kramer, D.L., 2001. Torpor and digestion in food-storing hibernators. *Physiol. Biochem. Zool.* 74, 283–292. <http://dx.doi.org/10.1086/319659>.
- Humphries, M.M., Thomas, D.W., Kramer, D.L., 2003. The role of energy availability in mammalian hibernation: a cost–benefit approach. *Physiol. Biochem. Zool.* 76, 165–179. <http://dx.doi.org/10.1086/367950>.
- Kellett, G.L., 2001. The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J. Physiol.* 531, 585–595. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0585h.x>.
- Kellett, G.L., Helliwell, P.A., 2000. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem. J.* 350, 155–162.
- Lee, A.G., 2004. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 62–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.05.012>.
- Macrae, J.C., Lobley, G.E., 1986. Interactions between energy and protein. In: Milligan, L.P., Grovum, W.L., Dobson, A. (Eds.), *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 367–385.
- Misch, D.W., Giebel, P.E., Faust, R.G., 1980. Intestinal microvilli: responses to feeding and fasting. *Eur. J. Cell Biol.* 21, 269–279.
- Mokrasch, L.C., Grady, H.J., Grisolia, S., 1960. Thermogenic and adaptive mechanisms in hibernation and arousal from hibernation. *Am. J. Physiol.* 199, 945–949.
- Monecke, S., Wollnik, F., Pévet, P., 2015. The circannual clock in the european hamster: how is it synchronized by photoperiodic changes? Annual, Lunar, and Tidal Clocks.
- Munck, L.K., Grondahl, M.L., Thorboll, J.E., et al., 2000. Transport of neutral, cationic and anionic amino acids by systems B, b(o,+), X(AG), and ASC in swine small intestine. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 126, 527–537.
- Musacchia, X.J., Jansky, L., 1981. *Survival in the Cold: Hibernation and Other Adaptations*. Elsevier/North Holland.
- Nagy, I., Pap, Á., Varró, V., 1989. Time-course of changes in pancreatic size and enzyme composition in rats during starvation. *Int. J. Pancreatol.* 5, 35–45. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02925696>.
- Squire, T.L., Andrews, M.T., 2003. Pancreatic triacylglycerol lipase in a hibernating mammal. I. Novel genomic organization. *Physiol. Genomics* 16, 119–130. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00167.2002>.
- Stahl, A., Hirsch, D.J., Gimeno, R.E., et al., 1999. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol. Cell* 4, 299–308.
- Stahl, A., Gimeno, R.E., Tartaglia, L.A., Lodish, H.F., 2001. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol. Metab.* 12, 266–273.
- Verrey, F., Meier, C., Rossier, G., Kühn, L.C., 2000. Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflügers Arch.* 440, 503–512.
- Weitten, M., Robin, J.-P., Oudart, H., et al., 2013. Hormonal changes and energy substrate availability during the hibernation cycle of Syrian hamsters. *Horm. Behav.* 64, 611–617.
- Young, V.R., Munro, H.N., Matthews, D.E., Bier, D.M., 1983. Relationship of energy metabolism to protein turnover. In: Kleinberger, G., Deutsch, E. (Eds.), *New Aspects of Clinical Nutrition*. Karger, Basel, pp. 43–73.

Etude 3: Diet influence on the life cycle of a food-storing hibernator: the European hamster.

La composition en macronutriments du régime alimentaire influence l'hibernation et la reproduction du hamster d'Europe

Introduction

L'économie d'énergie réalisée par les hibernants est fonction de la durée et de la profondeur des torpeurs qui sont elles-mêmes sous le contrôle de plusieurs facteurs internes et externes parmi lesquels la composition du régime alimentaire. Or, la qualité de l'hibernation est déterminante d'un point de vue évolutif puisque des torpeurs longues et profondes permettent une meilleure condition corporelle à l'émergence et un meilleur succès reproducteur. Nous avons donc testé l'effet des protéines et des lipides alimentaires sur la totalité du cycle annuel du hamster d'Europe en nous intéressant à l'effet de chaque phase du cycle sur la suivante.

Matériels & Méthodes

Nous avons testé l'effet de deux régimes isocaloriques et isoglucidiques variant dans leur composition en lipides et en protéines sur le déroulement de l'hibernation, par des mesures de la température et de la condition corporelles des animaux. Nous avons également déterminé les relations entre régime alimentaire, condition corporelle à l'émergence d'hibernation et succès reproducteur (nombre de portées, nombre de petits par portée, masse des mères au sevrage, croissance des jeunes). Enfin, nous avons suivi la croissance des jeunes pendant la lactation puis après sevrage en leur donnant le même régime alimentaire que leurs parents.

Résultats & Discussion

Cette étude montre tout d'abord une différence dans la constitution de réserves corporelles en période pré-hibernatoire en fonction de la composition du régime en macro nutriments. En effet, les animaux exposés à un régime pauvre en protéines (10% de la masse sèche) et enrichi en lipides (10%) (groupe R2) ont une masse corporelle significativement plus importante en début d'hibernation que les animaux recevant un régime plus riche en protéines (20%) et pauvre en lipides (5%) (groupe R1). Cette augmentation de masse des animaux R2 n'est pas liée à une différence d'adiposité mais à une différence de la masse maigre. Les animaux R2 présentent une perte de masse plus importante au cours de l'hibernation, due à une épargne énergétique moindre. En effet, ils passent moins de temps en torpeur que les animaux R1. Cela pourrait être lié à une moindre nécessité d'économie d'énergie chez les animaux R2, du fait de leur masse corporelle plus importante avant l'hibernation ou de la composition de leur régime qui leur impose des réveils plus fréquents. Cependant, à l'émergence d'hibernation, tous les animaux R1 et R2 débutent la saison de reproduction avec la même condition corporelle et ce, quelle que soit leur condition corporelle pré-hibernatoire.

Malgré une masse et une composition corporelle similaires au groupe R1, les parents du groupe R2 ont significativement moins de portées (15 au sevrage contre 23 pour le groupe R1) et moins de jeunes par portée (3,4 contre 6,3 pour le groupe R1). Ce résultat pourrait s'expliquer par une carence en protéines du régime R2 entraînant un retard de la maturité sexuelle et/ou un plus fort taux de cannibalisme chez les femelles de ce groupe. Enfin, la croissance des jeunes est significativement impactée par les régimes, puisque les jeunes du groupe R2 présentent une vitesse de croissance significativement plus faible que les jeunes du groupe R1, aussi bien pour les mâles que pour les femelles (en moyenne 5,4g/jour pour R1 contre 2,4g/jour pour R2 de 7 à 28 jours après la naissance). En dépit du

fait que cette différence de vitesse de croissance s'estompe après le sevrage, les jeunes du groupe R2 restent significativement plus petits que ceux du groupe R1. Cette différence de croissance observée avant sevrage pourrait s'expliquer par l'altération de la composition du lait des femelles R2, qui serait carencé en protéines et ralentirait ainsi la croissance des jeunes.

Conclusion

Nous avons pu mettre en évidence qu'un régime pauvre en protéines et enrichi en lipides induit une stratégie d'hibernation différente, caractérisée par une diminution du temps total passé en torpeur, consécutivement à une stratégie d'accumulation d'énergie différente avant l'hibernation. Malgré une condition corporelle à l'émergence similaire dans les deux groupes, les parents nourris avec un régime pauvre en protéines et enrichi en lipides présentent un moins bon succès reproducteur. La qualité de ce régime semble impacter la reproduction de manière directe, mais aussi indirectement, par des effets sur l'hibernation. En effet, les animaux R2 ont perdu plus de masse corporelle pendant l'hibernation, ce qui peut engendrer des conséquences physiologiques multiples : augmentation du stress oxydant, variations hormonales, etc impactant la reproduction (retard de maturité sexuelle par exemple).

Diet influence on the annual cycle of a food-storing hibernator, the European hamster

Mathieu Weitten^{1✉}, Jean-Patrice Robin, Caroline Habold^{1✉}

¹Université de Strasbourg, IPHC, 23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

¹CNRS, UMR 7178, 67037 Strasbourg, France

✉ Corresponding author: mathieu.weitten@iphc.cnrs.fr, caroline.habold@iphc.cnrs.fr

Keywords:

Abbreviations: Body temperature: Tb, Fat Free Mass: FFM, Fat Mass: FM, Linear Mix Model: LMM, Polyunsaturated fatty acids: PUFA, Total Body Water: TBW, Unsaturated fatty acids: UFA, Saturated Fatty Acids: SFA

Abstract

Reproductive success in hibernating species depends on food quality during reproduction, but also on body condition at emergence which greatly depends on the quality of food/fat reserves made prior to hibernation. While it is generally accepted that lipids are determinant in the pre-hibernation phase to ensure good hibernation quality, gestation and lactation require protein supplementations. However, the role of macronutrients on the whole annual lifecycle of hibernating species, taking into account the strong interdependency between the different phases of that cycle, has not yet been fully investigated. In that aim, we tested the effects of two diets varying in their composition in lipids and proteins, on pre-hibernation body condition, hibernation quality and following reproduction of European hamsters. Animals fed a low-protein / high-fat diet (R2 diet: 10 / 10% of dry diet mass) gained more body mass in the pre-hibernation period than animals receiving a higher protein / lower fat diet (R1 diet: 20 / 5%, respectively). This allowed R2 animals to spend significantly less time in torpor. Also, they displayed significantly more, but shorter euthermic bouts than R1 animals. Consequently, they showed less successful matings and produced less and smaller pups, that grew less rapidly. This study therefore shows that the macronutrient content of the diet affects the different phases of the annual lifecycle of hamsters, each of them conditioning the next one. Thus, a low-protein / high-fat diet induces a less energy sparing hibernation behaviour due to a better pre-hibernation body condition and finally negatively impacts reproductive success.

Introduction

To face seasonal constraints such as limitations in food or water availability and drop in ambient temperature, some mammals species display specific adaptive strategies of which hibernation (Heldmaier et al. 2004). Hibernation is a succession of bouts of multiday torpor interspersed with periods of euthermia. During torpor, hibernating mammals reduce their metabolism and body temperature (T_b) and many physiological functions cease (Heldmaier et al. 2004; Ruf and Geiser 2014). To prepare the hibernation period and thus overcoming the harsh winter conditions, animals have to store energy reserves. Food-storing species hoard that food in a burrow, whereas fat-storing species consume it directly to constitute large body fat reserves (Humphries et al. 2003).

For a hibernator, each phase of the annual cycle is dependent of the previous one. Therefore, a poor stockpiling prior to hibernation might induce extended use of torpor to ensure energy sparing, delayed emergence from hibernation and worst body condition. This might cause a late reproduction season with less mating opportunities for males and less litters for females. These animals and their pups have then less time to hoard food for the next hibernation and a new vicious cycle begins.

Therefore, hibernators are very sensitive to the quality of food they collect during the pre-hibernation period (Geiser 1990; Florant et al. 1993; Geiser et al. 1994). Dietary lipids are crucial to ensure rapid constitution of high-energy reserves in fat-storing species, and also allow overwinter survival and maintenance of body condition in food hoarders (Dark 2005). It has also been pointed out that the unsaturation degree of alimentary fatty acids is a key factor of hibernation quality in fat-storing species. Because of their low melting point, polyunsaturated fatty acids (PUFA) ensure the maintenance of cell membrane function at low body temperature (Aloia and Raison 1989; Ruf and Arnold 2008). PUFA are also precursors of prostaglandins that are involved in thermoregulatory pathways in hibernating species (Florant 1998). They

allow reducing the lower setpoint of body temperature and the minimum metabolic rate through improvement of torpor bouts duration and depth (Florant et al. 1993; Munro and Thomas 2004). However, since they are more prone to peroxidation, an excess in PUFA in hibernators' diet has detrimental effect, i.e. increasing the lower setpoint for body temperature and shortening torpor bout length and depth (Frank and Storey 1995) (Frank et al. 2008). Based on these results, it seems that an optimum rather than a maximum quantity of PUFA is beneficial for hibernation (Frank and Storey 1995; Frank et al. 1998). Furthermore, the type of PUFA is crucial, because a linolenic acid (n-3) enriched diet prevents hibernation behaviour (Hill and Florant, 2000), whereas a linoleic acid (n-6) enriched diet improves torpor bouts length and depth (Giroud et al. 2013). Food-storing hibernators seem to be less affected by the unsaturation degree of fatty acids in the diet, as observed in the Turkish hamster (*Mesocricetus brandti*) (Bartness et al. 1991). This could be due to their shorter torpor bout lengths compared to fat-storing species, leading to less lipid peroxidation.

Impact of macronutrient food composition on reproduction and pups' growth has been demonstrated in a wide range of species including hibernators. Because of their high energy supply efficiency, lipids are required to cover the elevated energy demands for foraging and mating, gestation and lactation (Speakman 2008). Also, they have been shown to accelerate sexual maturation at emergence from hibernation, as for example in juvenile golden-mantled ground squirrels in which a high-fat diet (36.0%) induces higher testes masses and plasma testosterone concentrations after hibernation in that species (Dark et al. 1992). PUFA in particular would increase testosterone blood rate (Strauss et al. 2007).

Lactation represents a peak energy demand in the annual cycle of a female (Speakman 2008) and particularly in small mammals living in highly seasonal environments (Kenagy et al. 1989). Furthermore, milk composition varies during the lactation period. In chipmunks, milk energy value doubles between the beginning and the end of lactation, being progressively richer in

lipids until lipids represent 80% of the total energy value of the milk (Veloso et al. 2003). Protein content also increases to reach 10% of dried milk mass (Veloso et al. 2003). In small rodents, since body reserves are insufficient to cover such high energy expenses, the quantity and quality of food intake is also crucial during that period (Kenagy et al. 1989; Veloso et al. 2003).

Given the crucial role of nutrition on hibernators' lifecycle, we investigated the effects of macronutrient diet composition on the whole annual cycle of European hamsters (*Cricetus cricetus*). In that aim, hamsters were fed with diets composed of different amounts in protein and fat but with similar energy and carbohydrate content during one and a half year beginning by a pre-hibernation stockpiling phase. We make the hypothesis that the different diets tested will induce different hibernation behaviours, consequently impacting reproduction through variation in litter size and pups' growth.

107 Material & Methods

108 *Animals & diets*

109 A total amount of 83 European hamsters (64 females and 19 males) that were one year old at
110 the start of the experiment were used. Animals were housed individually (excepted during
111 reproduction where they were housed by pairs during two weeks) under photoperiodic and
112 thermal conditions mimicking an annual cycle (Table 1).

113 Two experiments were conducted in parallel, the first study the influence of diet on hibernation
114 and the second the influence of diet on reproduction.

115 Animals had free access to food and water throughout the experiments. They were divided into
116 2 groups that were fed with the different diets (Safe, Augy, France; see Tab.2 for macronutrient
117 composition). Pellets in both diets had the same shape, size and harshness. The animals were
118 feed with these diets from June 2013 (start of the experiment) to January 2014 for hibernation
119 study and to August 2014 for reproduction study (end of follow of pups' growth).

120 The amount of lipids was two times higher in the R1 diet than in the R2 one and protein content
121 was adjusted accordingly, while carbohydrate content was similar between diets. The ratio
122 saturated/unsaturated fatty acids varied between R1 and R2 (respectively 0.27 and 0.45), but
123 this should not affect the experiment since a ratio of more than 1.5 is required to induce
124 significant effects (Geiser and Kenagy 1993). The proportion of PUFA was similar in both diet:
125 79% for R1 and 69% for R2.

126 The experimental protocol followed the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments and
127 the care and use of laboratory animals, and was approved by an Ethical Committee under the
128 agreement number 00624.01.

Experimental procedures

Diet and hibernation quality

Thirty four female were used for this first study (average weight $286,9 \pm 6.3$ g). The animals were randomly assigned to one of the two groups (average mass for each group at start of experiment was similar) and fed either with the R1 or the R2 diet. Their food consumption was measured weekly. Seven animals per diet were euthanized prior to hibernation in September 2013 (pre-hibernation group (n=7)) and the ten animals left per diet were euthanized after hibernation ended in January 2014 (post-hibernation group (n=10)). Mean body mass was similar in groups under the same diet during all the pre-hibernation period.

Hibernation pattern assessment:

Hamsters (n=20) from the post-hibernation group were implanted intraperitoneally in June 2013 with a temperature sensor (iButton®, DS1922L model, Maxim Integrated Products, Sunnyvale, CA, USA, weighing 3.2 ± 0.1 g after paraffin ELVAX® inclusion) to monitor individual changes in body temperature (giving an hibernation pattern for each individual). Animals were considered to be in hypothermia when their body temperature dropped below 32°C.

Body composition assessment:

After euthanasia by decapitation, the carcass was weighted (± 0.01 g), the digestive tract content was removed, the carcass weighed again, cut into small pieces before being freeze-dried to constant mass and grounded under liquid nitrogen to obtain a homogenous powder for analysis. Just before analyses were run the powder was lyophilised again during 48h to eliminate any traces of remaining water. Nitrogen content was determined in triplicate using 150-200mg aliquots and according to the Kjeldahl method. Protein content was calculated as nitrogen x 6.25 (Campbell and Leatherland 1980). Lipid content was determined in duplicate using 1g aliquots according to a procedure adapted from the Folch method (Folch et al. 1957) with a

chloroform/methanol (2/1, v/v) solution as extraction solvents. Ash content was determined gravimetrically in duplicate from 1-2g samples ignited in a muffle furnace at 400°C for 24h. Total Body Water (TBW) was calculated by subtracting total dry body mass from fresh body mass. Fat-Free Mass (FFM) was the sum of TBW, protein content and ash content.

Diet and reproduction quality

Thirty female and nineteen male European hamsters were used for this second study (average weight 224.9 ± 8.7 and 195.2 ± 8 respectively for male and female). The animals were assigned to each diet group taking care to not introduce brothers and sisters in the same group. Mean body mass was similar between groups at the start of the experiment. They were housed and hibernate in the same condition than in the first study. Six weeks after the end of hibernation, the males and females of each group were placed by mating pairs during 2 weeks with a plastic shelter to limit conflicts. At the end of the mating period, males were removed and the females' cages were checked every day to determine litter birth date. Pups were weaned at the age of 28 days and the mother were mate a second time with a different male after three days of rest. The number of successful matings was reported. If no birth had occurred two weeks after separation from the male, the female was mated with another male (gestation lasts 15-18 days in captivity (Fenyk-Melody 2012)). The all mating procedure took place between March 2014 and June 2014. Only the two first litters were mass and length monitored (see paragraph after). Pups receive the same diet than their mother.

Mass/length monitoring and blood sampling

Starting seven days after birth, pups were weighted and heighted every three days and their mother weighted until weaning. Weaned pups were then weighted and heighted every seven days, up to 105 days for mass and 35 days for length.

Statistical analysis

Data presented are mean values $\pm$ SEM. Non-parametric tests were used due to the lack of normality of the data. Statistical comparisons were performed using Mann-Whitney test to evaluate the impact of the diets on hibernation. Statistical comparisons were performed on the number of pups of the different litters and groups using Mann-Whitney test, to evaluate the impact of diets on reproduction. Statistical comparisons using Kruskal-Wallis test were performed on the growth rate between 7 days and 28 days and between 28 days and 105 days for each group and litter number, to evaluate the impact of diets on pups' growth. A post-hoc Dunn's test was performed when the Kruskal-Wallis test was significant. A Linear Mix Model (LMM) was performed for the study of pups' growth to evaluate what factor have the most influence. This test was conducted with group, sex, age, effective of the litter and 1st or 2nd litter of the mother as fixed factors, number of individuals as random factor and body mass of the mother before reproduction as a covariate. Survival of the pups from the age of 1 week to weaning was examined independently. No significant differences appeared (Mann-Whitney t-test $p=0.99$ for R1 and $p=0.63$ for R2). In fact, only pups' that survived until weaning (28days) were integrated in the model. The level of statistical significance was set at $p<0.05$. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, for Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test and IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, Armonk, NY: IBM Corp. for Linear Mix Model Analysis.

Results

Diet influence on body condition

Macronutrient composition of the diet had an impact on adult hamsters' body mass (Fig.1A). At the start of the experiment, average body mass was not significantly different between both groups (Dunn's posthoc $p>0.05$). In the pre-hibernation phase (16 weeks after the beginning of the experiment) however, the R2 (low protein / high lipid) group had a 20% higher body mass than the R1 (high protein / low lipid) group (Dunn's posthoc $p<0.05$). This difference can be explained by changes in fat-free mass that differed significantly between the 2 groups in September (Fig.1C) (Mann-Whitney t-test $p=0.002$) but not in the fat mass that was not affected by changes in the diet (Fig.1B) (Mann-Whitney t-test $p=0.46$). Changes in fat-free mass concerned body proteins and water (Mann-Whitney t-test: $p=0.007$, $p=0.002$ respectively) with a water/protein ratio of 2.76 for R1 and 2.84 for R2 (Mann-Whitney t-test: $p=0.11$). The ash compartment showed no significant difference between groups prior to hibernation (Mann-Whitney t-test $p=0.06$) (Fig.1.C). No significant differences appeared in each groups between June and September (Dunn's posthoc $p<0.05$) (Fig. 1.A).

After hibernation, mean body mass was similar in both groups (Dunn's posthoc $p>0.05$) (Fig. 1.A). Accordingly, body mass loss during hibernation was significantly different in both groups (Mann-Whitney test $p=0.0002$ for R1 and $p=0.0003$ for R2). Accordingly, animals in the R2 group displayed a more important mass loss ($35\pm1.4\%$ of their pre-hibernation mass) during hibernation than animals of the R1 group ($27\pm1.1\%$ of their pre-hibernation mass). The compartment which contributed the most to the mass loss during hibernation was the lipid compartment with a similar 66% decrease in the R1 and R2 groups (Fig.1.B). Furthermore, the R2 group presented a significant decrease in ash and protein between before and after hibernation (12% for ash with $p=0.037$ and 26% for protein with $p=0.001$ (Mann-Whitney test)) (Fig. 1.C). A significant decrease of water/protein ratio appeared in R2 group during hibernation

(Mann-Whitney t-test: $p=0.01$), from 2.84 before hibernation to 2.66 after hibernation. Protein, ash and water content after hibernation were similar in both groups (Mann-Whitney t-test respectively $p=0.15$, $p=0.96$ and $p=0.15$). The water/protein ratio was similar in both groups after hibernation (2.68 for R1 and 2.66 for R2, Mann-Whitney t-test: $p=0.82$)

Diet influence on food consumption

Daily food consumption varied between the 2 groups (Fig.2A). During the first month of the experiment (June), the daily food consumption was similar in R1 and R2 groups (Dunn's posthoc $p>0.05$). Thereafter, daily food consumption decreased significantly in the R1 group (~40%) from June ($8.1\pm0.24\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$) to September ($5.1\pm0.61\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$) (prior to hibernation) (Dunn's posthoc $p<0.05$), whereas it remained constant in R2 animals (Dunn's posthoc $p<0.05$) ($8.9\pm0.47\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$ in June and $7.7\pm0.61\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$). Protein ingestion was significantly higher in the R1 group in June and July compare to R2 group (1.5 fold more for R1 group) (Dunn's posthoc $p<0.05$) (Fig. 2C). Lipid ingestion was significantly higher in the R2 group in June and July compare to R1 group (2 fold more for R2 group) (Dunn's posthoc $p<0.05$) (Fig. 2D). In parallel ingestion of PUFA and saturated fatty acids (SFA) was significantly higher in the R2 group in June and July compare to R1 group (respectively 2 fold more and 3 fold more for R2 group) (Dunn's posthoc $p<0.05$) (Fig. 2E and 2F). Due to similar energetic density of the diets, mean daily energy intake was similar in both groups from June to August (Fig. 2B). Thus, a significant difference in daily food consumption appeared between R1 and R2 groups in September (respectively $5.1\pm0.61\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$ and $7.7\pm0.61\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$; Dunn's posthoc $p<0.05$) (Fig. 2A.). No significant differences in protein consumption appeared in August and September (Dunn's posthoc $p>0.05$) (Fig. 2C). Significant differences in lipid consumption was maintained in August and September (2.5 fold more for R2 group) (Dunn's posthoc $p<0.05$) (Fig. 2D). Consumption of PUFA and SFA was significantly different in August and September (Dunn's posthoc $p<0.05$) (Fig. 2E and 2F). Daily energy intake decreased significantly in the

R1 group in September (40% compared to July; Dunn's posthoc $p < 0.05$) whereas it stayed stable in the R2 group (Dunn's posthoc $p > 0.05$). So, a significant difference appeared in energy intake in September between groups (~35% less for R1 group) ($87.0 \pm 10.4 \text{ kcal.day}^{-1}$ for R1 and $138.1 \pm 10.9 \text{ kcal.day}^{-1}$ for R2; Dunn's posthoc $p < 0.05$) (Fig. 2.B).

