

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**CAPACITÉ DE THERMOGENÈSE ET FONCTIONS
MITOCHONDRIALES DANS UN CONTEXTE
D'ACCLIMATATION AU FROID CHEZ UN PASSEREAU
RÉSIDENT**

THÈSE PRÉSENTÉE COMME EXIGENCE PARTIELLE DU DOCTORAT EN BIOLOGIE
EXTENSIONNÉE DE L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

MYRIAM MILBERGUE

DÉCEMBRE 2018

Composition du jury :

Christian Nozais, président du jury, Université du Québec à Rimouski

Pierre Blier, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski

François Vézina, codirecteur de recherche, Université du Québec à Rimouski

Jean-François Giroux, examinateur interne, Université du Québec à Montréal

Loic Teulier, examinateur externe, Université Claude Bernard Lyon 1

Dépôt initial le 15 janvier 2018

Dépôt final le 14 décembre 2018

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

REMERCIEMENTS

La fin d'une chose vaut mieux que son commencement paraît-il. Et bien voyez-vous, au début de ce projet je ne voyais que l'immense montagne de travail qui était devant moi. Je me suis souvent demandée si j'allais en venir à bout tellement la tâche paraissait grande. Malgré les nombreuses difficultés rencontrées durant mon doctorat, même si les choses ne se sont pas passées comme prévues, ma plus grande fierté est d'avoir persévérer et été jusqu'au bout du défi que je m'étais donné. Quelle satisfaction de pouvoir maintenant apprécier l'aboutissement de 6 ans de travail ! La fin d'une chose, une page qui se tourne mais aussi le temps de remercier.

Je suis profondément reconnaissante pour les superviseurs de thèse que j'ai eu la grâce d'avoir. Pierre et François, je vous remercie sincèrement tous les deux d'avoir assez cru en moi pour m'accorder le privilège de travailler avec vous. Merci d'avoir été des superviseurs présents, attentifs, disponibles et francs. Merci de m'avoir permis de bénéficier de votre expertise, de m'avoir coachée, supportée, d'avoir investi temps et argent pour que je mène à terme ce projet. Merci d'avoir été si disponible (même débordé, même dernière minute!) merci pour votre constant soutien et vos encouragements.

Je suis également reconnaissante envers tous mes collègues et ex-collègues de l'UQAR, Magali, Karine, Fanny, Lyette, Audrey, Bernard, Félix, Enrique. Reconnaisante pour votre aide, vos conseils avisés, pour les moments de partage, les blagues, les discussions, les repas, les cartes

d'anniversaire et les petites attentions (clin d'œil à Audrey). Les moments où on s'est partagé nos peines, nos joies, ce qui nous décourageait ou nous motivait. Je m'estime heureuse d'avoir eu une si bonne ambiance de labo!

Merci à tous ceux qui m'ont aidé dans ce projet. Je remercie tout particulièrement Véronique Desrosiers qui a été une aide si précieuse! Cela a été un véritable plaisir de travailler avec toi qui était toujours positive et douce. Merci à Jonathan Coudé et Steven Ouellet que j'ai souvent dérangé quand j'avais besoin de produits ou de matériel pour le labo. Un grand merci à Gaël Lafenêtre, Mikael Jaffre et Aymeric Bodin pour le transport à Macpès et votre aide si précieuse dans la capture des mésanges! Merci à Alain Caron que j'ai aussi souvent dérangé pour bénéficier de ses conseils pour mes analyses statistiques.