Diet influence on hibernation

Temperature variation pattern revealed different hibernation behaviours between the 2 groups. As shown by Fig.3, the R1 group displayed a significantly higher number of torpor bouts during hibernation compared to the R2 group (respectively 26.6 ± 0.6 and 22.6 ± 1.2 , Mann-Whitney test $p = 0.013$) (Fig.3.A). The total time spent in torpor was significantly higher in the R1 than in the R2 group (respectively 2397 ± 37.4 hours and 2152 ± 65.4 hours, Mann-Whitney test $p = 0.015$) (Fig.3.B), but the mean duration of torpor bouts was similar in both groups (90.5 ± 0.04 hours for R1 and 96.24 ± 0.04 hours for R2, Mann-Whitney test $p = 0.21$) (Fig.3.C). No differences appeared in the minimal body temperature reached during torpor (data not shown, $7.34 \pm 0.04^\circ\text{C}$ for R1 and 7.38 ± 0.04 for R2, Mann-Whitney test $p = 0.53$). Finally, R2 animals expressed significantly more euthermic phases compared to R1 animals (respectively 15.4 ± 0.77 and 18.3 ± 0.45 , Mann-Whitney test $p = 0.01$) (Fig. 3D). However, the duration of these euthermic phases was longer in the R1 group than in the R2 group (respectively 29.4 ± 1.9 and 19.3 ± 1.1 , Mann-Whitney test $p = 0.004$) conducted to a total time spent in euthermia significantly longer for R2 compared to R1 (800.2 ± 65.4 hours for R1 and 554.9 ± 37.4 hours for R2; Mann-Whitney test $p = 0.015$) (Fig. 3E and 3F).

Diet influence on reproduction

The reproductive success differed between the 2 groups, firstly in the mating success (R1: 72%, R2: 41%) (Table 3). Secondly, the number of pups per litter at weaning varied significantly between the 2 groups (Mann-Whitney t-test $p < 0.001$). The R1 group had an average of 6.3 pups per litter whereas females of the R2 group had on average 3.4 pups per litter. Before weaning

(at 7 and 28 days) and between a females' successive litters, no significant differences appeared in the number of pups at 7 and 28 days in both groups (Mann-Whitney t-test $p=0.99$ for R1 and $p=0.52$ for R2). No significant differences appeared in the number of pups per litter between the first and the second reproduction in a same group at weaning (Mann-Whitney test $p=0.92$ for R1 and $p=0.79$ for R2) (Tab. 3.).

Diet influence on pups' growth rate

The pups' growth rate from 7 days of age until 105 days revealed differences between the 2 groups (Fig. 4, Table 4), both in males (Fig. 4.A.) and females (Fig. 4.B.). Pups from the R1 group grew more rapidly than pups from the R2 group. The difference became significant from the age of 22 days in females and 25 days in males of the 1st and the 2nd litter and remained significant until weaning (Dunn's posthoc $p<0.05$). After weaning however, pups of the R1 group showed a significant decrease in growth rate (Dunn's posthoc $p<0.05$) that was then similar to that of R2 pups (Dunn's posthoc $p>0.05$), excepting the males of the 2nd litter that then showed the highest growth rate (Dunn's posthoc $p<0.05$). Growth rate of pups from the R2 group stayed constant between 7 and 105 days (Dunn's posthoc $p>0.05$) (Tab. 4.).

R1 pups gained not only mass but were also bigger than R2 pups (Fig.4.C, D). The difference in body length became significant in males from the age of 28 days and in females from the age of 10 days.

Design of the LMM reveal that sex, age, diet, effective of the litter and body mass of the mother before reproduction appeared to have a significant effect on the model (respectively $F_{[1, 130.89]}=129.72$ and $p<0.005$, $F_{[16, 1823.77]}=1615.33$ and $p<0.005$, $F_{[1, 163.63]}=293.87$ and $p<0.005$, $F_{[7, 308.37]}=6.44$ and $p<0.005$ and $F_{[1, 157.42]}=6.60$ and $p=0.01$). If the pups belonged to the 1st or the 2nd litter did not impact the model (respectively $F_{[1, 152.96]}=0.017$ and $p=0.898$). A

294 Kolmogorov-Smirnov test on residue demonstrated the normality of the data ($Z=1.195$ and
295 $p=0.115$).

Discussion

Herein, we evaluated for the first time the role of proteins versus lipids on the hibernation quality and reproductive success of a hibernating species. Our main results show that a low protein diet induced less energy sparing during hibernation, reduced reproductive success and slower pups' growth rate compared to a control diet.

Many factors have been identified to influence the duration and depth of torpor bouts during hibernation. One of these factors is an optimum PUFA content of the diet before hibernation, which decreases the lower set point for body temperature, prolongs torpor bout duration and attenuates hibernation mass loss (reviewed by Ruf and Arnold 2008).

We observed that the time spent in torpor ($Bt < 32^{\circ}\text{C}$) during hibernation is inversely correlated with body mass prior to hibernation (data not shown, $\text{Rho} = -0.845$, $p < 0.001$). This is in accordance with previous studies in fat-storing species (Bieber et al., 2014). In the same manner, in food-storing species, animals with the biggest food reserves spend less time in torpor (Munro et al. 2005). These data suggest that since torpor is experienced to face food scarcity, enough energy reserves (internal and/or external) might render the strategy of torpor less useful.

Animals fed the low-protein/high-fat (R2) diet gained more body mass prior to hibernation than animals fed the high-protein / low-fat (R1) diet. Surprisingly, this difference in body mass is due to an increase in body proteins and total body water, and not in fat mass. These animals had a higher daily food intake during the pre-hibernation period, thus a higher energy intake, and they caught up the lack of proteins in the diet in August and September. However, they never ate more proteins than the R1 group and despite this, had more body proteins. This can be due to more efficient protein assimilation in the R2 group due to the fat amount of the diet that slows down intestinal transit or to muscular development due to increased physical activity. Proportion of lipids in the R2 diet induce higher daily lipids intake for the animals of the R2

group in summer as in pre-hibernation. This differences in the lipids ingest during pre-hibernation period could impact hibernation. Turkish hamster (*Mesocricetus brandti*) (a food-storing hibernator) expose to a high fat diet displayed a decrease of torpor use. Diet enriched in saturated or unsaturated fat inhibited hibernation to a similar degree in this species (Bartness et al. 1991). Enrichment in lipids in our diet could induce similar effect on hibernation on our model.

During hibernation, animals of the R2 group spent less time in torpor and consequently lost significantly more body mass than the R1 group. They lost mainly fat reserves, in a similar amount that hamsters from the R1 group, but also saw their body proteins and minerals decreasing significantly during hibernation, consistently with the lack of protein in their diet, and due to their more frequent arousals from torpor. At the emergence from hibernation however, animals from both groups had the same mean body mass and body composition and started the reproduction season with an equivalent body condition despite different hibernating behaviours.

R1 animals exposed to the diet with the higher protein rate displayed more torpor bouts and less inter-bout euthermia. Interestingly, even if their hibernation behaviour tended to energy sparing, their inter-bout euthermia lasted longer, probably to ensure functions requiring euthermia after long torpor bouts such as metabolic waste excretion, especially urea.

The diets tested in this study conducted to a differential energy accumulation before hibernation and a differential hibernation strategy. However, they started the reproduction season with the same body condition:-

Our study reveals a marked effect of macronutrient diet composition on reproduction. As body condition was similar in both group before reproduction, we can hypothesize that the diet impacted directly reproduction. Our animals had free access to food in both groups and the diets

had similar energy values and carbohydrate content. And even if R2 females ate more (as observed between September the year before), they ate less proteins in June and July. So, the observed effects could be due to a protein deficiency in the R2 group. Indeed, as demonstrated by Cameron and Eshelman (1996) in Cotton rats (*Sigmodon hispidus*), a low protein diet could retard sexual maturation by a reduced production of ovocytes. Despite the low amount of proteins in the R2 diet (13% versus 20% in the R1 diet), we did not observe any significant difference in the average date of first parturition between R1 and R2 females (data not show, Mann-Whitney t-test $p=0.17$). However, we observed a difference in the number of successful matings between groups, which could be explained by a delayed sexual maturity in at least a part of the R2 individuals. Studies of ovarian development and sexual hormone assays could bring more information about that point. We also measured a lower litter size in the R2 group. Since we measured litter size only when the pups were 7 days old to avoid any disturbance and stress for the mothers, the real number of born pups remains unknown. The difference in the size of litters observed between the R1 and R2 groups could either be explained by a production of smaller litters by R2 females, or by a higher rate of cannibalism by these females to catch up the deficiency in dietary proteins and cover the high protein needs for lactation. Previous works did not reveal any influence of protein restriction on the litter size in rats (Zambrano et al. 2006), but on pups' mortality rate due to maternal cannibalism (Ambrosen and Petersen 1997).

Macronutrient composition of the diet has also been shown to impact the sex ratio in mice. A high-saturated fat / low-carbohydrate diet leads to the birth of significantly more male than female mice whereas a high-carbohydrate diet leads to the birth of more females (Rosenfeld and Roberts 2004). In our study however, no noticeable differences appeared in the sex ratio of the R2 group compared to the R1 group (R1:71 males/72 females, R2:25 males/23 females), but these groups were fed with diets with similar carbohydrate content.

368 The diets can also have impacted reproduction in an indirect manner, i.e. through their effects
369 on hibernation, by increasing oxidative stress or altering hormonal status during hibernation.
370 The largest weight loss was probably due to a higher metabolic rate which could induce higher
371 oxidative stress during hibernation, and oxidative stress is known to impact reproduction (Rizzo
372 et al. 2012). Higher weight loss could impact secretion levels of adipokines, whose secretion is
373 related to the amount of adipose tissue, and which are involved in regulation of reproductive
374 function (Foster and Nagatani 1999; Dos Santos et al. 2012).

375 This part of our study was only investigated in females. It would be interesting to conduct the
376 same experiment on males, since the duration of hibernation in males directly impacts their
377 mating opportunities and thus reproductive success (Dark 2005).

378 Finally, we observed significant differences in the pups' growth and survival rates between the
379 2 groups. The R2 diet had a negative effect on the pups' growth rate that can be linked to the
380 composition of maternal milk. It is well known that a mother's diet influences maternal milk
381 composition (Del Prado et al. 1997; Neville and Picciano 1997): Female rats exposed to a low
382 protein diet (9% of dried diet mass) see their milk composition modified, with reduced protein
383 concentration and increased lipid concentration (Pine et al. 1994), inducing a smaller growth
384 rate in pups compared to an optimal protein diet as observed in mice (Chen et al. 2009). Diet
385 and especially protein intake also influences the quantity of milk produced as hypothesized by
386 Jensen (1995). Finally, at weaning, a low-protein diet (10% of dried diet mass) is known to alter
387 growth rate in juvenile rats and mice (Zambrano et al. 2006; Belluscio et al. 2014). Thus, the
388 lack of proteins in the R2 group could explain the lower growth rate in R2 pups' during suckling
389 and after weaning.

390 Our LMM aiming at explaining body mass evolution of pups is greatly influenced by the
391 membership of pups to R1 or R2 groups. The model is also logically affected by sex and age,

and to a lesser extent, by litter size and body mass of the mother before reproduction. Indeed, maternal body mass loss during lactation is positively correlated with litter size (Data not shown, Spearman $Rho = -0.787$, $p < 0.0001$), which is in accordance with previous studies showing that the energetic investment during lactation is higher for a female with more pups (Speakman 2008). Accordingly, R1 females, which suckled more pups, lost significantly more body mass during lactation than R2 females (11.5% loss already 7 days after parturition for R1 females *versus* 0.5% loss at the same time for R2 females, Mann-Whitney t-test: $p = 0.0008$). In other species [rats: (Chahoud and Paumgarten 2009), mice: (Epstein 1978), golden-mantled ground squirrels: (Phillips 1981)] pups' growth rate is inversely related to litter size. Contrariwise, growth rate of R1 pups was higher than that of R2 pups.

The survival rate of pups between the age of 7 and 105 days was also affected by the diet. We observed a 100% survival rate for the R1 group compared to 92% for the R2 group. It has been demonstrated that a maternal protein restriction in the rat also induces a decreased of pups' survival rate, a delayed sexual maturation and a premature ageing of reproductive function (Guzmán et al. 2006). A further study on several hamster generations could allow to confirm a similar reaction against a low protein diet in hamsters.

Long term consequences

Exposure to protein deficiency in maternal diet during prenatal life induces long term consequences such as malformations of the brain including distorted relations between neurons and glia, poor formation of neuronal circuits, resulting in modified patterns of brain organization (Morgane et al. 1993). Also, maternal protein restriction also accounts for a preference for high-fat diets in the adulthood in rats (Bellinger et al. 2004), and decreased levels of many insulin signalling proteins which may predispose these animals to insulin resistance (Chen et al. 2009). This demonstrates that a prenatal protein malnutrition can affect the entire life of an animal.

417 *Conclusion*

418 Based on the study of hibernation pattern, consecutive reproduction and pups' growth rate, we
419 demonstrate a strong impact of macronutrient diet composition and especially protein content
420 on the annual lifecycle of a hibernating species, the European hamster. To the best of our
421 knowledge, this is the first study demonstrating the crucial role of dietary proteins on
422 hibernation, as factor improving hibernation quality and reproductive success. This new result
423 opens the way to further research as to evaluate the impact of diet composition on sexual
424 maturation in juvenile hamster, which could impact the reproduction strategies of this species.
425 This species saw his living environment drastically changing during the 50 past years, with the
426 increase of plots' size, the development of mono-cropping and progressive disappearance of
427 soil micro-fauna. In that context, our data bring new knowledge for current conservation plans
428 for that species, aiming at improving its natural agricultural habitat in Europe and restoring
429 population levels.

430 Acknowledgements

431 We are grateful to Aurélie Hranitzky for animal care,

References

- Aloia RC, Raison JK (1989) Membrane function in mammalian hibernation. *Biochim Biophys Acta* 988:123–46.
- Ambrosen T, Petersen VE (1997) The influence of protein level in the diet on cannibalism and quality of plumage of layers. *Poult Sci* 76:559–563.
- Bartness T, Milner R, Geloan A, Trayhurn P (1991) Effects of high fat diets on hibernation and adipose tissue in Turkish hamsters. *J Comp Physiol B* 161:451–9. doi: 10.1007/BF00257899
- Bellinger L, Lilley C, Langley-Evans SC (2004) Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. *Br J Nutr* 92:513–520. doi: 10.1079/BJN20041224
- Belluscio LM, Berardino BG, Ferroni NM, et al (2014) Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. *Physiol Behav* 129:237–54. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.02.051
- Bieber C, Lebl K, Stalder G, et al (2014) Body mass dependent use of hibernation: why not prolong the active season, if they can? *Funct Ecol* 28:167–177. doi: 10.1111/1365-2435.12173
- Cameron GN, Eshelman BD (1996) Growth and Reproduction of Hispid Cotton Rats (*Sigmodon hispidus*) in Response to Naturally Occurring Levels of Dietary Protein. *J Mammal* 77:220–231. doi: 10.2307/1382723
- Campbell RR, Leatherland JF (1980) Estimating Body Protein and Fat from Water Content in Lesser Snow Geese. *J Wildl Manage* 44:438. doi: 10.2307/3807975
- Chahoud I, Paumgarten FJR (2009) Influence of litter size on the postnatal growth of rat pups: is there a rationale for litter-size standardization in toxicity studies? *Environ Res* 109:1021–7. doi: 10.1016/j.envres.2009.07.015
- Chen J-H, Martin-Gronert MS, Tarry-Adkins J, Ozanne SE (2009) Maternal protein restriction affects postnatal growth and the expression of key proteins involved in lifespan regulation in mice. *PLoS One* 4:e4950. doi: 10.1371/journal.pone.0004950
- Dark J (2005) Annual lipid cycles in hibernators: integration of physiology and behavior. *Annu Rev Nutr* 25:469–97. doi: 10.1146/annurev.nutr.25.050304.092514
- Dark J, Ruby NF, Wade GN, et al (1992) Accelerated reproductive development in juvenile male ground squirrels fed a high-fat diet. *Am J Physiol* 262:R644–R650.
- Del Prado M, Delgado G, Villalpando S (1997) Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. *J Nutr* 127:458–462.
- Dos Santos E, Pecquery R, de Mazancourt P, Dieudonné M-N (2012) Adiponectin and reproduction. *Vitam Horm* 90:187–209. doi: 10.1016/B978-0-12-398313-8.00008-7
- Epstein HT (1978) The effect of litter size on weight gain in mice. *J Nutr* 108:120–123.
- Fenyk-Melody J (2012) The European Hamster. In: Suckow MA, Stevens KA, Wilson RP (eds) *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Academic Press, pp 923–933

473 Florant GL (1998) Lipid Metabolism in Hibernators: The Importance of essential Fatty Acids.
474 Am Zool 38:331–340.

475 Florant GL, Hester L, Ameenuddin S, Rintoul DA (1993) The effect of a low essential fatty
476 acid diet on hibernation in marmots. Am J Physiol 264:R747–R753.

477 Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and
478 purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 226:497–509.

479 Foster DL, Nagatani S (1999) Physiological perspectives on leptin as a regulator of
480 reproduction: role in timing puberty. Biol Reprod 60:205–15.

481 Frank CL, Dierenfeld ES, Storey KB (1998) The Relationship Between Lipid Peroxidation,
482 Hibernation, and Food Selection in Mammals. Integr Comp Biol 38:341–349. doi:
483 10.1093/icb/38.2.341

484 Frank CL, Karpovich S, Barnes BM (2008) Dietary fatty acid composition and the hibernation
485 patterns in free-ranging arctic ground squirrels. Physiol Biochem Zool 81:486–495. doi:
486 10.1086/589107

487 Frank CL, Storey KB (1995) The optimal depot fat composition for hibernation by golden-
488 mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). J Comp Physiol B 164:536–42. doi:
489 10.1007/BF00261394

490 Geiser F (1990) Influence of polyunsaturated and saturated dietary lipids on adipose tissue,
491 brain and mitochondrial membrane fatty acid composition of a mammalian hibernator.
492 Biochim Biophys Acta 1046:159–166. doi: 10.1016/0005-2760(90)90183-X

493 Geiser F, Kenagy GJ (1993) Dietary fats and torpor patterns in hibernating ground squirrels.
494 Can J Zool 71:1182–1185. doi: 10.1139/z93-161

495 Geiser F, McAllan BM, Kenagy GJ (1994) The degree of dietary fatty acid unsaturation
496 affects torpor patterns and lipid composition of a hibernator. J Comp Physiol B 164:299–
497 305.

498 Giroud S, Frare C, Strijkstra A, et al (2013) Membrane Phospholipid Fatty Acid Composition
499 Regulates Cardiac SERCA Activity in a Hibernator, the Syrian Hamster (*Mesocricetus*
500 *auratus*). PLoS One 8:e63111. doi: 10.1371/journal.pone.0063111

501 Guzmán C, Cabrera R, Cárdenas M, et al (2006) Protein restriction during fetal and neonatal
502 development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing
503 in female progeny. J Physiol 572:97–108. doi: 10.1113/jphysiol.2005.103903

504 Heldmaier G, Ortmann S, Elvert R (2004) Natural hypometabolism during hibernation and
505 daily torpor in mammals. Respir Physiol Neurobiol 141:317–29. doi:
506 10.1016/j.resp.2004.03.014

507 Humphries MM, Thomas DW, Kramer DL (2003) The role of energy availability in
508 Mammalian hibernation: a cost-benefit approach. Physiol Biochem Zool 76:165–79. doi:
509 10.1086/367950

510 Jensen RG (1995) Handbook of Milk Composition. Academic Press

511 Kenagy GJ, Sharbaugh SM, Nagy KA (1989) Annual cycle of energy and time expenditure in
512 a golden-mantled ground squirrel population. Oecologia 78:269–282. doi:
513 10.1007/BF00377166

514 Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, et al (1993) Prenatal malnutrition and

development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 17:91–128. doi: 10.1016/S0149-7634(05)80234-9

Munro D, Thomas DW (2004) The role of polyunsaturated fatty acids in the expression of torpor by mammals: a review. *Zoology (Jena)* 107:29–48. doi: 10.1016/j.zool.2003.12.001

Munro D, Thomas DW, Humphries MM (2005) Torpor patterns of hibernating eastern chipmunks *Tamias striatus* vary in response to the size and fatty acid composition of food hoards. *J Anim Ecol* 74:692–700. doi: 10.1111/j.1365-2656.2005.00968.x

Neville MC, Picciano MF (1997) Regulation of milk lipid secretion and composition. *Annu Rev Nutr* 17:159–83. doi: 10.1146/annurev.nutr.17.1.159

Phillips JA (1981) Growth and its relationship to the initial annual cycle of the golden-mantled ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Can J Zool* 59:865–871. doi: 10.1139/z81-124

Pine a P, Jessop NS, Oldham JD (1994) Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. 3. The effects of dietary protein restriction and stage of lactation on milk composition. *Br J Nutr* 72:815–830. doi: 10.1079/BJN19940087

Rizzo A, Roscino MT, Binetti F, Sciorsci RL (2012) Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reprod Domest Anim* 47:344–52. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01891.x

Rosenfeld CS, Roberts RM (2004) Maternal diet and other factors affecting offspring sex ratio: a review. *Biol Reprod* 71:1063–70. doi: 10.1095/biolreprod.104.030890

Ruf T, Arnold W (2008) Effects of polyunsaturated fatty acids on hibernation and torpor: a review and hypothesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R1044–52. doi: 10.1152/ajpregu.00688.2007

Ruf T, Geiser F (2014) Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 90:891–926. doi: 10.1111/brv.12137

Speakman JR (2008) The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 363:375–398. doi: 10.1098/rstb.2007.2145

Strauss A, Hoffmann IE, Millesi E (2007) Effects of nutritional factors on juvenile development in male European ground squirrels (*Spermophilus citellus*). *Mamm Biol* 72:354–363. doi: 10.1016/j.mambio.2006.09.003

Veloso C, Place NJ, Kenagy GJ (2003) Milk composition of free-living yellow-pine chipmunks (*Tamias amoenus*): temporal variation during lactation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 134:387–92.

Zambrano E, Bautista CJ, Deás M, et al (2006) A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol* 571:221–30. doi: 10.1113/jphysiol.2005.100313

Groups Conditions	From January to July	From July to October	From October to January
Ambient temperature	20°C	20°C	8°C
Photoperiod	L/D:10h/14h	L/D:14h/10h	L/D:14h/10h

Table 1. Photoperiodic and thermal conditions along annual cycle in laboratory. Changes occurred each first Monday of the concerned month.

	R1	R2
Energy (kJ/kg)	14503	15483
Carbohydrates (% of fresh matter)	54.9 (63%)	57.0 (62%)
Lipids (% of fresh matter)	5.1 (13%)	10 (24%)
Proteins (% of fresh matter)	19.3 (23%)	12.8 (15%)

Table 2. Energy value and composition of the diets in percent of fresh mass.

Groups	Matings	Weaning litters			Pups per litter at weaning	Pups per litter (7 days)		Pups per litter (28days)	
		1st litter	2nd litter	Total		1st litter	2nd litter	1st litter	2nd litter
R1	32	11	12	23	6.3±0.3*	6.2±0.4*	6.3±0.6*	6.4±0.4*	6.3±0.6*
R1	37	7	8	15	3.2±0.6	4.3±0.3	3.3±1.4	3.5±0.6	2.8±1.4

Table 3. Numbers of matings, weaning litters, pups per litter at weaning (mean of 1st + 2nd litters), pups per litter at 7 days for 1st and 2nd reproduction and pups per litter at 28 days for 1st

and 2nd reproduction. Results are mean values $\pm$ SEM. Asterisks indicate significant differences between values from a same column.

g/day		Growth rate			
		7 days to 28 days		28 days to 105 days	
		1st litter	2nd litter	1st litter	2nd litter
R1	M	5.4 $\pm$ 0.1 ^a	5.9 $\pm$ 0.1 ^a	2.0 $\pm$ 0.2 ^{be}	1.8 $\pm$ 0.2 ^{bc}
	F	4.9 $\pm$ 0.1 ^a	5.1 $\pm$ 0.1 ^a	1.4 $\pm$ 0.1 ^{cd}	1.0 $\pm$ 0.1 ^d
R2	M	2.6 $\pm$ 0.2 ^{be}	2.4 $\pm$ 0.1 ^{be}	2.4 $\pm$ 0.2 ^{be}	2.8 $\pm$ 0.2 ^e
	F	2.2 $\pm$ 0.1 ^{be}	2.5 $\pm$ 0.2 ^{be}	1.8 $\pm$ 0.1 ^{bce}	1.9 $\pm$ 0.1 ^{bce}

Table 4. Growth rate of male (M) and female (F) pups in grams per day between 7 days and 28 days (weaning) and between 28 days and 105 days for the 1st and the 2nd reproduction. Mean values are represented $\pm$ SEM. Different letters show significant differences ($p < 0.05$).

Fig. 1. A: Mean body mass (g) for R1 and R2 groups during the pre-hibernation and hibernation phases. The hatched area depicts the hibernation phase, B: Mean fat mass (g) for R1 and R2 groups before and after hibernation, C: Mean fat-free mass (g) for R1 and R2 groups with the different compartments composing FFM before and after hibernation. Different letters shows significant differences ($p < 0.05$). Asterisks indicate significant differences. Results are represented as mean values $\pm$ SEM.

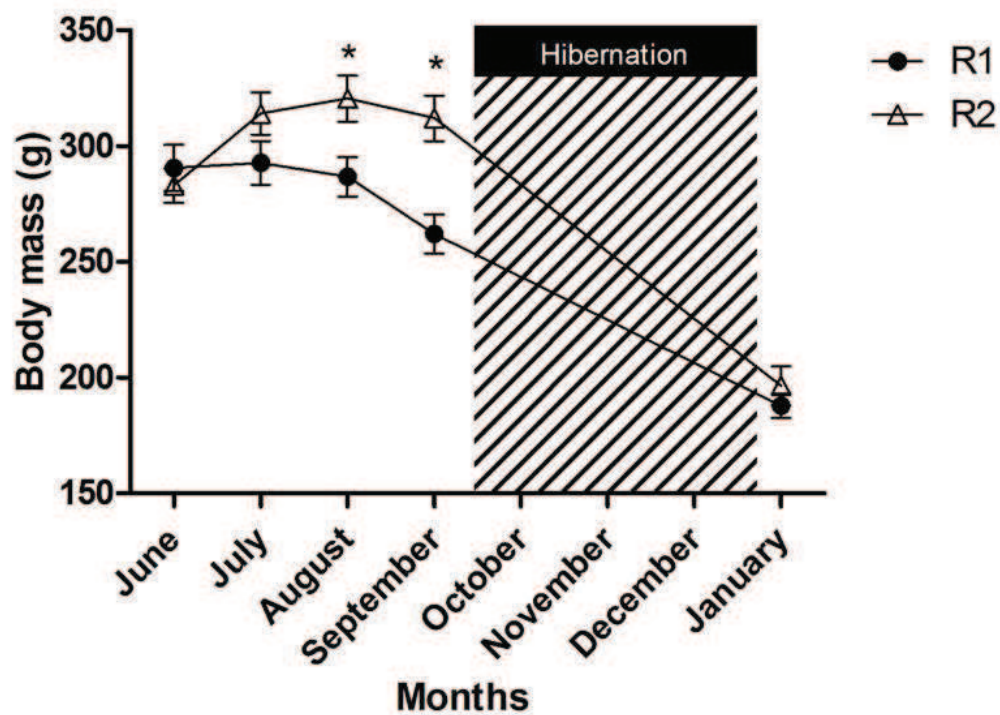
Fig. 2. A: Monthly average of daily food intake ($\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$) from June to September in R1 and R2 groups, B: Monthly average of daily energy intake ($\text{KJ}\cdot\text{day}^{-1}$) from June to September in R1 and R2 groups, C: Monthly average of daily protein intake ($\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$) from June to September, D: Monthly average of daily lipid intake ($\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$), E: Monthly average of daily PUFA intake ($\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$), F: Monthly average of daily SFA intake ($\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$). Asterisks indicate significant differences. Results are represented as mean values $\pm$ SEM.

Fig. 3. A: Mean number of torpor bouts during hibernation season in R1 and R2 groups, B: Total time (hours) spent in torpor during hibernation season in R1 and R2 groups, C: Mean duration of torpor bouts in R1 and R2 groups, D: Minimal body temperature ($^{\circ}\text{C}$) reached during torpor bouts, E: Mean number of eutherms during hibernation season in R1 and R2 groups, F: mean duration of eutermic phases in R1 and R2 groups. Asterisks indicate significant differences. Results are represented as mean values $\pm$ SEM.

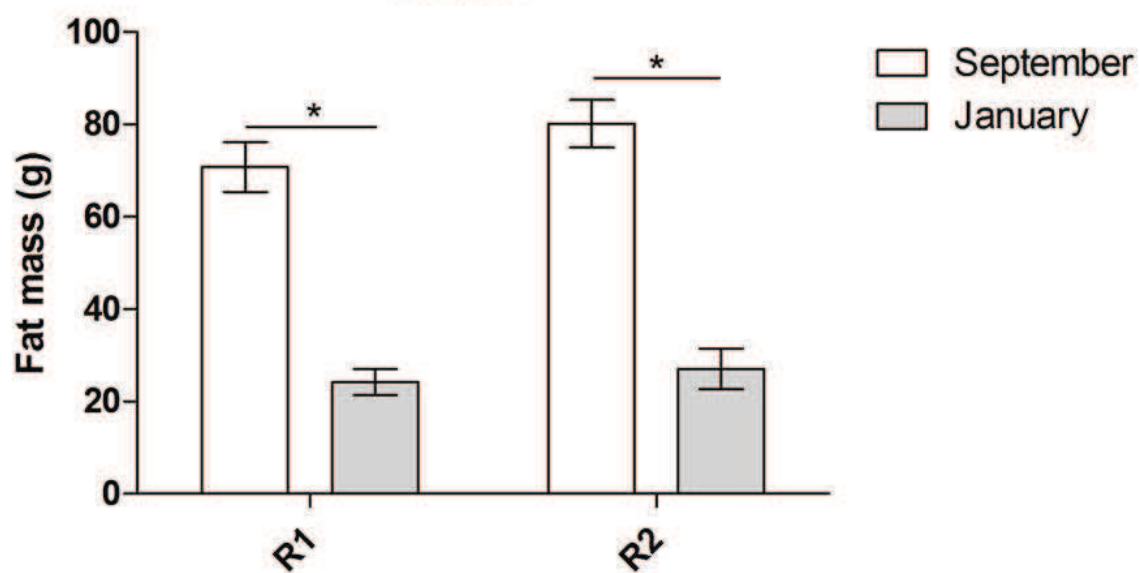
Fig. 4. A: Evolution of male pups' body mass and length, B: Evolutions of female pups' body mass and length. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) with the value in the same column. Results are represented as mean values $\pm$ SEM.

Figure 1

A



B



C

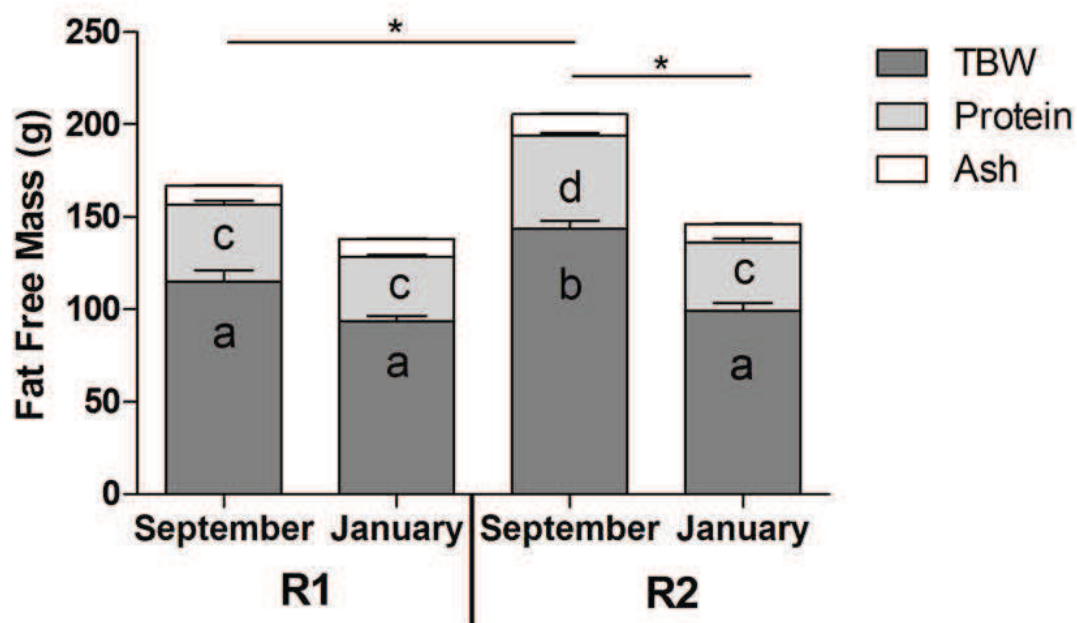


Figure 2

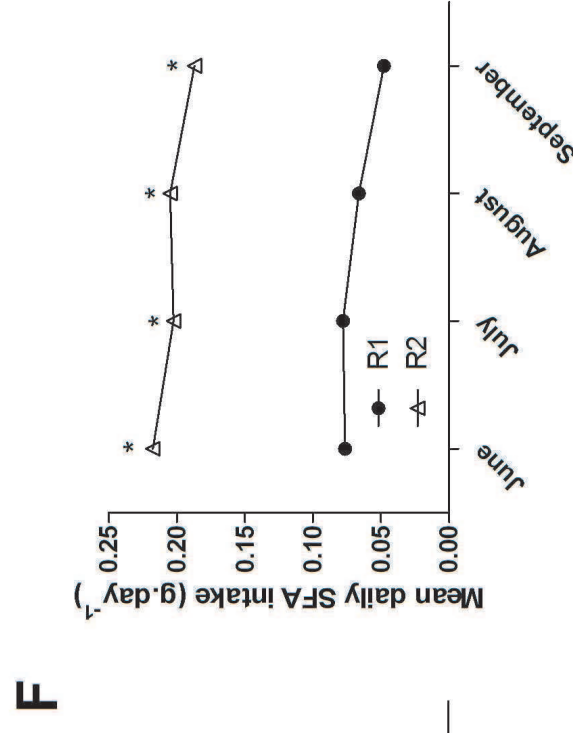
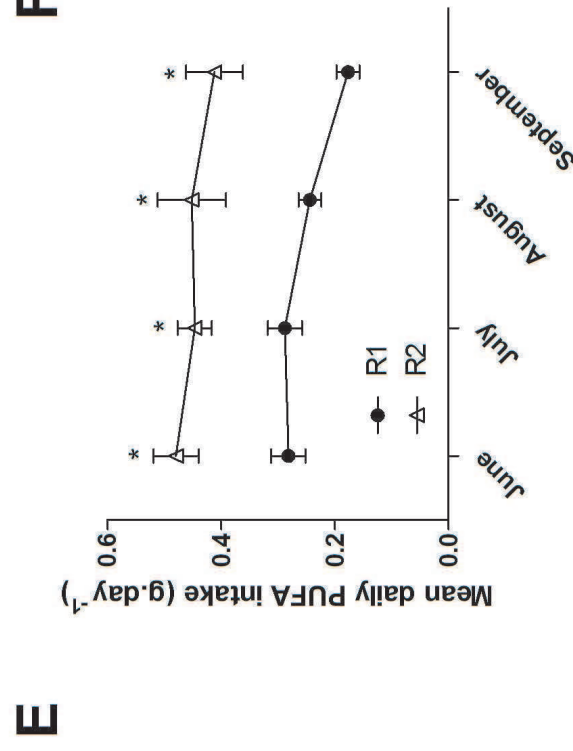
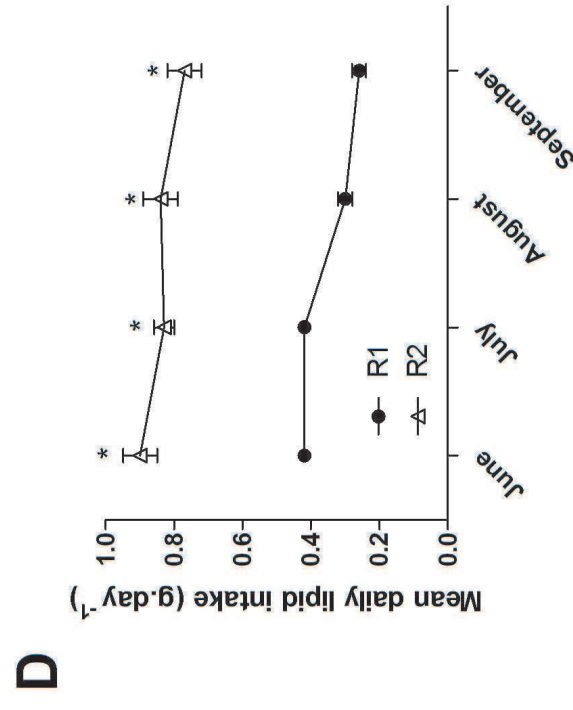
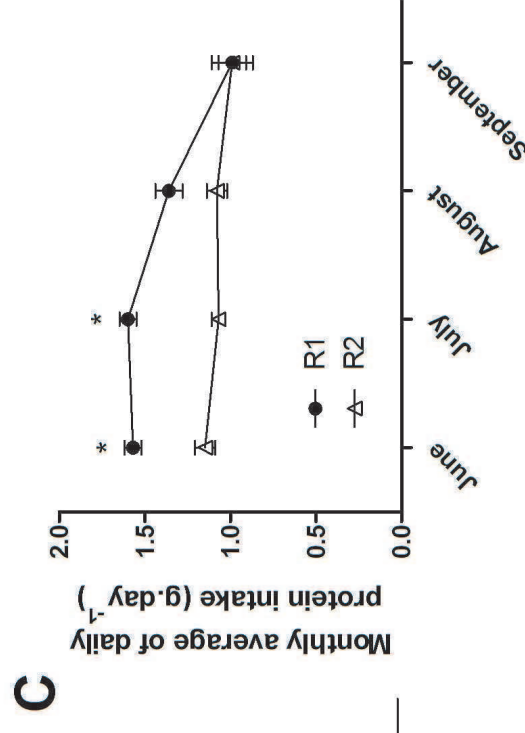
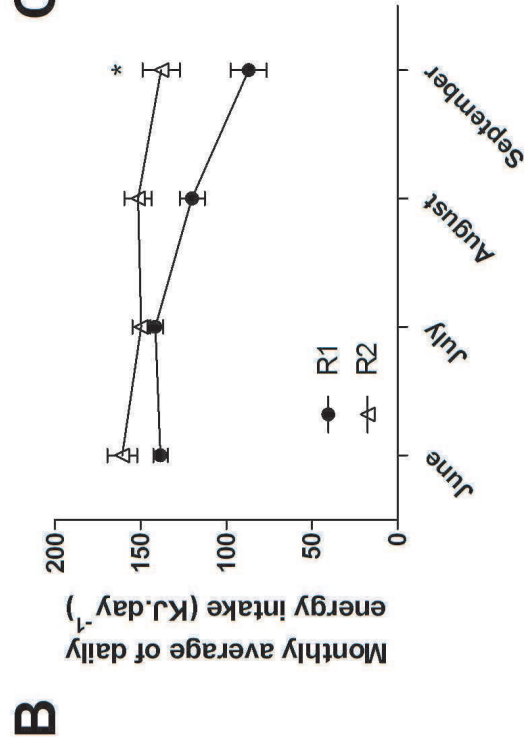
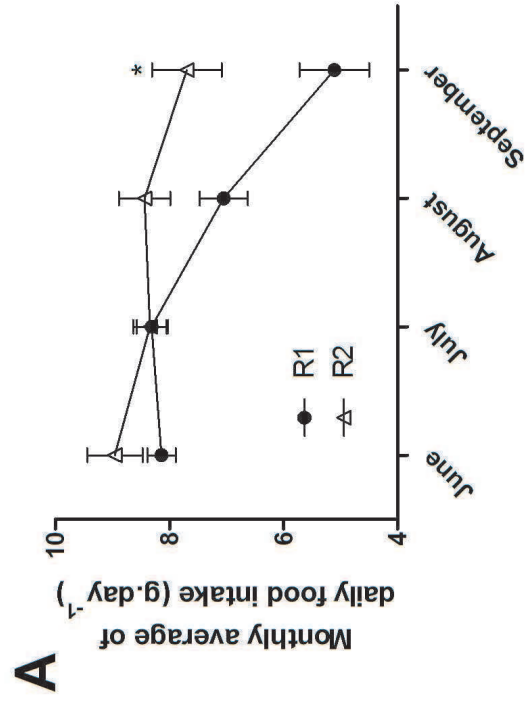