Merci enfin à ma famille, surtout à mon père qui a toujours investi et cru en moi et m'a donné la possibilité de poursuivre des études universitaires et de partir à l'étranger. Merci aussi à ma famille de cœur, celle de Rimouski, du Québec et celle de la France. J'ai vécu tellement de choses avec vous tous durant toutes ces années au Québec! Merci d'avoir été un soutien spirituel, émotionnel, d'avoir été présent et de m'avoir encouragée et accompagnée dans les moments cool comme dans les moments moins cool. Merci à toi Mike pour ton amitié, ton soutien et tes encouragements qui m'ont fait tellement de bien! Merci à Micheline, Solange, pasteur Michael et Darlene, Manon, René, Chance et Émilie, pasteur Désiré, Chantale, Tim et Sully, pasteur David, et tous les autres que je ne citerai pas mais qui se reconnaîtront comme ma

famille de cœur ici au Québec! Merci à toi mon cher Soun, pour ton soutien, tes encouragements, la façon dont tu as pris soin de moi dans les derniers jours de la rédaction. Merci de m'avoir conseillée, motivée et de m'avoir aidée à finaliser ma bibliographie alors qu'il ne me restait pas assez de temps, quelques jours avant mon dépôt initial ! Merci enfin et surtout à une personne très spéciale et très chère sans qui je n'aurais rien pu faire.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiv
Liste des abréviations.....	xvi
Résumé.....	xvii
Abstract.....	xix

INTRODUCTION GENERALE.....1

I.1. L'endothermie chez les Vertébrés.....	1
I.1.1 Caractéristiques générales.....	1
I.1.2 Défis de l'endothermie.....	2
I.2. La chaleur endogène des endothermes.....	5
I.2.1 Voies de production de la chaleur.....	12
I.3. Acclimatation hivernale chez les oiseaux résidents.....	12
I.3.1 Variations métaboliques et prise de masse.....	13
I.3.2 Intensité métabolique.....	16
I.4. Ajustements à l'échelle cellulaire en réponse au froid.....	19
I.4.1. La mitochondrie, déterminante dans le métabolisme énergétique.....	20
I.4.2. Flexibilité fonctionnelle des fonctions mitochondriales en réponse au froid.....	22
I.5. Présentation de l'étude.....	24
I.5.1 Hypothèses et prédictions.....	26
I.5.2. Méthodologie générale.....	26

CHAPITRE I

Des muscles développés sont avantageux mais non indispensables pour augmenter la capacité thermogénique chez les oiseaux de petite taille.....29

1.1 Résumé.....	32
1.2 Abstract.....	33
1.3 Introduction.....	34
1.4 Material and methods.....	36
1.4.1 <i>Birds collection and acclimation</i>	36
1.4.2 <i>BMR and M_{sum} measurement</i>	37
1.4.3 <i>Organ collection</i>	38
1.4.4 <i>Statistical analysis</i>	39
1.5 Results.....	43
1.6 Discussion.....	46
1.7 Acknowledgements.....	54

CHAPITRE II

De quelles façons les fonctions mitochondriales sont-elles impliquées dans la capacité thermogénique et le métabolisme basal chez des oiseaux de petite taille?.....55

1.1 Résumé	58
1.2 Abstract.....	59
1.3 Introduction	60
1.4 Material and methods.....	63
1.4.1 <i>Animals</i>	63
1.4.2 <i>BMR and M_{sum} measurement</i>	64
1.4.3 <i>Permeabilization of hepatocytes and muscles fibers</i>	64
1.4.4 <i>Mitochondrial respiratory measurements</i>	65
1.4.5 <i>CCO and CS activity assays in liver and pectoralis muscle homogenates</i>	66
1.4.6 <i>Proteins content quantification</i>	67

1.4.7	<i>Statistical analysis</i>	67
1.5	Results.....	68
1.5.1	<i>Markers of mitochondrial aerobic capacity</i>	68
1.5.2	<i>Mitochondrial respiration</i>	68
1.5.3	<i>BMR, M_{sum} and mitochondrial activity</i>	70
1.6	Discussion.....	78
1.6.1	<i>Markers of mitochondrial aerobic capacity</i>	78
1.6.2	<i>Mitochondrial respiration</i>	79
1.6.3	<i>BMR, M_{sum} and mitochondrial activity</i>	82
1.7	Acknowledgements.....	84
1.8	Supplementary material.....	85

CONCLUSION GÉNÉRALE.....86

C.1	Hypothèse 1.....	89
C.2	Hypothèse 2.....	92
C.3	Synthèse générale.....	96
C.4	Critiques de l'étude.....	98
	C.4.1.Originalité et pertinence.....	98
	C.4.2.Limites du projet.....	100
C.5	Perspectives.....	102