Figure 3

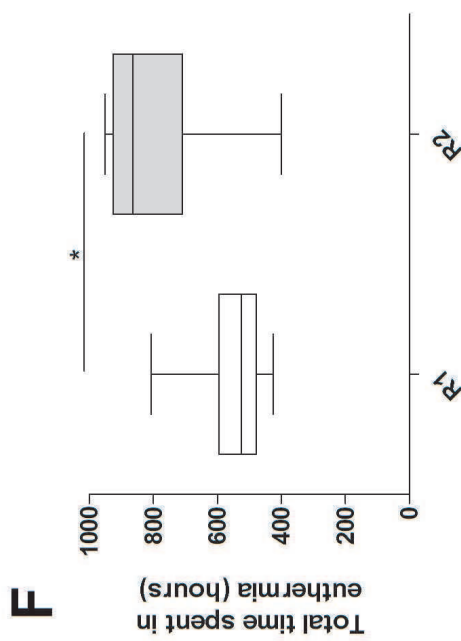
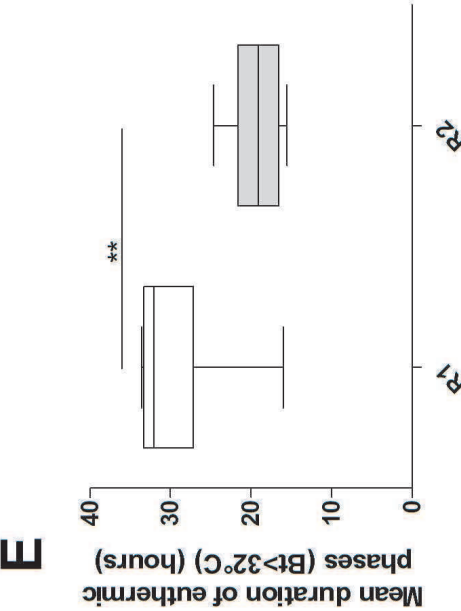
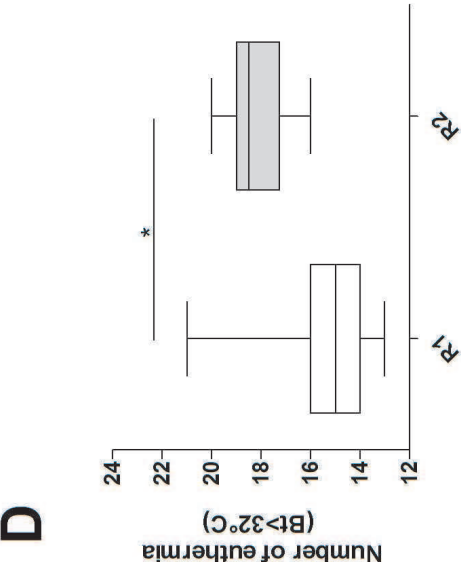
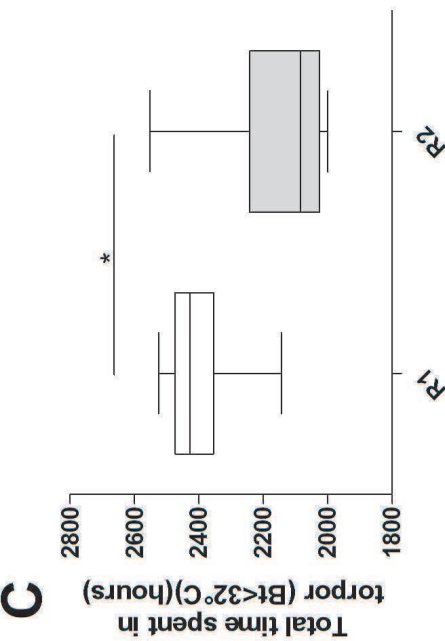
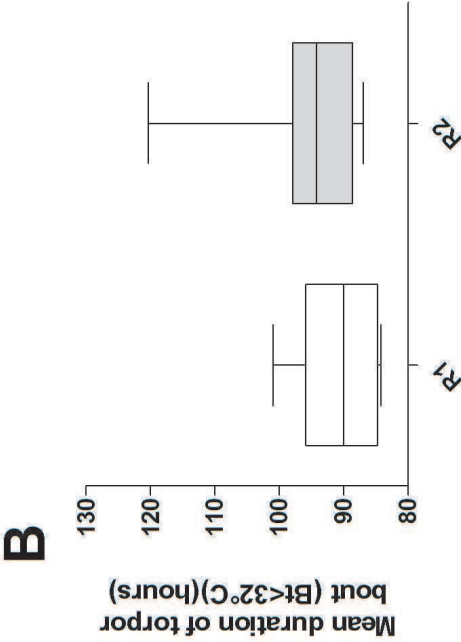
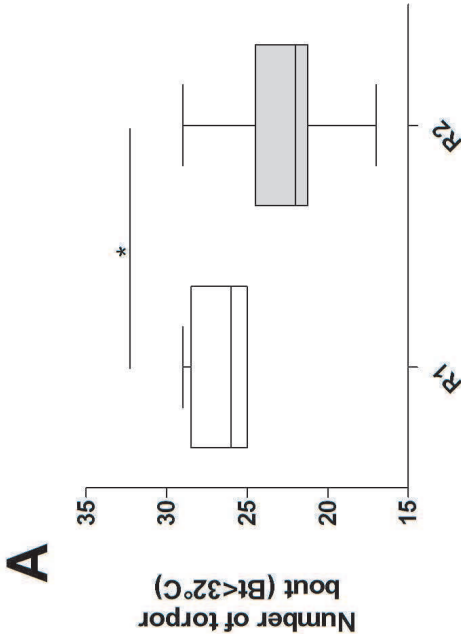
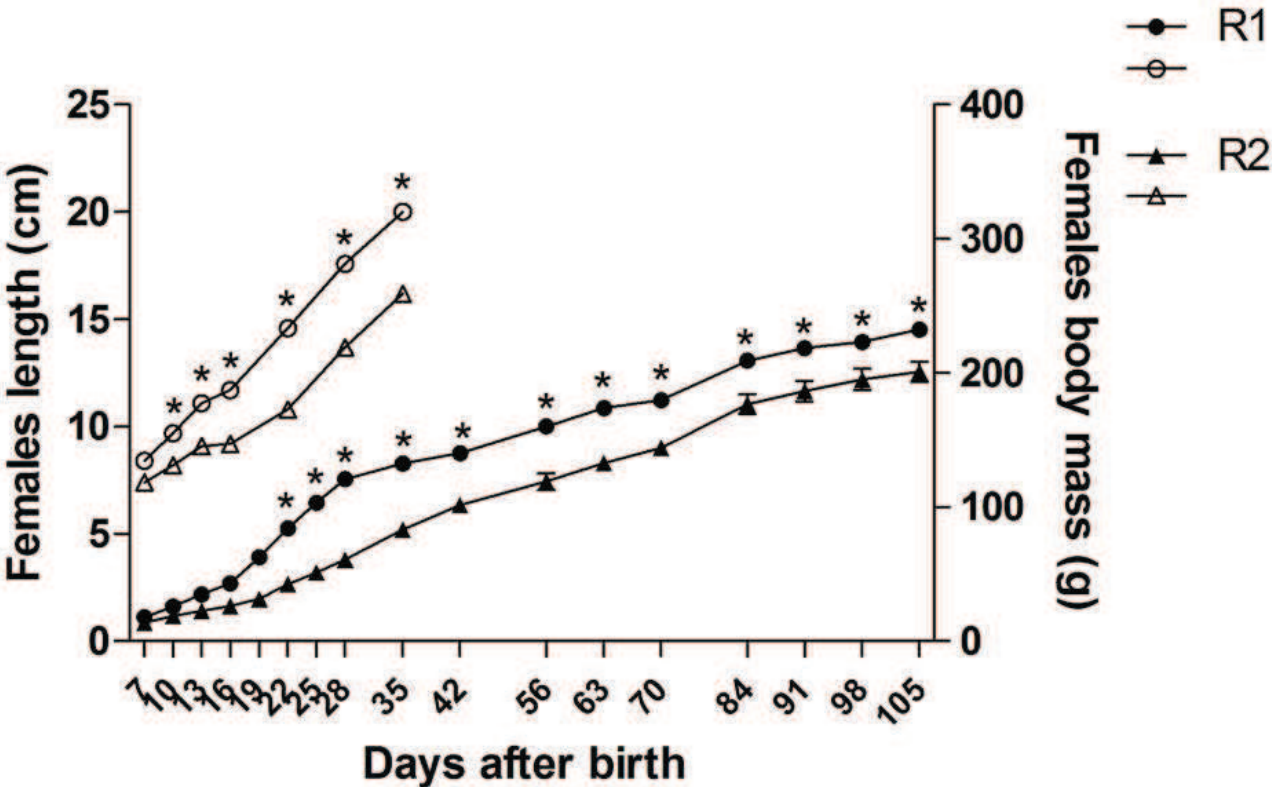
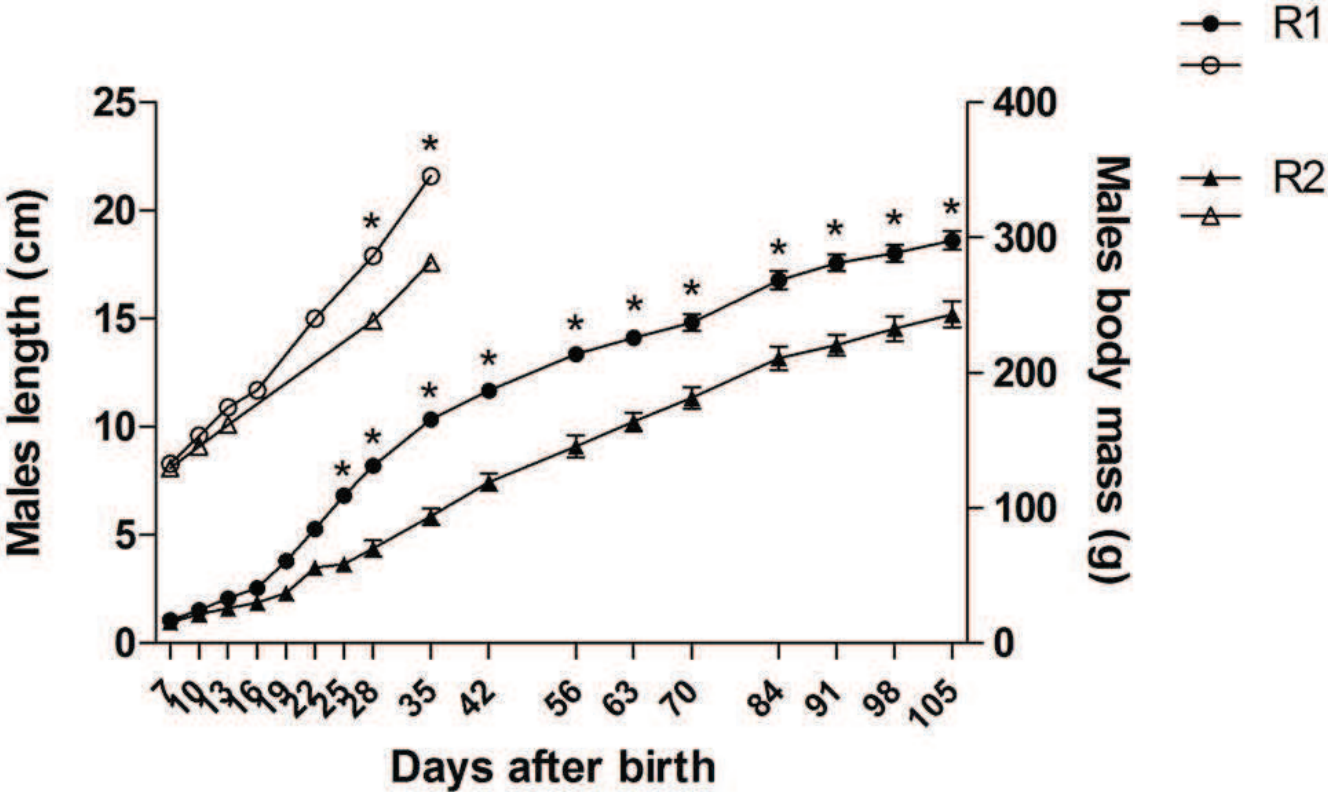


Figure 4



Conclusion et perspectives

Adaptations spécifiques aux hibernants food-storing

Toutes les espèces hibernantes présentent une stratégie d'économie d'énergie identique pendant l'hibernation via une diminution du métabolisme et de la température corporelle pendant l'hibernation. Ils constituent cependant un groupe hétérogène de par leur stratégie d'accumulation de réserves avant l'hibernation et par le mode d'utilisation de ces réserves pendant l'hibernation. Ainsi, les hibernants fat-storing qui accumulent des réserves corporelles, présentent des adaptations au cours de l'hibernation qui se rapprochent de celles observées lors des jeûnes longs. A l'inverse, les hibernants food-storing qui accumulent des réserves extra-corporelles en plus ou à la place des réserves corporelles, présentent des adaptations caractéristiques d'une alternance de jeûnes courts et de réalimentation. Nous avons pu montrer que ces différentes adaptations transparaissaient au travers des variations de la concentration en métabolites plasmatiques et des taux d'hormones impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique. L'une de ces hormones est l'adiponectine, dont la concentration plasmatique diminue chez une espèce fat-storing tout au long de l'hibernation (Florant et al. 2004, *Marmotta flaviventris*) alors qu'elle tend à augmenter au cours de l'hibernation chez un hibernant food-storing (Article 1). D'autres hormones, les incrétines, voient leur taux chuter au cours de l'hibernation chez le hamster doré (Article 1). Cette diminution a également été observée dans une moindre mesure chez un animal réalisant des torpeurs journalières, le microcèbe mignon (Giroud et al., 2009).

De plus, comme ces espèces food-storing s'alimentent pendant les phases d'euthermie inter-torpeurs, elles présentent des adaptations visant à maximiser l'assimilation de nutriments pendant ces courtes phases d'euthermie. Une étude a en effet montré que l'expression de la torpeur est positivement corrélée avec les capacités digestives chez le

tamia rayé (Humphries et al. 2001), suggérant un maintien des capacités digestives chez les espèces food-storing pendant l'hibernation. Cette hypothèse est confortée par le maintien de l'activité des enzymes intestinales chez le hamster d'Europe (Galluser et al. 1988). Notre première étude a permis de confirmer ces résultats en montrant un allongement de la taille des villosités intestinales chez le hamster doré au cours de l'hibernation, à l'inverse des hibernants fat-storing qui présentent un raccourcissement de ces villosités à l'origine d'une atrophie du système digestif (Carey 1990, *Spermophilus tridecemlineatus*). Les espèces fat-storing maintiendraient toutefois l'expression de certains gènes codant pour des enzymes et transporteurs intestinaux pendant l'hibernation afin d'assurer une assimilation rapide et efficace de nutriments à l'émergence finale de l'hibernation (Carey, 1990). Chez les espèces food-storing, cette assimilation doit être optimale lors de chaque réveil inter-torpeurs. Dans ce contexte, notre deuxième étude a en effet permis de mettre en évidence un maintien total des capacités d'hydrolyse et d'absorption intestinales au cours de l'hibernation chez le hamster d'Europe. Au travers de ces adaptations intestinales, les hibernants réalisent donc un compromis entre l'économie d'énergie permise par l'hypométabolisme observé au cours de l'hibernation et le coût du maintien de la fonction intestinale. Chez les espèces food-storing, le gain énergétique provenant de l'alimentation entre deux torpeurs pourrait donc permettre de maintenir une balance énergétique proche de l'équilibre pendant l'hibernation et de minimiser l'utilisation des réserves corporelles. Chez les espèces fat-storing, une atrophie du système digestif et un maintien de l'expression de certains gènes concilieraient à la fois économie d'énergie pendant l'hibernation et réactivation rapide de la fonction intestinale à l'émergence (Carey, 1990).

Nos résultats montrent également une augmentation des capacités d'absorption du glucose au cours de l'hibernation du hamster d'Europe, ce qui permettrait de restaurer les réserves

de glycogène, très réduites dans le foie à la fin d'un épisode de torpeur comme cela a été montré chez le hamster doré (Musacchia et Jansky 1981). De manière analogue aux adaptations métaboliques à un jeûne court, les espèces food-storing utiliseraient donc leurs réserves de glycogène en sortie de torpeur et reconstitueraient ces réserves lors de chaque période d'euthermie. Ces adaptations du métabolisme glucidique diffèrent de celles des espèces fat-storing, qui présentent un maintien de la glycémie et de la néoglucogenèse tout au long de l'hibernation (Musacchia et Jansky 1981, Article 2). Notre première étude a montré une diminution de la glycémie chez les hamsters dorés en torpeur alors que les données de notre seconde étude n'ont pas mis en évidence de variations significatives de la glycémie au cours du cycle annuel chez le hamster d'Europe. Il est cependant important de noter que les animaux de notre première étude ont été prélevés en début de torpeur et ceux de notre deuxième étude, en milieu de torpeur. Il est donc probable que le moment du prélèvement pendant la phase de torpeur impacte les valeurs de glycémie mesurées. Musacchia et Jansky (1981) ont émis l'hypothèse que la préparation à la torpeur, l'exposition au froid et l'entrée en torpeur sont coûteux en énergie et que le glycogène est le premier substrat disponible, d'où la baisse des réserves de glycogène lors des torpeurs observée dans leur étude. Cependant, du fait de cette forte dépense énergétique, les animaux pourraient présenter une baisse transitoire de la glycémie en début de torpeur qui se résorberait par le biais de l'utilisation du glycogène et ne serait donc plus observable en milieu de torpeur.

Influence de la composition du régime alimentaire

De nombreux travaux se sont intéressés à l'influence de la nature des acides gras sur le déroulement de l'hibernation, aussi bien chez les espèces fat-storing que chez les espèces food-storing (Munro et al., 2005; Ruf and Arnold, 2008). Notre étude est la première à

démontrer une influence de la composition en macronutriments du régime alimentaire sur le cycle annuel d'une espèce food-storing.

Nos résultats montrent qu'un régime appauvri en protéines et enrichi en lipides induit une accumulation de réserves plus importante lors de la période pré-hibernatoire. Il en résulte une moindre utilisation de la torpeur mais induisant une perte de masse plus importante lors de l'hibernation. Ce même régime induit également une diminution du succès reproducteur et une croissance ralentie des jeunes, probablement liée à une carence en protéines, comme cela a déjà été observé chez des espèces non-hibernantes (Guzmán et al., 2006; Zambrano et al., 2006). Au-delà des effets directs sur la reproduction, la composition en macronutriments du régime alimentaire pourrait également impacter la reproduction par des effets indirects sur la qualité de l'hibernation dont les mécanismes exacts restent à déterminer.

Perspectives

Ce travail de thèse amène à plusieurs perspectives

1 / Etude de la régulation du métabolisme énergétique au cours de l'hibernation :

- **Identifier des hormones impliquées dans le recrutement et la restauration des réserves énergétiques au cours des cycles torpeur-euthermie inter-torpeurs**
- **Identifier des hormones et des métabolites contrôlant les sorties de torpeur et initiant le comportement alimentaire chez les hibernants food-storing**

Je propose de répondre à ces questions par une approche non ciblée :

- **Puces à ADN/ RNA Seq**

Le séquençage intégral du génome d'un hibernant fat-storing comme le spermophile rayé a permis d'apporter de nouveaux outils d'une très grande puissance pour étudier les variations des voies métaboliques au cours de l'hibernation (Hampton et al., 2011). La disponibilité de tels outils chez des hibernants food-storing permettrait d'apporter des réponses rapides mais également d'établir des comparaisons avec les espèces fat-storing.

J'utiliserai également une approche ciblée de mécanismes candidats :

Suite aux études menées dans le cadre de cette thèse, certaines hormones pourraient être plus particulièrement impliquées dans le métabolisme énergétique et dans les alternances jeûne / hyperphagie au cours de l'hibernation du hamster.

- Evaluation du rôle de l'adiponectine

Au cours de notre première étude, nous avons pu constater qu'une seule étude s'était intéressée aux variations des taux d'adiponectine chez un hibernant, la marmotte à ventre jaune (Florant et al., 2004). Or, de par son rôle dans la stimulation de l'oxydation des acides gras et de la thermogenèse, elle pourrait être un des acteurs de la régulation de l'utilisation des réserves énergétiques (Fruebis et al., 2001; Masaki et al., 2003). Une étude plus approfondie des variations saisonnières des taux d'adiponectine chez des hibernants aussi bien fat-storing que food-storing permettrait d'apporter plus d'informations sur son rôle probable dans la régulation de l'utilisation des réserves au cours de l'hibernation.

- Evaluation du rôle des incrétines

Jusqu'ici, une seule étude s'était intéressée aux variations des taux d'incrétines chez un hibernant, le microcèbe (animal réalisant des torpeurs journalières à caractère saisonnier) (Giroud et al., 2009). Or, de par leurs rôles anorexigènes et anaboliques et leur origine intestinale, ces hormones pourraient être des acteurs centraux du comportement

alimentaire et de la régulation des réserves énergétiques (Baggio and Drucker, 2007) au cours des euthermies inter-torpeurs.

- Etude de la synthèse endogène de glucose chez les espèces food-storing

Les plus grandes différences entre les hibernants food-storing et les hibernants fat-storing concernent l'utilisation des réserves de glucose. Par ailleurs, les espèces food-storing, contrairement aux fat-storing (Staples and Hochachka, 1998) semblent incapables de maintenir une activité néoglucogénique et épuiserait leurs réserves de glycogène hépatique pendant la torpeur et le réchauffement (Musacchia and Jansky, 1981). La mesure des capacités néoglucogénique et glycogénolytique d'un hibernant food-storing au cours des torpeurs et des euthermies permettrait de confirmer cette hypothèse. Cela pourrait passer par la mesure de l'activité d'enzymes clés de la néoglucogenèse au niveau du foie, notamment la glucose-6-phosphatase, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la protéine kinase activée par l'AMP (Adénosine monophosphate) (AMPK). Il serait également intéressant de réaliser un suivi continu du taux de glucose sanguin au cours de l'hibernation afin de confirmer la baisse transitoire de glycémie en début de torpeur puis son retour à une valeur basale en milieu de torpeur.

2/ Etude des mécanismes permettant l'absorption de nutriments pendant les euthermies inter-torpeurs

- Déterminer si le transit et l'absorption intestinale se poursuivent pendant les torpeurs**

Dans notre deuxième étude, nous avons prouvé que les capacités d'absorption étaient maintenues chez une espèce food-storing tout au long du cycle annuel. Cependant, ces mesures ont toujours été réalisées à 37°C. L'étude de Humphries et al. (2001) est arrivée à la

conclusion que les capacités de digestion étaient positivement corrélées avec le temps passé en torpeur. On peut donc s'interroger : dans quelle(s) mesure(s) le transit et l'absorption seraient maintenu(s) pendant les torpeurs ? Afin d'évaluer le transit et l'absorption pendant les torpeurs, il serait nécessaire de nourrir les animaux durant une euthermie avec des aliments marqués au bleu de méthylène et ainsi mesurer le temps de transit du bol alimentaire pendant l'épisode de torpeur suivant. De plus, l'utilisation de nourriture radiomarkée, comme du glucose comportant un C¹⁴, permettrait de confirmer nos résultats concernant les taux d'absorption obtenus à 37°C.

- Quels sont les structures cellulaires et les transporteurs impliqués ?

Nous avons observé un allongement des villosités intestinales au cours des torpeurs chez le hamster doré ainsi qu'un maintien des capacités d'hydrolyse et d'absorption intestinales au cours de l'hibernation chez le hamster d'Europe malgré une diminution de la masse de la muqueuse intestinale. Plusieurs mécanismes pourraient être impliqués telle qu'une augmentation de la surface d'absorption par un allongement des microvillosités. En effet, même chez les hibernants fat-storing, la longueur des microvillosités est maintenue pendant l'hibernation et leur densité est même augmentée (Carey and Sills, 1996). Une étude histologique des microvillosités intestinales d'un hibernant food-storing tout au long de son cycle annuel permettrait de vérifier si un allongement des microvillosités serait impliqué dans l'absorption au réveil inter-torpeur.

Etude de l'expression des transporteurs intestinaux

De plus, une étude par RT-qPCR du niveau d'expression des gènes codant pour le cotransporteur glucose sodium dépendant (SGLT1) ou encore le transporteur de peptide

(pept1), et une analyse protéique par western blot permettraient de mieux comprendre les mécanismes d'absorption mis en jeu pendant l'hibernation.

3/ Rôle des macronutriments sur la qualité de l'hibernation et la reproduction

Notre étude de l'effet des macronutriments sur le cycle annuel du hamster d'Europe ouvre plusieurs perspectives :

- **Evaluer le rôle des lipides alimentaires dans l'absorption intestinale de protéines et l'augmentation de masse maigre en période pré-hibernatoire**

Evaluation de l'efficacité digestive et mesure du transit intestinal avant l'hibernation

Afin d'évaluer si la différence de composition corporelle observée entre les groupes avant l'hibernation est due à une différence d'efficacité digestive, plus particulièrement une meilleure absorption des protéines, il serait nécessaire de procéder à des mesures de la composition des fèces. Ceci permettrait de déterminer si les animaux soumis au régime appauvri en protéines et enrichi en lipides ont absorbé plus efficacement les protéines. Si tel était le cas, nous pourrions formuler l'hypothèse d'un ralentissement du transit intestinal provoqué par l'enrichissement en lipides de ce régime et y répondre par des mesures de transit intestinal après coloration des croquettes au bleu de méthylène.

- **Evaluer le rôle des macronutriments dans la régulation de la balance énergétique avant et au cours de l'hibernation**

Mesure de l'activité physique durant l'été et de la dépense énergétique au cours du cycle annuel

Une autre hypothèse permettant d'expliquer l'augmentation de masse maigre en début d'hibernation chez les animaux soumis au régime appauvri en protéines et enrichi en lipides, serait une augmentation de l'activité physique chez ces animaux. Il serait donc intéressant de mesurer l'activité locomotrice des animaux, via des roues d'activité. En outre, comme ces animaux ne présentent pas de différence d'augmentation de masse grasse par rapport à l'autre groupe, et ce, malgré un ingéré énergétique supérieur, ils devraient avoir une dépense énergétique plus élevée avant l'hibernation, cohérente avec notre hypothèse d'une augmentation d'activité physique. La dépense énergétique serait mesurée par calorimétrie indirecte.

Ensuite, pour confirmer la plus forte dépense d'énergie des animaux soumis au régime appauvri en protéines et enrichi en lipides au cours de l'hibernation, il serait intéressant de poursuivre la mesure de dépense énergétique par calorimétrie indirecte au cours de l'hibernation.

- Evaluer le rôle des macronutriments sur la reproduction : effets directs et indirects

Effets directs :

Mesure du développement des testicules et des ovaires

Une évaluation de l'impact de l'alimentation sur la maturation sexuelle pourrait passer par l'étude histologique des testicules et des ovaires au cours du cycle annuel.

Mesure de la composition du lait

Pour confirmer l'impact de l'alimentation sur la composition du lait, il faudrait procéder à l'analyse de la composition en protéines, lipides et glucides du lait. L'évaluation de la composition du lait pourrait se faire par spectrophotométrie via les méthode de Dubois

(DuBois et al., 1956), de Barnes et Blackstock (Barnes and Blackstock, 1973) et de Lowry modifiée par Rice (Rice, 1982), pour doser respectivement les glucides, les lipides et les protéines.

Effets indirects via l'hibernation :

La perte de masse plus importante des animaux soumis au régime appauvri en protéines et enrichi en lipides au cours de l'hibernation est très probablement associée à une plus forte dépense d'énergie au cours de cette période. Ce métabolisme plus élevé pourrait avoir engendré des variations de paramètres physiologiques qui auraient par la suite impacté la reproduction.

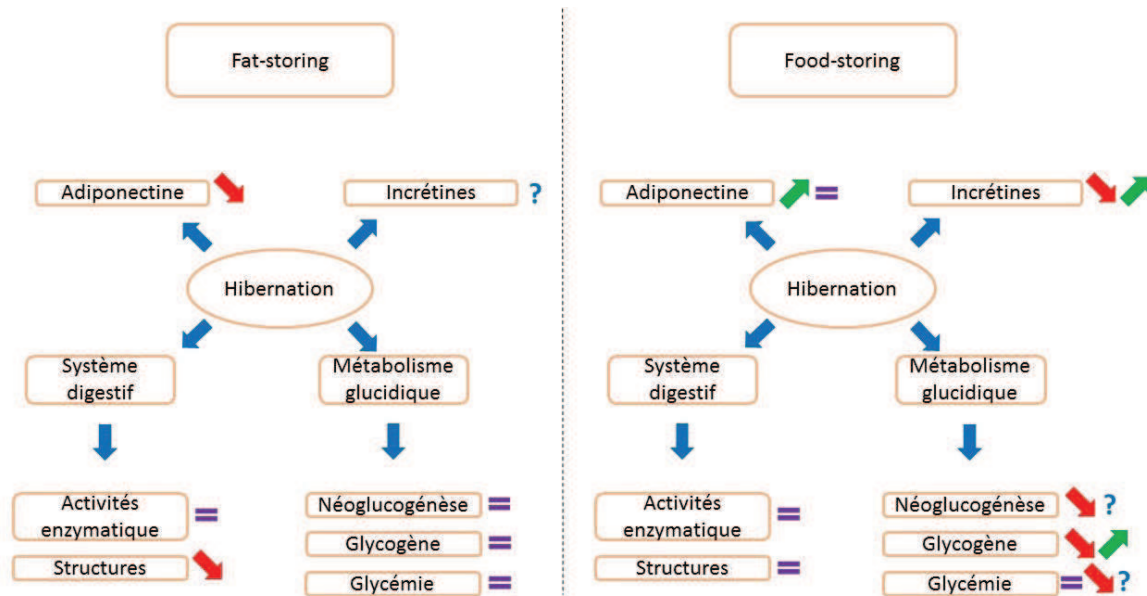
Mesure du stress oxydatif

On peut notamment évoquer le stress oxydatif, qui est connu pour avoir un impact négatif sur la reproduction (Rizzo et al., 2012). Ainsi, des mesures de stress oxydant devraient être réalisées sur les animaux des deux groupes en sortie d'hibernation afin de déterminer si les animaux ont subi un stress oxydant différent au cours de l'hibernation.

Mesure du statut hormonal

La perte plus importante de masse au cours de l'hibernation pourrait également avoir impacté les taux de certaines hormones dont la sécrétion est liée à la quantité de tissu adipeux, et intervenant dans la régulation de la fonction de reproduction, comme la leptine et l'adiponectine (Dos Santos et al., 2012; Foster and Nagatani, 1999). Des mesures de leur taux pendant et en sortie d'hibernation permettraient de déterminer si elles sont en partie responsables de la différence du succès reproducteur observée entre nos deux groupes.

Schémas de conclusion



Les différences d'adaptations entre les hibernants fat-storing et food-storing transparaissent au travers des différences de variations des taux d'hormones impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique, ainsi qu'au travers des différences de statut du système digestif et des composantes du métabolisme glucidique au cours de l'hibernation. Flèche rouge : diminution ; flèche verte : augmentation, flèche rouge et verte : diminution puis augmentation au cours de l'hibernation, signe égal : maintien.

	Protéines - / Lipides +	Protéines + / Lipides -
Masse maigre pré-hibernatoire	>	Augmentation de l'activité physique et de l'efficacité digestive ?
Utilisation de la torpeur	<	Augmentation de la dépense énergétique ?
Perte de masse pendant l'hibernation	>	
Succès reproducteur	<	Retard de la maturité sexuel ? Altération stress oxydant et/ou statut hormonal pendant l'hibernation ?
Croissance des jeunes	<	Altération de la composition du lait ?

Une altération de la composition en macronutriments du régime alimentaire induit une stratégie de mise en réserve pré-hibernatoire différente, une stratégie d'hibernation

différente, et impacte la reproduction. Les mécanismes responsables restent encore à être démontrés.

Références bibliographiques

- Aloia, R. C. and Pengelly, E. T.** (1979). Lipid composition of cellular membranes of hibernating mammals. *Chem Zool* **11**, 1–47.
- Aloia, R. C. and Raison, J. K.** (1989). Membrane function in mammalian hibernation. *Biochim. Biophys. Acta* **988**, 123–46.
- Armitage, K. B.** (1991). Factors affecting corticosteroid concentrations in yellow-bellied marmots. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **98**, 47–54.
- Armitage, K. B. and Shulenberg, E.** (1972). Evidence for a circannual metabolic cycle in *Citellus tridecemlineatus*, a hibernator. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* **42**, 667–688.
- Armitage, K. B. and Woods, B. C.** (2003). Group hibernation does not reduce energetic costs of young yellow-bellied marmots. *Physiol. Biochem. Zool.* **76**, 888–898.
- Armitage, K. B., Downhower, J. F. and Svendsen, G. E.** (1976). Seasonal Changes in Weight of Marmots. *Am. Midl. Nat.* **96**, 36–51.
- Armitage, K. B., Blumstein, D. T. and Woods, B. C.** (2003). Energetics of hibernating yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **134**, 101–14.
- Armstrong, C., Thomas, R. H., Price, E. R., Guglielmo, C. G. and Staples, J. F.** (2011). Remodeling mitochondrial membranes during arousal from hibernation. *Physiol Biochem Zool* **84**, 438–49.
- Arnold, W., Ruf, T., Frey-Roos, F. and Bruns, U.** (2011). Diet-independent remodeling of cellular membranes precedes seasonally changing body temperature in a hibernator. *PLoS One* **6**, e18641.
- Badura, L. L. and Goldman, B. D.** (1992). Central sites mediating reproductive responses to melatonin in juvenile male Siberian hamsters. *Brain Res.* **598**, 98–106.
- Bae, H. H., Larkin, J. E. and Zucker, I.** (2003). Juvenile Siberian hamsters display torpor and modified locomotor activity and body temperature rhythms in response to reduced food availability. *Physiol. Biochem. Zool.* **76**, 858–67.
- Baggio, L. L. and Drucker, D. J.** (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **132**, 2131–57.
- Balslev-Clausen, A., McCarthy, J. M. and Carey, H. V.** (2003). Hibernation reduces pancreatic amylase levels in ground squirrels. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **134**, 573–578.
- Bamshad, M., Song, C. K. and Bartness, T. J.** (1999). CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am. J. Physiol.* **276**, R1569–78.
- Barnes, B. M.** (1984). Influence of energy stores on activation of reproductive function in male golden-mantled ground squirrels. *J. Comp. Physiol. B* **154**, 421–425.
- Barnes, H. and Blackstock, J.** (1973). Estimation of lipids in marine animals and tissues: Detailed investigation of the sulphophosphovanilun method for “total” lipids. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **12**, 103–118.
- Barnes, B. M., Kretzmann, M., Licht, P. and Zucker, I.** (1986). The influence of hibernation

- on testis growth and spermatogenesis in the golden-mantled ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Biol. Reprod.* **35**, 1289–97.
- Barnes, B. M., Licht, P. and Zucker, I.** (1987). Temperature dependence of in vitro androgen production in testes from hibernating ground squirrels, *Spermophilus lateralis*. *Can. J. Zool.* **65**, 3020–3023.
- Barnes, B. M., Kretzmann, M., Zucker, I. and Licht, P.** (1988). Plasma androgen and gonadotropin levels during hibernation and testicular maturation in golden-mantled ground squirrels. *Biol. Reprod.* **38**, 616–22.
- Barros, R. C. and Branco, L. G.** (2000). Role of central adenosine in the respiratory and thermoregulatory responses to hypoxia. *Neuroreport* **11**, 193–7.
- Bartness, T. J. and Goldman, B. D.** (1989). Mammalian pineal melatonin: A clock for all seasons. *Experientia* **45**, 939–945.
- Bartness, T. J. and Wade, G. N.** (1985). Photoperiodic control of seasonal body weight cycles in hamsters. *Neurosci Biobehav Rev* **9**, 599–612.
- Bartness, T. J., Powers, J. B., Hastings, M. H., Bittman, E. L. and Goldman, B. D.** (1993). The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J. Pineal Res.* **15**, 161–90.
- Bartness, T. J., Demas, G. E. and Song, C. K.** (2002). Seasonal changes in adiposity: the roles of the photoperiod, melatonin and other hormones, and sympathetic nervous system. *Exp Biol Med* **227**, 363–76.
- Bauer, V. W., Squire, T. L., Lowe, M. E. and Andrews, M. T.** (2001). Expression of a chimeric retroviral-lipase mRNA confers enhanced lipolysis in a hibernating mammal. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **281**, R1186–92.
- Bauman, W. A.** (1990). Seasonal changes in pancreatic insulin and glucagon in the little brown bat (*Myotis lucifugus*). *Pancreas* **5**, 342–6.
- Bauman, W. a, Meryn, S. and Florant, G. L.** (1987). Pancreatic hormones in the nonhibernating and hibernating golden mantled ground squirrel. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **86**, 241–4.
- Baumber, J. and Denyes, A.** (1964). Acetate-1-C14 Utilization By Brown Fat From Hamsters In Cold Exposure And Hibernation. *Can J Biochem Physiol* **42**, 1397–401.
- Beard, L. A. and Grigg, G. C.** (2000). Reproduction in the Short-beaked Echidna, *Tachyglossus aculeatus*: Field Observations at an Elevated Site in South-east Queensland. *Proc. Linn. Soc. New South Wales* **122**, 89–99.
- Beckman, A. L. ed.** (1982). *The Neural Basis of Behavior*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Beckman, A. L. and Lladós-Eckman, C.** (1985). Antagonism of brain opioid peptide action reduces hibernation bout duration. *Brain Res.* **328**, 201–205.
- Belke, D. D., Milner, R. E. and Wang, L. C. H.** (1991). Seasonal variations in the rate and capacity of cardiac SR calcium accumulation in a hibernating species. *Cryobiology* **28**, 354–63.

- Belousov, A. B., Vinogradova, O. S. and Pakhotin, P. I.** (1990). Paradoxical state-dependent excitability of the medial septal neurons in brain slices of ground squirrel, *Citellus undulatus*. *Neuroscience* **38**, 599–608.
- Bieber, C. and Ruf, T.** (2009). Summer dormancy in edible dormice (*Glis glis*) without energetic constraints. *Naturwissenschaften* **96**, 165–71.
- Bintz, G. L.** (1988). Lipid synthesis and deposition by adult Richardson's ground squirrels in the natural environment. *J. Comp. Physiol. B* **158**, 199–204.
- Boonstra, R., Bradley, A. J. and Delehanty, B.** (2011). Preparing for hibernation in ground squirrels: adrenal androgen production in summer linked to environmental severity in winter. *Funct. Ecol.* **25**, 1348–1359.
- Boswell, T., Woods, S. C. C. and Kenagy, G. J. J.** (1994). Seasonal Changes in Body Mass, Insulin, and Glucocorticoids of Free-Living Golden-Mantled Ground Squirrels. *Gen. Comp. Endocrinol.* **96**, 339–346.
- Boyer, B. B., Ormseth, O. a, Buck, L., Nicolson, M., Pelleymounter, M. a and Barnes, B. M.** (1997). Leptin prevents posthibernation weight gain but does not reduce energy expenditure in arctic ground squirrels. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **118**, 405–12.
- Brigham, R. M.** (1992). Daily Torpor in a Free-ranging Goatsucker, the Common Poorwill (*Phalaenoptilus nuttallii*). *Physiol. Zool.* **65**, 457–172.
- Bronson, M. T.** (1979). Altitudinal Variation in the Life History of the Golden-Mantled Ground Squirrel (*Spermophilus Lateralis*). *Ecology* **60**, 272.
- Brooks, S. J. and Storey, K.** (1992). Mechanisms of glycolytic control during hibernation in the ground squirrel *Spermophilus lateralis*. *J. Comp. Physiol. B* **162**,.
- Bruns, U., Frey-Roos, F., Pudritz, S., Tataruch, F., Ruf, T. and Arnold, W.** (2000). Essential Fatty Acids: Their Impact on Free-living Alpine Marmots (*Marmota marmota*). In *Life in the Cold*, pp. 215–222. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Buck, C. L. and Barnes, B. M.** (1999). Annual Cycle of Body Composition and Hibernation in Free-living Arctic Ground Squirrels. *J Mammal* **80**, p430.
- Buck, C. L. and Barnes, B. M.** (2000). Effects of ambient temperature on metabolic rate, respiratory quotient, and torpor in an arctic hibernator. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R255–62.
- Buck, M. J., Squire, T. L. and Andrews, M. T.** (2002). Coordinate expression of the PDK4 gene: a means of regulating fuel selection in a hibernating mammal. *Physiol. Genomics* **8**, 5–13.
- Buckley, C. a and Schneider, J. E.** (2003). Food hoarding is increased by food deprivation and decreased by leptin treatment in Syrian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**, R1021–9.
- Buijs, R. M., la Fleur, S. E., Wortel, J., Van Heyningen, C., Zuiddam, L., Mettenleiter, T. C., Kalsbeek, A., Nagai, K. and Nijijima, A.** (2003). The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J. Comp. Neurol.* **464**, 36–48.

- Burlington, R. F. and Klain, G. J.** (1967). Gluconeogenesis during hibernation and arousal from hibernation. *Comp. Biochem. Physiol.* **22**, 701–708.
- Buzadzić, B., Spasić, M., Saicić, Z. S., Radojčić, R., Petrović, V. M. and Halliwell, B.** (1990). Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 2. The effect of hibernation. *Free Radic Biol Med* **9**, 407–13.
- Canguilhem, B.** (1970). [Effects of radiothyroidectomy and to thyroid hormone injections on the beginning of hibernation of the European hamster (*Cricetus cricetus*).]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **164**, 1366–9.
- Carey, H. V.** (1990). Seasonal changes in mucosal structure and function in ground squirrel intestine. *Am. J. Physiol.* **259**, R385–R392.
- Carey, H. V.** (1995). Gut Feelings About Hibernation. *News Physiol Sci* **10**, 55–61.
- Carey, H. V. and Martin, S. L.** (1996). Preservation of intestinal gene expression during hibernation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **271**, G805–813.
- Carey, H. V. and Sills, N. S.** (1992). Maintenance of intestinal nutrient transport during hibernation. *Am. J. Physiol.* **263**, R517–23.
- Carey, H. V. and Sills, N. S.** (1996). Hibernation enhances D-glucose uptake by intestinal brush border membrane vesicles in ground squirrels. *J Comp Physiol B* **166**, 254–61.
- Carey, H. V., Frank, C. L. and Aw, T. Y.** (2000). Cellular Response to Metabolic Stress in Hibernating Mammals. In *Life in the cold: Eleventh International Hibernation Symposium* (ed. Heldmaier, G.) and Klingenspor, M.), pp. 339–346.
- Carey, H. V., Andrews, M. T. and Martin, S. L.** (2003). Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev* **83**, 1153–81.
- Castex, C., Tahri, A., Hoo-Paris, R. and Sutter, B. C.** (1984). Insulin secretion in the hibernating edible dormouse (*Glis glis*): in vivo and in vitro studies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physio* **79**, 179–83.
- Catalá, A.** (2013). Five decades with polyunsaturated Fatty acids: chemical synthesis, enzymatic formation, lipid peroxidation and its biological effects. *J. Lipids* **2013**, 710290.
- Cherel, Y., el Omari, B., Le Maho, Y. and Saboureau, M.** (1995). Protein and lipid utilization during fasting with shallow and deep hypothermia in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J Comp Physiol B* **164**, 653–8.
- Choi, I. H., Cho, Y., Oh, Y. K., Jung, N. P. and Shin, H. C.** (1998). Behavior and muscle performance in heterothermic bats. *Physiol. Zool.* **71**, 257–66.
- Clausen, G. and Storesund, A.** (1971). Electrolyte distribution and renal function in the hibernating hedgehog. *Acta Physiol. Scand.* **83**, 4–12.
- Cochet, N., Meister, R., Florant, G. L. and Barré, H.** (1999). Regional variation of white adipocyte lipolysis during the annual cycle of the alpine marmot. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **123**, 225–32.
- Combs, T. P., Berg, A. H., Obici, S., Scherer, P. E. and Rossetti, L.** (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* **108**,

1875–1881.

- Concannon, P., Levac, K., Rawson, R., Tennant, B. and Bensadoun, A.** (2001). Seasonal changes in serum leptin, food intake, and body weight in photoentrained woodchucks. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R951–9.
- Corbalán-Tutau, D., Madrid, J. A., Nicolás, F. and Garaulet, M.** (2012). Daily profile in two circadian markers “melatonin and cortisol” and associations with metabolic syndrome components. *Physiol Behav.*
- Cossins, A. R. and Roberts, N.** (1996). The gut in feast and famine. *Nature* **379**, 23–23.
- Cremel, G., Rebel, G., Canguilhem, B., Rendon, A. and Waksman, A.** (1979). Seasonal variation of the composition of membrane lipids in liver mitochondria of the hibernator *crictus crictus* relation to intramitochondrial intermembranal protein movement. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **63**, 159–167.
- Cummings, D. E.** (2006). Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav* **89**, 71–84.
- Cunningham, M. J., Clifton, D. K. and Steiner, R. A.** (1999). Leptin’s actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol. Reprod.* **60**, 216–22.
- Currie, S. E., Noy, K. and Geiser, F.** (2014). Passive rewarming from torpor in hibernating bats: minimizing metabolic costs and cardiac demands. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* [ajpregu.00341.2014](#).
- Daan, S., Barnes, B. M. and Strijkstra, A. M.** (1991). Warming up for sleep? Ground squirrels sleep during arousals from hibernation. *Neurosci. Lett.* **128**, 265–8.
- Dallman, M. F., Akana, S. F., Bhatnagar, S., Bell, M. E. and Strack, A. M.** (2000). Bottomed out: metabolic significance of the circadian trough in glucocorticoid concentrations. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24 Suppl 2**, S40–6.
- Dark, J.** (1984). Seasonal weight gain is attenuated in food-restricted ground squirrels with lesions of the suprachiasmatic nuclei. *Behav. Neurosci.* **98**, 830–5.
- Dark, J.** (2005). Annual lipid cycles in hibernators: integration of physiology and behavior. *Annu Rev Nutr* **25**, 469–97.
- Darrow, J. M., Duncan, M. J., Bartke, A., Bona-Gallo, A. and Goldman, B. D.** (1988). Influence of photoperiod and gonadal steroids on hibernation in the European hamster. *J Comp Physiol A* **163**, 339–48.
- Dausmann, K. H., Glos, J., Ganzhorn, J. U. and Heldmaier, G.** (2004). Physiology: hibernation in a tropical primate. *Nature* **429**, 825–6.
- Davis, D. E.** (1976). Hibernation and circannual rhythms of food consumption in marmots and ground squirrels. *Q. Rev. Biol.* **51**, 477–514.
- Demas, G. E. and Bartness, T. J.** (2001). Direct innervation of white fat and adrenal medullary catecholamines mediate photoperiodic changes in body fat. *Am J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **281**, R1499–1505.
- Demeneix, B. A. and Henderson, N. E.** (1978). Thyroxine metabolism in active and torpid ground squirrels, *Spermophilus richardsoni*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **35**, 86–92.

- Diedrich, V., Bank, J. H. H., Scherbarth, F. and Steinlechner, S.** (2015). Torpor expression in juvenile and adult Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*) differs in frequency, duration and onset in response to a daily cycle in ambient temperature. *J. Therm. Biol.* TBD1500031.
- Dobson, F. S., Badry, M. J. and Geddes, C.** (1992). Seasonal activity and body mass of Columbian ground squirrels. *Can. J. Zool.* **70**, 1364–1368.
- Dos Santos, E., Pecquery, R., de Mazancourt, P. and Dieudonné, M.-N.** (2012). Adiponectin and reproduction. *Vitam. Horm.* **90**, 187–209.
- Drew, K. L., Tøien, Ø., Rivera, P. M., Smith, M. A., Perry, G. and Rice, M. E.** (2002). Role of the antioxidant ascorbate in hibernation and warming from hibernation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **133**, 483–92.
- Drew, K. L., Buck, C. L., Barnes, B. M., Christian, S. L., Rasley, B. T. and Harris, M. B.** (2007). Central nervous system regulation of mammalian hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. *J. Neurochem.* **102**, 1713–26.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.** (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **28**, 350–356.
- Epperson, L. E., Karimpour-Fard, A., Hunter, L. E. and Martin, S. L.** (2011). Metabolic cycles in a circannual hibernator. *Physiol. Genomics* **43**, 799–807.
- Fenyk-Melody, J.** (2012). The European Hamster. In *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (ed. Suckow, M. A.), Stevens, K. A.), and Wilson, R. P.), pp. 923–933. Academic Press.
- Flint, A., Raben, A., Rehfeld, J. F., Holst, J. J. and Astrup, A.** (2000). The effect of glucagon-like peptide-1 on energy expenditure and substrate metabolism in humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24**, 288–98.
- Florant, G. L. and Bauman, W. A.** (1985). Seasonal variations in carbohydrate metabolism in mammalian hibernators: insulin and body weight changes. *Recent Adv. Obes. Res. IV Proc. Int. Congr. Obes. 5-8 October, 1983 New York, USA / Ed. by Jules Hirsch, Theodore B. Van Itallie.*
- Florant, G. L. and Heller, H. C.** (1977). CNS regulation of body temperature in euthermic and hibernating marmots (*Marmota flaviventris*). *Am. J. Physiol.* **232**, R203–8.
- Florant, G. L., Lawrence, A. K., Williams, K. and Bauman, W. A.** (1985). Seasonal changes in pancreatic B-cell function in euthermic yellow-bellied marmots. *Am. J. Physiol.* **249**, R159–65.
- Florant, G. L., Hoo-Paris, R., Castex, C., Bauman, W. a and Sutter, B. C.** (1986). Pancreatic A and B cell stimulation in euthermic and hibernating marmots (*Marmota flaviventris*): effects of glucose and arginine administration. *J Comp Physiol B* **156**, 309–14.
- Florant, G. L., Nuttle, L. C., Mullinex, D. E. and Rintoul, D. A.** (1990). Plasma and white adipose tissue lipid composition in marmots. *Am. J. Physiol.* **258**, R1123–31.
- Florant, G. L., Singer, L., Scheurink, A. J., Park, C. R., Richardson, R. D. and Woods, S. C.** (1991). Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of marmots during the summer feeding period. *Physiol. Behav.* **49**, 335–8.