RÉFÉRENCES.....107

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1: Pourcentages d'augmentation du BMR ou du M_{sum} (non corrigés pour la masse) en hiver comparativement à l'été ou au printemps (Naturel: N) ou au froid comparativement au chaud (Expérimental: E) chez différentes espèces de petits passereaux.....	15
Tableau I.2: Variation saisonnière (hiver/été ou printemps) ou expérimentale (froid/thermoneutralité) de la masse du muscle pectoral et du M_{sum}	17
Table 1.1: Least square means (\pm s.e.m) and differences between cold (-10°C: C) and thermoneutral (27°C: T) treatments for body composition variables in black-capped chickadees. Units are in grams except for food intake (g/day). Least square means (\pm s.e.m) and differences between cold (-10 °C: C) and thermoneutral (27 °C: T) treatments for body composition variables in black-capped chickadees. Units are in grams except for food intake (g/day).....	42
Table 1.2: Effects of thermal treatments, body mass on BMR and M_{sum} and least square means (\pm s.e.m) per treatment.....	43
Table 1.3: Correlations between BMR and body composition. Results are from final ANCOVA models, including lean dry mass of organ and treatment as variables.....	47
Table 1.4: Correlations between M_{sum} and body composition. Results are from final ANCOVA models, including lean dry mass of organ and treatment as variables. All interactions were non-significant.....	52

Table 2.1: Effect of thermal treatments and body mass on CS and CCO activity. Values are means \pm s.e.m.....	69
Table 2.2: Effect of treatments and body mass on mitochondrial leak, CI and OXPHOS in the liver. Values are means \pm s.e.m. C: cold, T: thermoneutral.....	71
Tableau 2.3: Influence of mitochondrial parameters in pectoralis muscles on M_{sum} . The interactions Treatment*Mass were non significant in all ANCOVA models.....	74
Tableau 2.4: Influence of mitochondrial parameters in the liver and BMR. The interactions Treatment*Mass were non significant in all ANCOVA models except for CCO ($F_{1,28} = 5.2$, $P < 0.05$).....	77
Table 2.S1: Effect of treatments and body mass on mitochondrial leak, CI and OXPHOS in the pectoralis muscle. Values are means \pm s.e.m.....	85

LISTE DES FIGURES

Figure I.1: Perspective thermodynamique de la dépense énergétique. Diagramme modifié d'après Lowell et Spiegelman, 2000.....	6
Figure I.2: Représentation schématique de chaîne de transport d'électrons mitochondriale (Divakaruni et Brand, 2011).....	21
Figure I.3: Mésange à tête noire dans son milieu naturel.....	27
Figure 1.1. Relationships between BMR and body mass or lean dry mass of skeletal muscles in black-capped chickadees: (a) body mass, (b) total lean dry muscle mass (including bones), (c) lean dry pectoralis muscle mass (filled circles: 27°C, open circles: -10°C).....	45
Figure 1.2. Relationships between M_{sum} and body mass and lean dry mass of skeletal muscles in black-capped chickadees: (a) body mass, (b) total lean dry muscle mass (including bones), (c) lean dry pectoralis muscle mass (filled circles: 27°C, open circles: -10°C).....	50
Figure 2.1: Effect of body mass and treatment on CS activity in the pectoralis muscle (-10°C: open circles; 27°C: filled circles).....	69
Figure 2.2: Relationships between body mass and liver mitochondrial parameters: (A) leak respiration rate per mg of liver normalized by CS, (B) total CI respiration rate. Cold: open circles, thermoneutral: filled circles.....	72

Figure 2.3: Relationships between mitochondrial leak in pectoralis muscle and M_{sum} . (A) leak respiration rate per mg of tissue, (B) leak respiration rate normalized by CS activity (C) total leak respiration rate, (-10°C: open circles; 27°C: filled circles).....76

Figure 2.4: Relationships between mitochondrial respiratory parameters in the liver and BMR: (A) CI respiration rate per mg of tissue, (B) CI respiration rate normalized by CS (C), total CI respiration rate, (10°C: open circles; 27°C: filled circles).....77