- Florant, G. L., Hester, L., Ameenuddin, S. and Rintoul, D. A.** (1993). The effect of a low essential fatty acid diet on hibernation in marmots. *Am. J. Physiol.* **264**, R747–R753.
- Florant, G. L., Porst, H., Peiffer, A., Hudachek, S. F., Pittman, C., Summers, S. A., Rajala, M. W. and Scherer, P. E.** (2004). Fat-cell mass, serum leptin and adiponectin changes during weight gain and loss in yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*). *J Comp Physiol B* **174**, 633–9.
- Forger, N. G., Dark, J., Barnes, B. M. and Zucker, I.** (1986). Fat ablation and food restriction influence reproductive development and hibernation in ground squirrels. *Biol. Reprod.* **34**, 831–40.
- Foster, D. L. and Nagatani, S.** (1999). Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. *Biol. Reprod.* **60**, 205–15.
- Fowler, P. A.** (1988). Seasonal endocrine cycles in the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*. *J. Reprod. Fertil.* **84**, 259–72.
- Franceschini-Zink, C. and Millesi, E.** (2008). Reproductive performance in female common hamsters. *Zoology (Jena)*. **111**, 76–83.
- Frank, C. L.** (1992). The Influence of Dietary Fatty Acids on Hibernation by Golden-Mantled Ground Squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Physiol. Zool.* **65**, 906–920.
- Frank, C. L.** (1994). Polyunsaturate Content and Diet Selection by Ground Squirrels (*Spermophilus Lateralis*). *Ecology* **75**, 458.
- Frank, C. L. and Storey, K. B.** (1995). The optimal depot fat composition for hibernation by golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *J Comp Physiol B* **164**, 536–42.
- Frank, C. L., Dierenfeld, E. S. and Storey, K. B.** (1998). The Relationship Between Lipid Peroxidation, Hibernation, and Food Selection in Mammals. *Integr Comp Biol* **38**, 341–349.
- Frank, C. L., Karpovich, S. and Barnes, B. M.** (2008). Dietary fatty acid composition and the hibernation patterns in free-ranging arctic ground squirrels. *Physiol. Biochem. Zool.* **81**, 486–495.
- Freeman, D. a, Lewis, D. a, Kauffman, A. S., Blum, R. M. and Dark, J.** (2004). Reduced leptin concentrations are permissive for display of torpor in Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R97–R103.
- French, A. R.** (1982). Intraspecific differences in the pattern of hibernation in the ground squirrel *Spermophilus beldingi*. *J. Comp. Physiol. ? B* **148**, 83–91.
- French, A. R.** (1985). Allometries of the durations of torpid and euthermic intervals during mammalian hibernation: A test of the theory of metabolic control of the timing of changes in body temperature. *J Comp Physiol B* **156**, 13–19.
- French, A. R.** (1988). The patterns of mammalian hibernation. *Am Sci* **76**, 569–575.
- French, A. R.** (2000). Interdependency of Stored Food and Changes in Body Temperature During Hibernation of the Eastern Chipmunk, *Tamias Striatus*. *J. Mammal.* **81**, 979–985.
- Frey, J. K.** (2015). Variation in phenology of hibernation and reproduction in the endangered

- New Mexico meadow jumping mouse (*Zapus hudsonius luteus*). *PeerJ* **3**, e1138.
- Friedman, E. A., Ogletree, M. L., Haddad, E. V and Boutaud, O.** (2015). Understanding the role of prostaglandin E2 in regulating human platelet activity in health and disease. *Thromb. Res.* **136**, 493–503.
- Fruebis, J., Tsao, T. S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M. R., Yen, F. T., Bihain, B. E. and Lodish, H. F.** (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2005–10.
- Fukushima, N., Hanada, R., Teranishi, H., Fukue, Y., Tachibana, T., Ishikawa, H., Takeda, S., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kangawa, K., et al.** (2005). Ghrelin directly regulates bone formation. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 790–8.
- Galluser, M., Raul, F. and Canguilhem, B.** (1988). Adaptation of intestinal enzymes to seasonal and dietary changes in a hibernator: the European hamster (*Cricetus cricetus*). *J. Comp. Physiol. B* **158**, 143–149.
- Galster, W. and Morrison, P. R.** (1975). Gluconeogenesis in arctic ground squirrels between periods of hibernation. *Am. J. Physiol.* **228**, 325–30.
- Galster, W. and Morrison, P.** (1976). Seasonal changes in body composition of the arctic ground squirrel, *Citellus undulatus*. *Can J Zool* **54**, 74–78.
- Garidou, M.-L., Vivien-Roels, B., Pévet, P., Miguez, J. and Simonneaux, V.** (2003). Mechanisms regulating the marked seasonal variation in melatonin synthesis in the European hamster pineal gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**, R1043–52.
- Gavrila, A., Chan, J. L., Yiannakouris, N., Kontogianni, M., Miller, L. C., Orlova, C. and Mantzoros, C. S.** (2003). Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 4823–31.
- 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.** (1990). Influence of polyunsaturated and saturated dietary lipids on adipose tissue, brain and mitochondrial membrane fatty acid composition of a mammalian hibernator. *Biochim. Biophys. Acta* **1046**, 159–166.
- Geiser, F.** (2004). Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Nutr* **66**, 239–74.
- Geiser, F.** (2013). Hibernation. *Curr. Biol.* **23**, R188–93.
- Geiser, F. and Brigham, R. M.** (2000). Torpor, thermal biology, and energetics in Australian long-eared bats (*Nyctophilus*). *J. Comp. Physiol. B.* **170**, 153–62.
- Geiser, F. and Heldmaier, G.** (1995). The impact of dietary fats, photoperiod, temperature and season on morphological variables, torpor patterns, and brown adipose tissue fatty acid composition of hamsters, *Phodopus sungorus*. *J Comp Physiol B* **165**, 406–15.
- Geiser, F. and Kenagy, G. J.** (1987). Polyunsaturated lipid diet lengthens torpor and reduces

- body temperature in a hibernator. *Am. J. Physiol.* **252**, R897–901.
- Geiser, F. and Pavey, C. R.** (2007). Basking and torpor in a rock-dwelling desert marsupial: survival strategies in a resource-poor environment. *J. Comp. Physiol. B.* **177**, 885–92.
- Geiser, F. and Ruf, T.** (1995). Hibernation versus Daily Torpor in Mammals and Birds_ Physiological Variables and Classification of Torpor Patterns. *Physiol. Zool.* **68**, 935–966.
- Geiser, F., McAllan, B. M. and Kenagy, G. J.** (1994). The degree of dietary fatty acid unsaturation affects torpor patterns and lipid composition of a hibernator. *J Comp Physiol B* **164**, 299–305.
- Geiser, F., Körtner, G. and Schmidt, I.** (1998). Leptin increases energy expenditure of a marsupial by inhibition of daily torpor. *Am. J. Physiol.* **275**, R1627–32.
- Giroud, S., Blanc, S., Aujard, F., Bertrand, F., Gilbert, C. and Perret, M.** (2008). Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R1958–67.
- Giroud, S., Perret, M., Le Maho, Y., Momken, I., Gilbert, C. and Blanc, S.** (2009). Gut hormones in relation to body mass and torpor pattern changes during food restriction and re-feeding in the gray mouse lemur. *J Comp Physiol B* **179**, 99–111.
- Giroud, S., Frare, C., Strijkstra, A., Boerema, A., Arnold, W. and Ruf, T.** (2013). Membrane Phospholipid Fatty Acid Composition Regulates Cardiac SERCA Activity in a Hibernator, the Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*). *PLoS One* **8**, e63111.
- Guppy, M. and Withers, P.** (1999). Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biol Rev Camb Philos Soc* **74**, 1–40.
- Gurr, M. I., Harwood, J. L. and Frayn, K. N.** (2002). *Lipid Biochemistry: An Introduction*. 5th ed. (ed. Blackwell Science Ltd) Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- Guzmán, C., Cabrera, R., Cárdenas, M., Larrea, F., Nathanielsz, P. W. and Zambrano, E.** (2006). Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J. Physiol.* **572**, 97–108.
- Hall, V. and Goldman, B.** (1980). Effects of gonadal steroid hormones on hibernation in the Turkish hamster (*Mesocricetus brandti*). *J. Comp. Physiol. ? B* **135**, 107–114.
- Hampton, M., Melvin, R. G., Kendall, A. H., Kirkpatrick, B. R., Peterson, N. and Andrews, M. T.** (2011). Deep sequencing the transcriptome reveals seasonal adaptive mechanisms in a hibernating mammal. *PLoS One* **6**, e27021.
- Harlow, H. J. and Frank, C. L.** (2001). The role of dietary fatty acids in the evolution of spontaneous and facultative hibernation patterns in prairie dogs. *J Comp Physiol B* **171**, 77–84.
- Harris, M. B. and Milsom, W. K.** (1995). Parasympathetic influence on heart rate in euthermic and hibernating ground squirrels. *J. Exp. Biol.* **198**, 931–7.
- Harris, M. B. and Milsom, W. K.** (2000). Is hibernation facilitated by an inhibition of arousal? In *Life in the Cold* (ed. Heldmaier, G.) and Klingenspor, M.), pp. 241–250. Berlin:

Springer-Verlag.

- Hastings, M. H. and Ebling, F. J. P.** (2006). Hibernation proteins: preparing for life in the freezer. *Cell* **125**, 21–3.
- Hawkins, R. A. and Biebuyck, J. F.** (1979). Ketone bodies are selectively used by individual brain regions. *Science* **205**, 325–7.
- Healy, J. E., Richter, M. M., Suu, L., Fried, S. K. and Florant, G. L.** (2008). Changes in serum leptin concentrations with fat mass in golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). In *Hypometabolism in animals: torpor, hibernation and cryobiology*. (ed. Lovegrove, B. G.) and McKechnie, A. E.), university of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg.
- Healy, J. E., Ostrom, C. E., Wilkerson, G. K. and Florant, G. L.** (2010). Plasma ghrelin concentrations change with physiological state in a sciurid hibernator (*Spermophilus lateralis*). *Gen Comp Endocrinol* **166**, 372–378.
- Heldmaier, G., Ortmann, S. and Elvert, R.** (2004). Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respir Physiol Neurobiol* **141**, 317–29.
- Heller, H. C.** (1979). Hibernation: neural aspects. *Annu. Rev. Physiol.* **41**, 305–21.
- Heller, H. C. and Hammel, H. T.** (1972). CNS control of body temperature during hibernation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **41**, 349–359.
- Heller, C. H., Colliver, G. W. and Beard, J.** (1977). Thermoregulation during entrance into hibernation. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **369**, 55–59.
- Hiebert, S. M.** (1991). Seasonal Differences in the Response of Rufous Hummingbirds to Food Restriction: Body Mass and the Use of Torpor. *Condor* **93**, 526–537.
- Hiebert, S. M., Thomas, E. M., Lee, T. M., Pelz, K. M., Yellon, S. M. and Zucker, I.** (2000). Photic entrainment of circannual rhythms in golden-mantled ground squirrels: role of the pineal gland. *J. Biol. Rhythms* **15**, 126–34.
- Hill, V. L. and Florant, G. L.** (1999). Patterns of fatty acid composition in free-ranging yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*) and their diet. *Can. J. Zool.* **77**, 1494–1503.
- Hill, V. L. and Florant, G. L.** (2000). The effect of a linseed oil diet on hibernation in yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*). *Physiol Behav* **68**, 431–7.
- Hindle, A. G., Karimpour-Fard, A., Epperson, L. E., Hunter, L. E. and Martin, S. L.** (2011). Skeletal muscle proteomics: carbohydrate metabolism oscillates with seasonal and torpor-arousal physiology of hibernation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**, R1440–52.
- Hoehn, K. L., Salmon, A. B., Hohnen-Behrens, C., Turner, N., Hoy, A. J., Maghzal, G. J., Stocker, R., Van Remmen, H., Kraegen, E. W., Cooney, G. J., et al.** (2009). Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 17787–92.
- Hoffman, R. A. and Zarrow, M. X.** (1958). A comparison of seasonal changes and the effect of cold on the thyroid gland of the male rat and ground squirrel (*Citellus tridecemlineatus*). *Acta Endocrinol. (Copenh)*. **27**, 77–84.
- Hoo-Paris, R., Sutter, B. C. and J., S. B. C.** (1980). Blood glucose control by insulin in the

- lethargic and arousing hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* **66A**, 141–143.
- Hoo-Paris, R., Hamsany, M., Sutter, B. C., Assan, R. and Boillot, J.** (1982). Plasma glucose and glucagon concentrations in the hibernating hedgehog. *Gen Comp Endocrinol* **46**, 246–54.
- Hoo-Paris, R., Castex, C., Hamsany, M., Thari, A. and Sutter, B.** (1985). Glucagon secretion in the hibernating edible dormouse (*Glis glis*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **81**, 277–281.
- Horowitz, J. M. and Horrigan, D. J.** (1996). Hibernation in mammals : central nervous system function. In *Handbook of Physiology, Environmental Physiology*, pp. 533–539.
- Huang, S. N. and Morton, M. L.** (1976). Seasonal changes in plasma proteins and lipids in the belding ground squirrel (*Spermophilus beldingi beldingi*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.* **54**, 239–43.
- Huang, Z.-L., Urade, Y. and Hayaishi, O.** (2011). The role of adenosine in the regulation of sleep. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 1047–57.
- Hudson, J. W.** (1980). The thyroid gland and temperature regulation in the prairie vole, *Microtus ochrogaster* and the chipmunk *Tamias striatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* **65**, 173–179.
- Hudson, J. W. and Wang, L. C. H.** (1979). Hibernation: Endocrinologic Aspects. *Annu. Rev. Physiol.* **41**, 287–303.
- Hulbert, A. J. and Hudson, J. W.** (1976). Thyroid function in a hibernator, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Am. J. Physiol.* **230**, 1211–6.
- Hume, D., Beiglböck, C., Ruf, T., Frey-Roos, F., Bruns, U. and Arnold, W.** (2002). Seasonal changes in morphology and function of the gastrointestinal tract of free-living alpine marmots (*Marmota marmota*). *J Comp Physiol B* **172**, 197–207.
- Humphries, M. M., Thomas, D. W. and Kramer, D. L.** (2001). Torpor and digestion in food-storing hibernators. *Physiol Biochem Zool* **74**, 283–92.
- Humphries, M. M., Thomas, D. W. and Kramer, D. L.** (2003a). The role of energy availability in Mammalian hibernation: a cost-benefit approach. *Physiol Biochem Zool* **76**, 165–79.
- Humphries, M. M., Kramer, D. L. and Thomas, D. W.** (2003b). The role of energy availability in Mammalian hibernation: an experimental test in free-ranging eastern chipmunks. *Physiol Biochem Zool* **76**, 180–186.
- Hut, R. A., Barnes, B. M. and Daan, S.** (2002). Body temperature patterns before, during, and after semi-natural hibernation in the European ground squirrel. *J Comp Physiol B* **172**, 47–58.
- Jallageas, M., Mas, N., Saboureau, M., Roussel, J. P. and Lacroix, A.** (1993). Effects of bilateral superior cervical ganglionectomy on thyroid and gonadal functions in the edible dormouse *Glis glis*. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* **104**, 299–304.
- Jansky, L., Haddad, G., Kahlerova, Z. and Nedoma, J.** (1984). Effect of external factors on hibernation of golden hamsters. *J Comp Physiol B* **154**, 427–433.

- Jonasson, K. A. and Willis, C. K. R.** (2011). Changes in body condition of hibernating bats support the thrifty female hypothesis and predict consequences for populations with white-nose syndrome. *PLoS One* **6**, e21061.
- Karlsson, C., Lindell, K., Svensson, E., Bergh, C., Lind, P., Billig, H., Carlsson, L. M. S. and Carlsson, B.** (1997). Expression of Functional Leptin Receptors in the Human Ovary 1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 4144–4148.
- Kawahara, K., Hohjoh, H., Inazumi, T., Tsuchiya, S. and Sugimoto, Y.** (2015). Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 414–421.
- Keen-Rhinehart, E. and Bartness, T. J.** (2008). Leptin inhibits food-deprivation-induced increases in food intake and food hoarding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R1737–46.
- Keen-Rhinehart, E., Dailey, M. J. and Bartness, T.** (2010). Physiological mechanisms for food-hoarding motivation in animals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **365**, 961–75.
- Kenagy, G. J. and Barnes, B. M.** (1988). Seasonal Reproductive Patterns in Four Coexisting Rodent Species from the Cascade Mountains, Washington. *J. Mammal.* **69**, 274–292.
- Kilduff, T. S., Sharp, F. R. and Heller, H. C.** (1982). [14C]2-deoxyglucose uptake in ground squirrel brain during hibernation. *J. Neurosci.* **2**, 143–57.
- Kirsch, R., Ouarour, A. and Pévet, P.** (1991). Daily torpor in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*): photoperiodic regulation, characteristics and circadian organization. *J Comp Physiol A* **168**, 121–8.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. and Kangawa, K.** (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656–60.
- Kondo, N. and Kondo, J.** (1992). Identification of novel blood proteins specific for mammalian hibernation. *J Biol Chem* **267**, 473–8.
- Kondo, N., Sekijima, T., Kondo, J., Takamatsu, N., Tohya, K. and Ohtsu, T.** (2006). Circannual control of hibernation by HP complex in the brain. *Cell* **125**, 161–72.
- Konttinen, A., Rajasalmi, M. and Sarajas, H. S.** (1964). FAT METABOLISM OF THE HEDGEHOG DURING THE HIBERNATING CYCLE. *Am. J. Physiol.* **207**, 845–848.
- Krilowicz, B. L.** (1985). Ketone body metabolism in a ground squirrel during hibernation and fasting. *Am J Physiol* **249**, R462–70.
- Krilowicz, B. L., Szymusiak, R. and McGinty, D.** (1994). Regulation of posterior lateral hypothalamic arousal related neuronal discharge by preoptic anterior hypothalamic warming. *Brain Res.* **668**, 30–8.
- Kronfeld-Schor, N., Richardson, C., Silvia, B. A., Kunz, T. H. and Widmaier, E. P.** (2000). Dissociation of leptin secretion and adiposity during prehibernatory fattening in little brown bats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R1277–81.
- Krupp, P. P., Young, R. A. and Frink, R.** (1977). The thyroid gland of the woodchuck, *Marmota monax*: a morphological study of seasonal variations in the follicular cells.

- Anat. Rec.* **187**, 495–514.
- Lachiver, F.** (1964). *Thyroid Activity in the Garden Dormouse (Eliomys Quercinus L.) Studied from June to November*. Tiedeakat.
- Lafontan, M. and Viguerie, N.** (2006). Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 580–5.
- Laud, K., Gourdou, I., Bélair, L., Keisler, D. H. and Djiane, J.** (1999). Detection and regulation of leptin receptor mRNA in ovine mammary epithelial cells during pregnancy and lactation. *FEBS Lett.* **463**, 194–8.
- Laursen, W. J., Mastrotto, M., Pesta, D., Funk, O. H., Goodman, J. B., Merriman, D. K., Ingolia, N., Shulman, G. I., Bagriantsev, S. N. and Gracheva, E. O.** (2014). Neuronal UCP1 expression suggests a mechanism for local thermogenesis during hibernation. *PNAS* **112**, 1–6.
- Lebrethon, M. C., Vandersmissen, E., Gérard, A., Parent, A. S., Junien, J. L. and Bourguignon, J. P.** (2000). In Vitro Stimulation of the Prepubertal Rat Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator by Leptin and Neuropeptide Y through Distinct Mechanisms 1. *Endocrinology* **141**, 1464–1469.
- Lee, T. M., Pelz, K., Licht, P. and Zucker, I.** (1990). Testosterone influences hibernation in golden-mantled ground squirrels. *Am. J. Physiol.* **259**, R760–7.
- Lehmer, E. M. and Horne, B. Van** (2001). Seasonal changes in lipids, diet, and body composition of free-ranging black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Can. J. Zool.* **79**, 955–965.
- Levesque, D. L. and Tattersall, G. J.** (2009). Seasonal changes in thermoregulatory responses to hypoxia in the Eastern chipmunk (*Tamias striatus*). *J. Exp. Biol.* **212**, 1801–10.
- Levesque, D. L. and Tattersall, G. J.** (2010). Seasonal torpor and normothermic energy metabolism in the Eastern chipmunk (*Tamias striatus*). *J Comp Physiol B* **180**, 279–92.
- Lyman, C. P.** (1958). Oxygen consumption, body temperature and heart rate of woodchucks entering hibernation. *Am. J. Physiol.* **194**, 83–91.
- Lyman, C. P. and Chatfield, P. O.** (1955). Physiology of Hibernation in Mammals. *Physiol Rev* **35**, 403–425.
- Lyman, C. P. and Leduc, E. H.** (1953). Changes in blood sugar and tissue glycogen in the hamster during arousal from hibernation. *J. Cell. Comp. Physiol.* **41**, 471–491.
- Lyman, C. P., Willis, J. S., Malan, A. and Wang, L. C. H.** (1982). *Hibernation and Torpor in mammals and Birds*. (ed. Lyman, C. P.), Willis, J. S.), Malan, A.), and Wang, L. C. H.) New York: Academic.
- Macrae, J. C. and Loble, G. E.** (1986). Interactions between energy and protein. In *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants* (ed. Milligan, L. P.), Grovum, W. L.), and Dobson, A.), pp. 367–385. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Magni, P., Vettor, R., Pagano, C., Calcagno, A., Beretta, E., Messi, E., Zanisi, M., Martini, L. and Motta, M.** (1999). Expression of a Leptin Receptor in Immortalized Gonadotropin-Releasing Hormone-Secreting Neurons 1. *Endocrinology* **140**, 1581–1585.

- Malan, a, Mioskowski, E. and Calgari, C.** (1988). Time-course of blood acid-base state during arousal from hibernation in the European hamster. *J Comp Physiol B* **158**, 495–500.
- Masaki, T., Chiba, S., Yasuda, T., Tsubone, T., Kakuma, T., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. and Yoshimatsu, H.** (2003). Peripheral, but not central, administration of adiponectin reduces visceral adiposity and upregulates the expression of uncoupling protein in agouti yellow (Ay/a) obese mice. *Diabetes* **52**, 2266–73.
- Masson-Pevet, M., Naimi, F., Canguilhem, B., Saboureau, M., Bonn, D. and Pévet, P.** (1994a). Are the annual reproductive and body weight rhythms in the male European hamster (*Cricetus cricetus*) dependent upon a photoperiodically entrained circannual clock? *J. Pineal Res.* **17**, 151–63.
- Masson-Pevet, M., Naimi, F., Canguilhem, B., Saboureau, M., Bonn, D., Pévet, P., Masson-Pévet, M., Naimi, F., Canguilhem, B., Saboureau, M., et al.** (1994b). Are the annual reproductive and body weight rhythms in the male European hamster (*Cricetus cricetus*) dependent upon a photoperiodically entrained circannual clock? *J. Pineal Res.* **17**, 151–163.
- Matsumura, H., Nakajima, T., Osaka, T., Satoh, S., Kawase, K., Kubo, E., Kantha, S. S., Kasahara, K. and Hayaishi, O.** (1994). Prostaglandin D2-sensitive, sleep-promoting zone defined in the ventral surface of the rostral basal forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 11998–2002.
- McCarron, R. M., Sieckmann, D. G., Yu, E. Z., Frerichs, K. and Hallenbeck, J. M.** (2001). Hibernation, a state of natural tolerance to profound reduction in organ blood flow and oxygen delivery capacity. In *Molecular Mechanisms of Metabolic Arrest: Life in Limbo* (ed. Storey, K. B.), pp. 23–42. BIOS Scientific Publishers.
- McElroy, J. F., Mason, P. W., Hamilton, J. M. and Wade, G. N.** (1986). Effects of diet and photoperiod on NE turnover and GDP binding in Siberian hamster brown adipose tissue. *Am. J. Physiol.* **250**, R383–8.
- McKeever, S.** (1964). The Biology of the Golden-Mantled Ground Squirrel, *Citellus lateralis*. *Ecol. Monogr.* **34**, 383–401.
- Melnyk, R. B., Mrosovsky, N. and Martin, J. M.** (1983). Spontaneous obesity and weight loss: insulin binding and lipogenesis in the dormouse. *Am. J. Physiol.* **245**, R403–7.
- Michener, G. R.** (1979). The Circannual Cycle of Richardson's Ground Squirrels in Southern Alberta. *J. Mammal.* **60**, 760–768.
- Michener, G. R.** (1992). Sexual differences in over-winter torpor patterns of Richardson's ground squirrels in natural hibernacula. *Oecologia* **89**, 397–406.
- Millesi, E., Huber, S., Everts, L. G. and Dittami, J. P.** (1999). Reproductive Decisions in Female European Ground Squirrels: Factors Affecting Reproductive Output and Maternal Investment. *Ethology* **105**, 163–175.
- Milsom, W. K., Zimmer, M. B. and Harris, M. B.** (1999). Regulation of cardiac rhythm in hibernating mammals. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **124**, 383–91.
- Minami, T., Okuda-Ashitaka, E., Mori, H., Ito, S. and Hayaishi, O.** (1996). Prostaglandin D2

- inhibits prostaglandin E2-induced allodynia in conscious mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**, 1146–52.
- Mokrasch, L. C., Grady, H. J. and Grisolia, S.** (1960). Thermogenic and adaptive mechanisms in hibernation and arousal from hibernation. *Am. J. Physiol.* **199**, 945–9.
- Monecke, S. and Wollnik, F.** (2004). European hamsters (*Cricetus cricetus*) show a transient phase of insensitivity to long photoperiods after gonadal regression. *Biol Reprod* **70**, 1438–43.
- Monecke, S. and Wollnik, F.** (2005). Seasonal variations in circadian rhythms coincide with a phase of sensitivity to short photoperiods in the European hamster. *J. Comp. Physiol. B* **175**, 167–183.
- Monecke, S., Saboureau, M., Malan, A., Bonn, D., Masson-Pévet, M. and Pévet, P.** (2009). Circannual phase response curves to short and long photoperiod in the European hamster. *J. Biol. Rhythms* **24**, 413–26.
- Monecke, S., Malan, A., Saboureau, M., Pévet, P., Sabouneau, M. and Pévet, P.** (2010). Phase shift of the circannual reproductive rhythm in European hamsters by 2 days of long photoperiod. *Neuroendocrinol. Lett.* **31**, 738–742.
- Monecke, S., Sage-Ciocca, D., Wollnik, F. and Pevet, P.** (2013). Photoperiod Can Entrain Circannual Rhythms in Pinealectomized European Hamsters. *J. Biol. Rhythms* **28**, 278–290.
- Monecke, S., Wollnik, F. and Pévet, P.** (2015). The Circannual Clock in the European Hamster: How is It Synchronized by Photoperiodic Changes? In *Annual, Lunar, and Tidal Clocks*, .
- Moreau-Hamsany, C., Castex, C., Hoo-Paris, R., Kacemi, N. and Sutter, B.** (1988). Hormonal control of lipolysis from the white adipose tissue of hibernating jerboa (*Jaculus orientalis*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.* **91**, 665–9.
- Morton, M.** (1975). Seasonal Cycles of Body Weights and Lipids in Belding Ground Squirrels. *Bull. South. Calif. Acad. Sci.* **74**, 128 – 143.
- Moschos, S., Chan, J. L. and Mantzoros, C. S.** (2002). Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* **77**, 433–444.
- Mounzih, K., Qiu, J., Ewart-Toland, A. and Chehab, F. F.** (1998). Leptin is not necessary for gestation and parturition but regulates maternal nutrition via a leptin resistance state. *Endocrinology* **139**, 5259–62.
- Mouzannar, R., McCafferty, J., Benedetto, G. and Richardson, C.** (2011). TRANSCRIPTIONAL AND PHOSPHO-PROTEOMIC SCREENS REVEAL STEM CELL ACTIVATION OF INSULIN-RESISTANCE AND TRANSFORMATION PATHWAYS FOLLOWING A SINGLE MINIMALLY TOXIC EPISODE OF ROS. *Int. J. Genomics Proteomics* **2**, 34–49.
- Mrosovsky, N.** (1976). Lipid programmes and Life strategies in hibernators. *Am. Zool.* **16**, 685–697.
- Munro, D., Thomas, D. W. and Humphries, M. M.** (2005). Torpor patterns of hibernating eastern chipmunks *Tamias striatus* vary in response to the size and fatty acid composition of food hoards. *J. Anim. Ecol.* **74**, 692–700.

- Musacchia, X. J. and Jansky, L.** (1981). *Survival in the cold: hibernation and other adaptations*. Elsevier/North Holland.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K. and Matsukura, S.** (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **409**, 194–8.
- Nedergaard, J. and Cannon, B.** (1984). Preferential utilization of brown adipose tissue lipids during arousal from hibernation in hamsters. *Am. J. Physiol.* **247**, R506–12.
- Nespolo, R. F., Verdugo, C., Cortés, P. A. and Bacigalupe, L. D.** (2010). Bioenergetics of torpor in the microbiotherid marsupial, monito del monte (*Dromiciops gliroides*): the role of temperature and food availability. *J Comp Physiol B* **180**, 767–73.
- Nizielski, S. E., Billington, C. J. and Levine, a S.** (1989). Brown fat GDP binding and circulating metabolites during hibernation and arousal. *Am. J. Physiol.* **257**, R536–41.
- Nürnberg, F.** (1995). The neuroendocrine system in hibernating mammals: present knowledge and open questions. *Cell Tissue Res.* **281**, 391–412.
- O'Brien, A. J., Fullerton, J. N., Massey, K. A., Auld, G., Sewell, G., James, S., Newson, J., Karra, E., Winstanley, A., Alazawi, W., et al.** (2014). Immunosuppression in acutely decompensated cirrhosis is mediated by prostaglandin E2. *Nat. Med.* **20**, 518–523.
- O'Hara, B. F., Watson, F. L., Srere, H. K., Kumar, H., Wiler, S. W., Welch, S. K., Bitting, L., Heller, H. C. and Kilduff, T. S.** (1999). Gene expression in the brain across the hibernation cycle. *J. Neurosci.* **19**, 3781–90.
- O'Jile, J. R. and Bartness, T. J.** (1992). Effects of thyroxine on the photoperiodic control of energy balance and reproductive status in Siberian hamsters. *Physiol. Behav.* **52**, 267–70.
- Ormseth, O. A., Nicolson, M., Pelleymounter, M. A. and Boyer, B. B.** (1996). Leptin inhibits prehibernation hyperphagia and reduces body weight in arctic ground squirrels. *Am. J. Physiol.* **271**, R1775–9.
- Orr, A. L., Lohse, L. A., Drew, K. L. and Hermes-Lima, M.** (2009). Physiological oxidative stress after arousal from hibernation in Arctic ground squirrel. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **153**, 213–21.
- Ortmann, S. and Heldmaier, G.** (2000). Regulation of body temperature and energy requirements of hibernating alpine marmots (*Marmota marmota*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, R698–704.
- Otsu, R. and Kimura, T.** (1993). Effects of food availability and ambient temperature on hibernation in the Japanese dormouse, *Glirulus japonicus*. *J. Ethol.* **11**, 37–42.
- Ottenweller, J. E., Tapp, W. N., Pitman, D. L. and Natelson, B. H.** (1987). Adrenal, thyroid, and testicular hormone rhythms in male golden hamsters on long and short days. *Am. J. Physiol.* **253**, R321–8.
- Ouarour, a, Kirsch, R. and Pévet, P.** (1991). Effects of temperature, steroids and castration on daily torpor in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Comp Physiol A* **168**, 477–81.

- Pakhotin, P. I., Pakhotina, I. D. and Belousov, A. B.** (1993). The study of brain slices from hibernating mammals in vitro and some approaches to the analysis of hibernation problems in vivo. *Prog. Neurobiol.* **40**, 123–61.
- Parajuli, S. P., Provence, A. and Petkov, G. V** (2014). Prostaglandin E2 excitatory effects on guinea pig urinary bladder smooth muscle: a novel regulatory mechanism mediated by large-conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Eur. J. Pharmacol.* **738**, 179–85.
- Paul, M. J., Freeman, D. a, Park, J. H. and Dark, J.** (2005). Neuropeptide Y induces torpor-like hypothermia in Siberian hamsters. *Brain Res* **1055**, 83–92.
- Pévet, P.** (1988). The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species. *Reprod Nutr Dev* **28**, 443–458.
- Pinatel, M. C., Durand, N. and Girod, C.** (1970). Etude des variations de l'iodémie et de l'iode thyroïdien au cours du cycle annuel chez le Hérisson, *Erinaceus europaeus* L.: comparaïosn avec l'histologie thyroïdienne. *C. R. Seances Soc. Biol? Ses Fil.* **164**, 1719–1722.
- Popova, N. K. and Koryakina, L. A.** (1981). Seasonal changes in pituitary-adrenal reactivity in hibernating spermophiles. *Endocrinol. Exp.* **15**, 269–276.
- Prendergast, B. J., Freeman, D. A., Zucker, I. and Nelson, R. J.** (2002). Periodic arousal from hibernation is necessary for initiation of immune responses in ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**, R1054–62.
- Pulawa, L. K. and Florant, G. L.** (2000). The Effects of Caloric Restriction on the Body Composition and Hibernation of the Golden-Mantled Ground Squirrel (*Spermophilus lateralis*). *Physiol. Biochem. Zool.* **73**, 538–546.
- Rauch, J. C. and Behrisch, H. W.** (1981). Ketone bodies: a source of energy during hibernation. *Can. J. Zool.* **59**, 754–760.
- Rawson, R. E., Concannon, P. W., Roberts, P. J. and Tennant, B. C.** (1998). Seasonal differences in resting oxygen consumption, respiratory quotient, and free thyroxine in woodchucks. *Am. J. Physiol.* **274**, R963–9.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R. and Ebisawa, T.** (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* **13**, 1177–85.
- Revel, F. G., Herwig, A., Garidou, M.-L., Dardente, H., Menet, J. S., Masson-Pévet, M., Simonneaux, V., Saboureau, M. and Pévet, P.** (2007). The circadian clock stops ticking during deep hibernation in the European hamster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13816–20.
- Reznik, G., Schuller, H. M. and Mohr, U.** (1978). *Clinical anatomy of the European hamster, Cricetus cricetus*, L. Walter, Pa. (ed. Castle House) U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, National Cancer Institute, Division of Cancer Cause and Prevention.
- Ricciotti, E. and FitzGerald, G. A.** (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 986–1000.

- Rice, D. L.** (1982). The Detritus Nitrogen Problem : New Observations and Perspectives from Organic Geochemistry. *Mar. Ecol. - Prog. Ser.* **9**, 153–162.
- Rivest, S. and Rivier, C.** (1995). The role of corticotropin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive functions. *Endocr. Rev.* **16**, 177–99.
- Rizzo, A., Roscino, M. T., Binetti, F. and Sciorsci, R. L.** (2012). Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reprod. Domest. Anim.* **47**, 344–52.
- Robbins, C. T.** (1983). Food Ressources and Their Utilization. In *Wildlife Feeding and Nutrition*, pp. 234–252. Elsevier.
- Ruby, N. F.** (2003). Hibernation: when good clocks go cold. *J. Biol. Rhythms* **18**, 275–286.
- Ruby, N. F. and Zucker, I.** (1992). Daily torpor in the absence of the suprachiasmatic nucleus in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol.* **263**, R353–62.
- Ruby, N. F., Nelson, R. J., Licht, P. and Zucker, I.** (1993). Prolactin and testosterone inhibit torpor in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol.* **264**, R123–8.
- Ruby, N. F., Dark, J., Heller, H. C. and Zucker, I.** (1998). Suprachiasmatic nucleus: role in circannual body mass and hibernation rhythms of ground squirrels. *Brain Res.* **782**, 63–72.
- Ruf, T. and Arnold, W.** (2008). Effects of polyunsaturated fatty acids on hibernation and torpor: a review and hypothesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R1044–52.
- Ruf, T. and Geiser, F.** (2014). Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **90**, 891–926.
- Ruf, T., Stieglitz, A., Steinlechner, S., Blank, J. L. and Heldmaier, G.** (1993). Cold exposure and food restriction facilitate physiological responses to short photoperiod in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J. Exp. Zool.* **267**, 104–12.
- Sallmen, T., Lozada, A. F., Beckman, A. L. and Panula, P.** (2003). Intrahippocampal histamine delays arousal from hibernation. *Brain Res.* **966**, 317–20.
- Sato, T., Nakamura, Y., Shiimura, Y., Ohgusu, H., Kangawa, K. and Kojima, M.** (2012). Structure, regulation and function of ghrelin. *J. Biochem.* **151**, 119–28.
- Schade, D. S., Woodside, W. and Eaton, R. P.** (1979). The role of glucagon in the regulation of plasma lipids. *Metabolism.* **28**, 874–86.
- Schneider, J. E., Blum, R. M. and Wade, G. N.** (2000). Metabolic control of food intake and estrous cycles in syrian hamsters. I. Plasma insulin and leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, R476–85.
- Schwartz, C., Ballinger, M. A. and Andrews, M. T.** (2015). Melatonin receptor signaling contributes to neuroprotection upon arousal from torpor in thirteen-lined ground squirrels. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* ajpregu.00292.2015.
- Shivatcheva, T. M., Ankov, V. K. and Hadjioloff, A. I.** (1988). Circannual fluctuations of the serum cortisol in the European ground squirrel, *Citellus citellus* L. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physio* **90**, 515–8.
- Shousha, S., Nakahara, K., Nasu, T., Sakamoto, T. and Murakami, N.** (2007). Effect of

- glucagon-like peptide-1 and -2 on regulation of food intake, body temperature and locomotor activity in the Japanese quail. *Neurosci. Lett.* **415**, 102–7.
- Shuto, Y., Shibasaki, T., Otagiri, A., Kuriyama, H., Ohata, H., Tamura, H., Kamegai, J., Sugihara, H., Oikawa, S. and Wakabayashi, I.** (2002). Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J. Clin. Invest.* **109**, 1429–1436.
- Sigurdson, S. L. and Himms-Hagen, J.** (1988). Control of norepinephrine turnover in brown adipose tissue of Syrian hamsters. *Am. J. Physiol.* **254**, R960–8.
- Skibieli, A. L. and Hood, W. R.** (2013). Milk composition in a hibernating rodent, the Columbian ground squirrel (*Urocyon columbianus*). *J. Mammal.* **94**, 146–154.
- Skibieli, A. L., Dobson, F. S. and Murie, J. O.** (2009). Maternal influences on reproduction in two populations of Columbian ground squirrels. *Ecol. Monogr.* **79**, 325–341.
- Smith, G. D.** (2012). Syrian hamster: Taxonomy and History. In *The Laboratory rabbit, Guinea Pig, Hamster and Other Rodents* (ed. Suckow, M. A.), Stevens, K. A.), and Wilson, R. P.), pp. 747–752. Academic Press.
- Smith, C. C. and Reichman, O. J.** (1984). The Evolution of Food Caching by Birds and Mammals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **15**, 329–351.
- Snapp, B. D. and Heller, H. C.** (1981). Suppression of metabolism during hibernation in ground squirrels. *Physiol. Zool.* **54**, 297–307.
- Song, X., Körtner, G. and Geiser, F.** (1997). Thermal relations of metabolic rate reduction in a hibernating marsupial. *Am. J. Physiol.* **273**, R2097–104.
- Song, C. K., Bartness, T. J., Petersen, S. L. and Bittman, E. L.** (2000). Co-expression of melatonin (MEL1a) receptor and arginine vasopressin mRNAs in the Siberian hamster suprachiasmatic nucleus. *J. Neuroendocrinol.* **12**, 627–34.
- Speakman, J. R.** (2008). The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **363**, 375–398.
- Speakman, J. R. and Rowland, A.** (1999). Preparing for inactivity: how insectivorous bats deposit a fat store for hibernation. *Proc. Nutr. Soc.* **58**, 123–31.
- Squire, T. L., Lowe, M. E., Bauer, V. W. and Andrews, M. T.** (2003). Pancreatic triacylglycerol lipase in a hibernating mammal. II. Cold-adapted function and differential expression. *Physiol. Genomics* **16**, 131–140.
- Srivastava, R. K. and Krishna, A.** (2010). Melatonin modulates glucose homeostasis during winter dormancy in a vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **155**, 392–400.
- Stamper, J. L., Dark, J. and Zucker, I.** (1999). Photoperiod modulates torpor and food intake in Siberian hamsters challenged with metabolic inhibitors. *Physiol Behav* **66**, 113–8.
- Staples, J. F. and Hochachka, P. W.** (1998). The effect of hibernation status and cold-acclimation on hepatocyte gluconeogenesis in the golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*). *Can J Zool* **76**, 1734–1740.
- Suckow, M. A., Stevens, K. A. and Wilson, R. P.** (2012). *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig,*

- Hamster, and Other Rodents*. (ed. Suckow, M. A.), Stevens, K. A.), and Wilson, R. P.) Academic Press.
- Swanson, J. E., Lokesh, B. R. and Kinsella, J. E.** (1989). Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase of mouse cardiac sarcoplasmic reticulum is affected by membrane n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid content. *J. Nutr.* **119**, 364–72.
- Swoap, S. J., Rathvon, M. and Gutilla, M.** (2007). AMP does not induce torpor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**, R468–73.
- Swoap, S. J., Iliff, B. and Le, S.** (2012). Adenosine, AMP, and Daily Torpor. In *Living in a Seasonal World SE - 30* (ed. Ruf, T.), Bieber, C.), Arnold, W.), and Millesi, E.), pp. 337–349 LA – English. Springer Berlin Heidelberg.
- Taffet, G. E., Pham, T. T., Bick, D. L., Entman, M. L., Pownall, H. J. and Bick, R. J.** (1993). The calcium uptake of the rat heart sarcoplasmic reticulum is altered by dietary lipid. *J. Membr. Biol.* **131**, 35–42.
- Takahata, R., Matsumura, H., Eguchi, N., Kantha, S. S., Satoh, S., Sakai, T., Kondo, N. and Hayaishi, O.** (1996). Seasonal variation in levels of prostaglandins D2, E2 and F2(alpha) in the brain of a mammalian hibernator, the Asian chipmunk. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* **54**, 77–81.
- Tamura, Y., Shintani, M., Nakamura, A., Monden, M. and Shiomi, H.** (2005). Phase-specific central regulatory systems of hibernation in Syrian hamsters. *Brain Res* **1045**, 88–96.
- Tashima, L. S., Adelstein, S. J. and Lyman, C. P.** (1970). Radioglucose utilization by active, hibernating, and arousing ground squirrels. *Am. J. Physiol.* **218**, 303–9.
- Thorp, C. R., Kodanda, Ram, P. and Florant, G. L.** (1994). Diet alters metabolic rate in the yellow-bellied marmot (*Marmota flaviventris*) during hibernation. *Physiol. Zool.* **67**, 1213–1229.
- Tøien, Ø., Drew, K. L., Chao, M. L. and Rice, M. E.** (2001). Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R572–83.
- Trachsel, L., Edgar, D. M. and Heller, H. C.** (1991). Are ground squirrels sleep deprived during hibernation? *Am. J. Physiol.* **260**, R1123–9.
- Tups, a, Helwig, M., Khorosh, R. M. H., Archer, Z. a, Klingenspor, M. and Mercer, J. G.** (2004). Circulating ghrelin levels and central ghrelin receptor expression are elevated in response to food deprivation in a seasonal mammal (*Phodopus sungorus*). *J. Neuroendocrinol.* **16**, 922–8.
- Turton, M. D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S. A., Edwards, C. M., Meeran, K., Choi, S. J., Taylor, G. M., Heath, M. M., Lambert, P. D., et al.** (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* **379**, 69–72.
- Twente, J. W. and Twente, J. A.** (1967). Concentrations of D-Glucose in the Blood of *Citellus lateralis* after Known Intervals of Hibernating Periods. *J. Mammal.* **48**, 381–386.
- Twente, J. W. and Twente, J.** (1978). Autonomic regulation of hibernation by *Citellus* and *Eptesicus*. In *Strategies in Cold: Natural Torpidity and Thermogenesis* (ed. Wang, L. C. H.) and Hudson, J. W.), pp. 327–373. New York: Academic.

- Twente, J. W. and Twente, J. A.** (1985). The duration of the period of hibernation of three species of vespertilionid bats. *Can J Zool* **63**, 2955–2961.
- Ueda, S. and Ibuka, N.** (1995). An analysis of factors that induce hibernation in Syrian hamsters. *Physiol Behav* **58**, 653–657.
- Urade, Y. and Hayaishi, O.** (2000). Prostaglandin D synthase: Structure and function. *Vitam. Horm.* **58**, 89–120.
- Veloso, C., Place, N. J. and Kenagy, G. J.** (2003). Milk composition of free-living yellow-pine chipmunks (*Tamias amoenus*): temporal variation during lactation. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **134**, 387–92.
- Vriend, J.** (1983). Evidence for pineal gland modulation of the neuroendocrine-thyroid axis. *Neuroendocrinology* **36**, 68–78.
- Vuarin, P. and Henry, P.-Y.** (2014). Field evidence for a proximate role of food shortage in the regulation of hibernation and daily torpor: a review. *J. Comp. Physiol. B* **184**, 683–697.
- Wall, S. B. Vander** (1990). *Food Hoarding in Animals*. University Of Chicago Press.
- Wang, L. C. H.** (1982). Hibernation and the endocrines. In *Hibernation and Torpor in mammals and Birds* (ed. Lyman, C. P.), Willis, J. S.), Malan, A.), and Wang, L. C. H.), pp. 206–229. New York: Academic press.
- Wang, L. C. H.** (1989). Ecological, Physiological, and Biochemical Aspects of Torpor in Mammals and Birds. In *Animal Adaptation to Cold* (ed. Wang, L. C. H.), pp. 361–401. Springer Berlin Heidelberg.
- Wang, L. C. H. and Lee, T. F.** (2011). Torpor and Hibernation in Mammals: Metabolic , Physiological , and Biochemical Adaptations. In *Compr Physiol*, pp. 507–532. John Wiley & Sons, Inc.
- Ward, J. M. and Armitage, K. B.** (1981). Circannual rhythms of food consumption, body mass, and metabolism in yellow-bellied marmots. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* **69**, 621–626.
- Wathes, D. C., Abayasekara, D. R. E. and Aitken, R. J.** (2007). Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod* **77**, 190–201.
- Wenberg, G. M. and Holland, J. C.** (1973). The circannual variations of thyroid activity in the woodchuck (*Marmota monax*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* **44**, 775–780.
- Westman, W. and Geiser, F.** (2004). The effect of metabolic fuel availability on thermoregulation and torpor in a marsupial hibernator. *J. Comp. Physiol. B.* **174**, 49–57.
- Whirledge, S. and Cidlowski, J. A.** (2010). Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinol.* **35**, 109–25.
- Wilhelms, D. B., Kirilov, M., Mirrasekhian, E., Eskilsson, A., Kugelberg, U. Ö., Klar, C., Ridder, D. A., Herschman, H. R., Schwaninger, M., Blomqvist, A., et al.** (2014). Deletion of prostaglandin E2 synthesizing enzymes in brain endothelial cells attenuates inflammatory fever. *J. Neurosci.* **34**, 11684–90.
- Wimsatt, W. A.** (1969). Some interrelations of reproduction and hibernation in mammals.