Table 2.S1: Effect of treatments and body mass on mitochondrial leak, $OXPHOS_{CI}$ and $OXPHOS_{CI+CII}$ in the pectoralis muscle. Values are means \pm s.e.m.....85

Figure C.1: Représentation schématique des trois mécanismes opérant dans les fibres musculaires et étant potentiellement à l'origine d'une thermogénèse.....104

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ANOVA: analysis of variance

ATP: adénosine tri-phosphate

BMR: basal metabolic rate

CCO: cytochrome C oxidase

CPT: carnitine O-palmitoyltransférase

CS: citrate synthase

ETS: electron transport chain

FCCP: Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone

HOAD: 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase

MMR: maximal metabolic rate

M_{sum} : summit metabolism

NST: non shivering thermogenesis

OXPHOS: oxidative phosphorylation

RMR: resting metabolic rate

ROS: reactive oxygen species

SDA: specific dynamic action

TAB: tissu adipeux brun

(av) UCP: (avian) uncoupling protein

RÉSUMÉ

Les oiseaux de petite taille comme les passériformes sont des organismes endothermes, c'est à dire capables de produire une chaleur endogène indépendamment de la température du milieu environnant, contrairement aux espèces ectothermes. Cette capacité leur permet de vivre en hiver dans les latitudes nordiques, supportant ainsi un important refroidissement de la température ambiante tout en maintenant leur température interne élevée. Ceci est cependant un défi énergétique de taille étant donné l'importante perte de chaleur causée par ces conditions externes et favorisée par leur petite taille. Deux mécanismes principaux ont jusqu'alors été avancés pour expliquer comment ces oiseaux répondent à ce besoin de thermogénèse accru en hiver: la thermogénèse par frissonnement musculaire ou la thermogénèse sans frissonnement, induite par des cycles métaboliques futiles favorisant une production de chaleur. Le frissonnement est reconnu comme étant le mécanisme universel de thermogénèse chez les oiseaux et les mammifères. Ceci fait donc des muscles un acteur majeur dans la réponse thermogénique au froid. C'est pourquoi, la variation de masse de cet organe a été fréquemment étudiée dans un contexte d'acclimatation au froid. Une augmentation de la masse des muscles a été plusieurs fois observée et associée à l'augmentation de la capacité de thermogénèse. Cependant, des évidences récentes issues de plusieurs études suggèrent l'existence d'une augmentation de cette capacité sans développement parallèle de la masse musculaire chez des passereaux acclimatés au froid. Cette incohérence au sujet du rôle de la masse des muscles dans l'augmentation de la capacité thermogénique remet en question la nécessité du développement musculaire dans la réponse au froid et suggère qu'il y aurait d'autres mécanismes en jeu.

Nous avons ainsi émis l'hypothèse, dans le *chapitre 1* que, même si une musculature développée peut être avantageuse en terme de production de chaleur indépendamment de la température, le développement de la masse musculaire n'est pas un prérequis à une amélioration de la capacité thermogénique pendant l'acclimatation au froid chez les oiseaux. Nos résultats ont confirmé cette hypothèse, révélant une capacité de thermogénèse (M_{sum}) de 20% supérieure chez des mésanges à tête noire (*Parus atricapillus*) acclimatées en captivité au froid ($-10^{\circ}C$), comparativement à celles acclimatées à thermoneutralité ($27^{\circ}C$), ceci en l'absence d'une augmentation de la masse des muscles squelettiques au froid. Nous avons donc conclu qu'un gain de masse musculaire n'est pas un prérequis obligatoire à l'acquisition d'une meilleure endurance au froid, bien que les individus avec une musculature plus développée aient été avantagés pour la thermogénèse par frissonnements indépendamment de la température. L'acquisition d'une meilleure capacité à produire de la chaleur se ferait potentiellement au moyen d'un ajustement de l'intensité métabolique des tissus, probablement musculaires, au travers de l'activation de fonctions cellulaires.