- Symp. Soc. Exp. Biol.* **23**, 511–49.
- Witter, M. S. and Cuthill, I. C.** (1993). The ecological costs of avian fat storage. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **340**, 73–92.
- Wojciechowski, M. S., Jefimow, M. and Tegowska, E.** (2007). Environmental conditions, rather than season, determine torpor use and temperature selection in large mouse-eared bats (*Myotis myotis*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **147**, 828–40.
- Wojda, S. J., McGee-Lawrence, M. E., Gridley, R. A., Auger, J., Black, H. L. and Donahue, S. W.** (2012). Yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*) preserve bone strength and microstructure during hibernation. *Bone* **50**, 182–8.
- Wollnik, F. and Schmidt, B.** (1995). Seasonal and daily rhythms of body temperature in the European hamster (*Cricetus cricetus*) under semi-natural conditions. *J Comp Physiol B* **165**, 171–82.
- Xue, L., Fergusson, J., Salimi, M., Panse, I., Ussher, J. E., Hegazy, A. N., Vinall, S. L., Jackson, D. G., Hunter, M. G., Pettipher, R., et al.** (2015). Prostaglandin D2 and leukotriene E4 synergize to stimulate diverse TH2 functions and TH2 cell/neutrophil crosstalk. *J. Allergy Clin. Immunol.* **135**, 1358–66.e1–11.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., et al.** (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* **8**, 1288–95.
- Yatani, A.** (2004). Insights into cardioprotection obtained from study of cellular Ca²⁺ handling in myocardium of true hibernating mammals. *AJP Hear. Circ. Physiol.* **286**, H2219–H2228.
- Young, R. A., Danforth, E., Vagenakis, A. G., Krupp, P. P., Frink, R. and Sims, E. A.** (1979). Seasonal variation and the influence of body temperature on plasma concentrations and binding of thyroxine and triiodothyronine in the woodchuck. *Endocrinology* **104**, 996–9.
- Young, V. R., Munro, H. N., Matthews, D. E. and Bier, D. M.** (1983). Relationship of energy metabolism to protein turnover. In *New Aspects of Clinical Nutrition* (ed. Kleinberger, G.) and Deutsch, E.), pp. 43–73. Karger, Basel.
- Zambrano, E., Bautista, C. J., Deás, M., Martínez-Samayoa, P. M., González-Zamorano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F. and Nathanielsz, P. W.** (2006). A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J. Physiol.* **571**, 221–30.
- Zimmer, M. B. and Milsom, W. K.** (2001). Effects of changing ambient temperature on metabolic, heart, and ventilation rates during steady state hibernation in golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Physiol. Biochem. Zool.* **74**, 714–23.
- Zosky, G.** (2002). The parasympathetic nervous system: its role during torpor in the fat-tailed dunnart (*Sminthopsis crassicaudata*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **172**, 677–684.

- Zosky, G. R. and Larcombe, A. N.** (2003). The parasympathetic nervous system and its influence on heart rate in torpid western pygmy possums, *Cercartetus concinnus* (Marsupialia: Burramyidae). *Zoology (Jena)*. **106**, 143–50.
- Zucker, I. and Licht, P.** (1983). Seasonal variations in plasma luteinizing hormone levels of gonadectomized male ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Biol. Reprod.* **29**, 278–85.

Annexes

Hormonal profiles and energy substrates during the annual life cycle of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*)



Mathieu WEITTEN¹, Marie QUILLE¹, Jean-Patrice ROBIN¹, Paul PEVET², Caroline HABOLD¹

¹Université de Strasbourg, IPHC-DEPE, 23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

¹CNRS, UMR 7178, 23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

²CNRS, Département de Neurobiologie des Rythmes, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR-3212, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France

✉ mathieu.weitten@iphc.cnrs.fr



Introduction

Hibernation in food-storing animals is characterized by an alternance of fasting vs hyperphagia periods. This leads to drastic changes in energy balance and thus, in circulating levels of metabolites and hormones. While changes in classic hormones' profiles such as insulin and glucagon are relatively well described, much less is known concerning the variation levels of more recently identified hormones such as adipokines (widely involved in the control of intermediary metabolism), produced by the white adipose tissue (WAT).

This study aims to measure changes in the plasma level of the adipokines: leptin and adiponectin, during the different phases of the annual cycle in the Syrian hamster.

Materials and methods

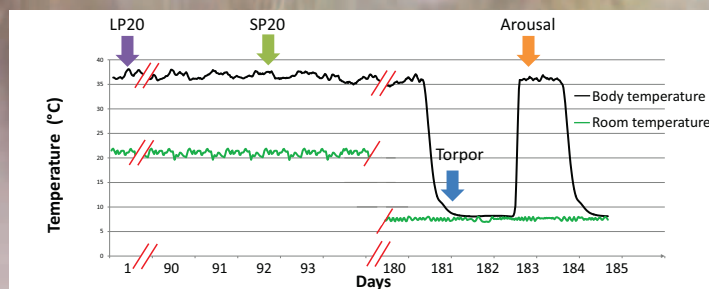
Experiments were performed on 26 male Syrian hamsters coming from the Chronobiotron (Strasbourg, France).

Hamsters were implanted intraperitoneally with a temperature sensor (IButton®) to monitor changes in body temperature (reflecting the different phases of hibernation). Animals were then randomly distributed in the following experimental groups:



Room temperature	20°C	8°C
Long photoperiod (Light from 4am to 6pm)	LP20 (n=8)	
Short photoperiod (Light from 8am to 6pm)	SP20 (n=8)	Torpor (n=5) Arousal (n=5)

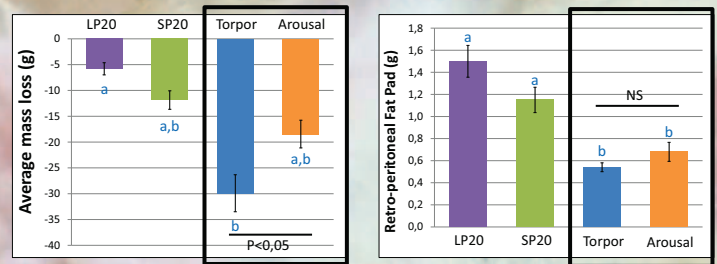
These groups reflect at least partly the annual cycle of hamsters.



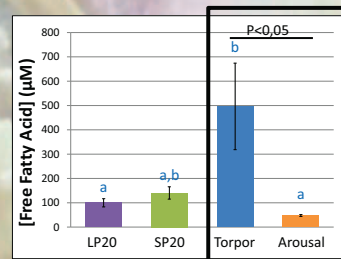
The animals were euthanized after 6 weeks in the different experimental conditions. Hibernating animals in conditions of SP & RT of 8°C were euthanized either in early torpor or arousal. Blood was collected for measurements of concentrations of hormones and metabolites. The mass of the retroperitoneal adipose tissue was considered as an index of adiposity.

Results

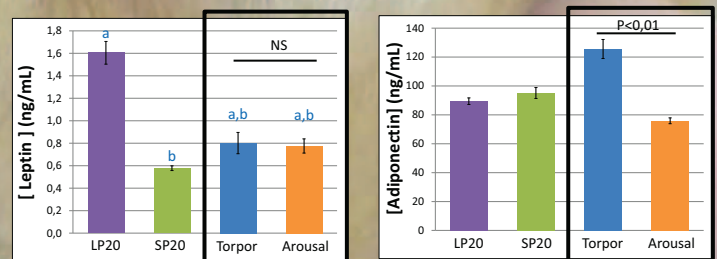
The results are represented $\pm$ SEM. Values with different letters are statistically different ($p < 0.05$). At first, a comparison between all 4 groups was performed. Secondly, considering the time scale difference between the LP20-SP20 and Torpor-Arousal groups, the statistical analysis was then focused on the 2 latter groups.



The retro-peritoneal WAT mass decreased together with body mass during hibernation.



The plasma concentration of free fatty acids, which is a marker of lipid reserves' use, increased in torpor but decreased at arousal.



Leptinemia decreased during the SP phase, in parallel with fat mass. Adiponectin plasma level decreased at arousal compared to the torpid state.

Conclusion

This study describes for the first time changes in adiponectin levels during hibernation, characterized by an increase in torpor and a decrease at arousal. This result suggests that adiponectin could be involved in the regulation of substrate utilization during torpor, through the stimulation of fatty acid oxidation.

Metabolic state of Syrian hamster during hibernation cycle:

Focus on Adiponectin



Mathieu Weitten¹, Jean-Patrice Robin¹, Hugues Oudart¹, Paul Pévet², Caroline Habold¹

¹ Université de Strasbourg, CNRS UMR 7178 IPHC-DEPE, 23 rue Becquerel 67087 Strasbourg, France

² CNRS, Département de Neurobiologie des Rythmes, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR-3212, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France

Major targets and biological actions of adiponectin

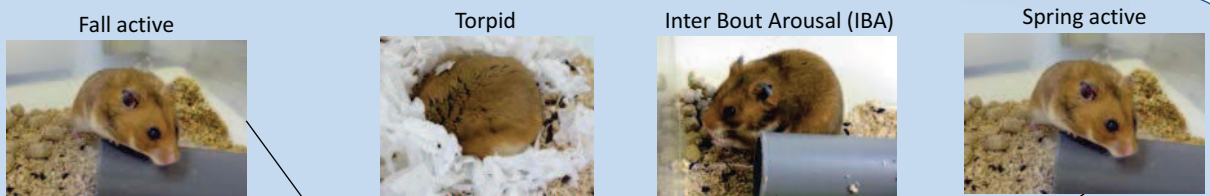
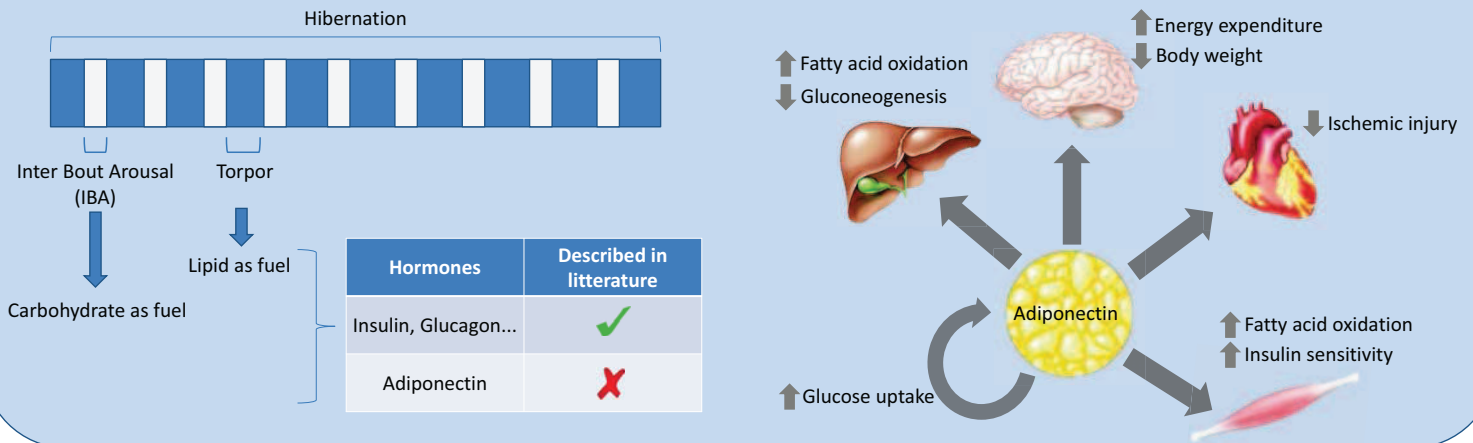
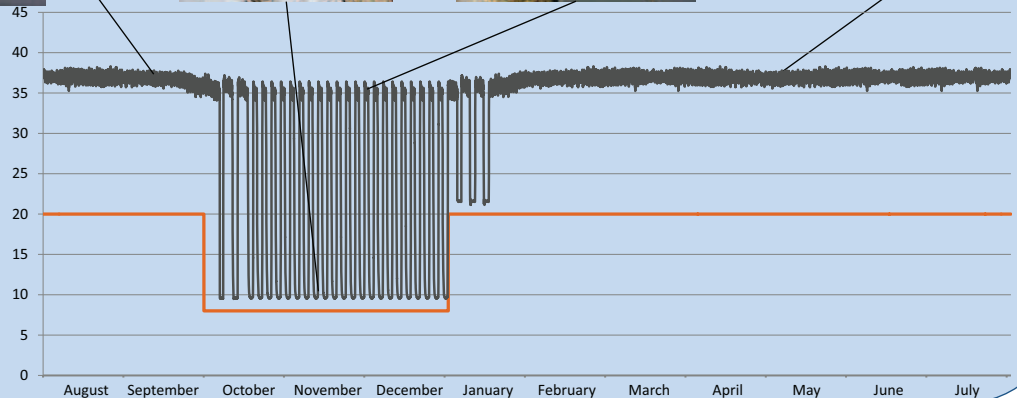
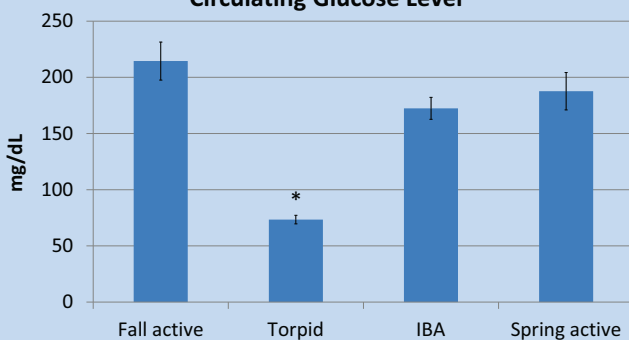


Diagram showing the annual cycle of Syrian hamsters in lab environment with respect to animal appearance and body temperature.

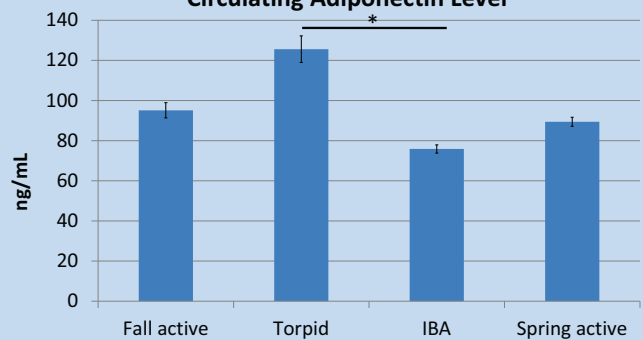
The graph shows a simulation of body temperature tracings (grey line) and ambient temperature (orange line).



Circulating Glucose Level



Circulating Adiponectin Level



* = p<0.05 One-way ANOVA post-hoc Bonferroni

✓ This study describes for the first time changes in adiponectin levels during hibernation, characterized by a decrease in inter bout arousal compared to torpor.

✓ This results suggests that adiponectin could be involved in the regulation of substrate utilization during hibernation.

The role of lipids and proteins in the diet of common hamsters (*Cricetus cricetus*) on hibernation and reproductive success

Weitten Mathieu¹, Robin Jean-Patrice¹, Habold Caroline¹

¹University of Strasbourg, IPHC, 23 rue Becquerel 67087 Strasbourg France, ¹CNRS, UMR7178, 67087 Strasbourg, France



Program 10.10

Introduction

Hibernation is an effective strategy used by endotherms to cope with seasonal decline in food resources. The energy savings achieved by hibernation depends on the duration and the depth of torpor bouts. Long and deep torpor bouts allow animals to have a better body condition at emergence, on which greatly depend reproductive performances. Although this is a crucial point in an evolutionary perspective, the effect of food quality (lipid and protein content) on hibernation and reproductive success has not yet been fully investigated. In this study we evaluated such an effect in female European hamsters and their pups.

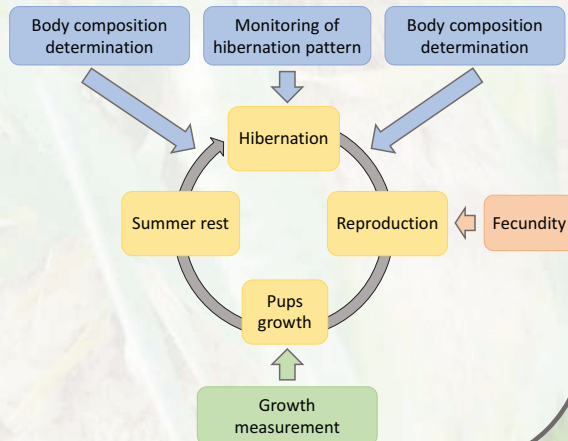
Materials & Methods

Experiments were performed on 2 groups of hamsters and their litters fed with two diets (L-/P+ and L+/P-) differing respectively in lipid (5 vs 10%) and protein (19 vs 13%) contents, but similar in carbohydrate (55 vs 57%) and energy contents (17100 vs 17700 J/g). All animals were fed *ad-libitum* with either L-/P+ or L+/P- diet since the beginning of the summer rest period for adults and since weaning for pups.

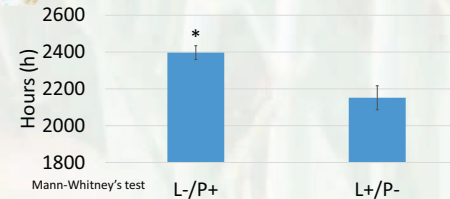
Group size

Groups	Hibernation/ Body composition	Fecundity	Pups' growth	
			Males	Females
L-/P+	9	8	28	28
L+/P-	8	6	11	13

Conducted experiments

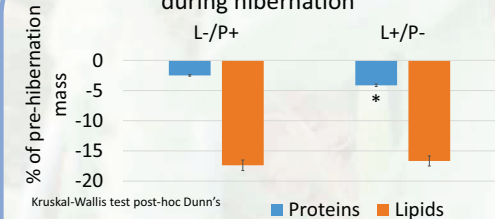


Time spent in torpor
(body temp <32°C)



Hibernating L-/P+ hamsters spent more time in torpor (12%) than L+/P- hamsters ($p=0.015$).

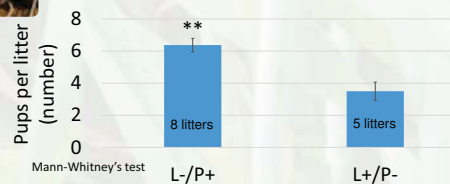
% of lipid and protein mass loss
during hibernation



Protein loss in the L-/P+ group was nearly 2-fold lower than in the L+/P- group ($p<0.05$). Lipid loss was similar between groups.



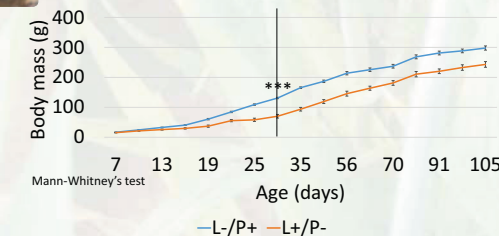
Fecundity



In the L-/P+ group, fecundity (number of weaned pups per litter) was grossly 2-fold higher than in the L+/P- group ($p=0.005$).

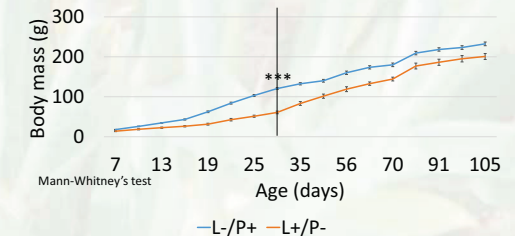


Male pups



Female and male pups from the L-/P+ group showed an earlier and sharper increase in body mass than in the L+/P- group. The differences appeared during the pre-weaning period and were not compensated after weaning (symbolize by solid line).

Female pups



Conclusion

We show here that gross-food quality influences both hibernation and next reproduction and that **a low-fat/high-protein diet is the best compromise**: females fed such a diet had the best hibernation quality by spending more time in torpor and minimizing protein loss during hibernation. They also had the best reproductive success. Such results are important to consider in the frame of the adaptation and survival of the species to their changing environment.

In a next step we will determine the exact contribution of lipids and proteins according to their composition on both hibernation and/or reproductive success, and ultimately on fitness.

Adaptations métaboliques et influence du régime alimentaire chez un hibernant 'food-storing'

Résumé

Cette thèse présente les adaptations spécifiques des hibernants 'food-storing' qui s'alimentent au cours de l'hibernation, et les conséquences de la qualité du régime alimentaire sur leur cycle annuel. Tandis que les espèces 'fat-storing' jeûnent pendant toute l'hibernation, les 'food-storing' alternent jeûnes courts et réalimentations. L'adiponectine stimulerait la lipolyse pendant l'hibernation contribuant ainsi à la cétogenèse. Le maintien d'un système digestif fonctionnel conduisant à la sécrétion d'incrétines, permet l'absorption optimale de nutriments lors des courtes euthermies inter-torpeurs. Une absorption accrue de glucose en particulier permettrait de restaurer la glycémie et les réserves de glycogène. Par ailleurs, un régime appauvri en protéines et enrichi en lipides induit un engraissement augmenté en période pré-hibernatoire provoquant une moindre utilisation de la torpeur donc une perte de masse accrue lors de l'hibernation, et une baisse du succès reproducteur.

Mots-clés : hibernation, hamsters, hormones, métabolisme énergétique, absorption intestinale, reproduction, adipokines, incrétines, hormones pancréatiques.

Résumé en anglais

This thesis presents the specific adaptations of food-storing hibernators that feed during hibernation, and the impact of diet quality on their annual cycle. In contrast to the fat-Storing species which fast during hibernation, the food-storing presents metabolic responses to an alternation of short fasting phases and hyperphagia. These responses involve one hand use of fat reserves during hibernation contributing to ketogenesis, which would be induced by adiponectin. On the other hand, maintaining a functional digestive system leading to the secretion of incretins, permits optimal nutrient absorption in the short inter-torpor euthermia. Increased glucose uptake in particular would restore body reserves to spare. Moreover, a lean protein diet enriched in fat and induces increased in body mass in pre-hibernation period causing reduced use of torpor thus an increased loss of mass during hibernation, and decreased reproductive success.

Key-words: hibernation, hamsters, hormones, energetic metabolism, intestinal absorption, reproduction, adipokines, incretins, pancreatic hormones.