Dans le *chapitre 2*, nous avons fait l'hypothèse que l'augmentation de la capacité à produire de la chaleur lors de l'acclimatation au froid chez les oiseaux de petite taille impliquerait une hausse de la fuite de protons et/ou de la phosphorylation oxydative et que ces ajustements mitochondriaux pourraient être réalisés soit par un changement quantitatif (densité en mitochondries) soit/et par un ajustement qualitatif (propriétés intrinsèques des mitochondries) des mitochondries. La mitochondrie est en effet un élément prépondérant dans le métabolisme énergétique, puisqu'elle est le siège de près de 90% de la respiration cellulaire. Une partie de cette respiration correspond à la phosphorylation oxydative et à la respiration induite par un cycle futile, la fuite de protons au niveau de la membrane interne des mitochondries. La phosphorylation oxydative génère des molécules énergétiques d'ATP et de la chaleur alors que la fuite de protons ne génère que de la chaleur. Ces deux mécanismes pourraient par conséquent être stimulés en réponse au froid afin de répondre au besoin de thermogénèse. L'hypothèse de ce 2^{ème} chapitre a été partiellement confirmée. Nous avons démontré que les fonctions mitochondriales diffèrent quantitativement et qualitativement en réponse à l'acclimatation au froid des mésanges. Cependant, seulement certaines de ces fonctions co-varient avec la capacité thermogénique et les coûts de maintenance basale et selon un patron qui dépend de la température d'acclimatation et de la masse corporelle. Par conséquent, bien que les mécanismes exacts à l'origine d'une meilleure capacité à produire de la chaleur en réponse au froid nécessite clarification, notre étude suggère que cette capacité est néanmoins associée à des ajustements du métabolisme mitochondrial.

Mots-clés : acclimatation, froid, muscles, thermogénèse, respiration mitochondriale, oiseaux, fuite de protons.

ABSTRACT

Birds of small body size, such as passerines, are endothermic organisms, and thus are able to produce body heat endogenously and independently from variation in ambient temperature. This capacity allows them to winter at northern latitudes and withstand cold environments while preserving a high body temperature. This, however, represents a major energetic challenge given that their small body size accentuates heat loss. Two main mechanisms are thought to explain how small birds respond to the thermogenic requirements of winter: thermogenesis through muscular shivering or non-shivering thermogenesis, induced by futile metabolic cycles, which would improve heat production. Shivering is considered the universal thermogenic mechanism in mammals and birds. This makes skeletal muscles a major player in thermogenic responses to cold. Increases in skeletal muscle mass have indeed often been found to correlate with improvements of thermogenic capacity. However, recent evidences from different studies suggests that thermogenic capacity can be improved in response to cold without parallel muscle mass development in passerines. This discrepancy on the assumed role of muscle mass adjustments in improving thermogenic capacity challenges the common perception that birds must increase the size of their skeletal muscles during cold acclimatization and suggests that other mechanisms are involved.

We have hypothesized in *chapter 1* that, while larger muscles may benefit birds in terms of heat production independently from ambient temperature, an increase in muscle mass is not a prerequisite to improve thermogenic capacity during cold acclimation. Our results confirmed this hypothesis and showed that captive black-capped chickadees (*Poecile atricapillus*) living in the cold (-10°C) had a 20% higher thermogenic capacity (M_{sum}) than individuals acclimated to thermoneutrality (27°C) while skeletal muscle mass did not differ between treatments. We therefore concluded that muscle mass development is not an obligatory prerequisite for improving cold endurance, although individuals with larger muscles at both temperature did produce more heat by shivering. Improving heat production capacity could potentially be achieved by adjusting tissue metabolic intensity, likely in the muscles, through the activation of cellular functions.

In *chapter 2*, we hypothesized that small birds could be improving heat production capacity in the cold through increased proton leakage and / or oxidative phosphorylation and that these mitochondrial adjustments would involve quantitative (mitochondrial density) and / or qualitative adjustments (intrinsic properties) of the mitochondria. The mitochondrion is indeed a preponderant element in energy metabolism, since it is responsible for nearly 90% of cellular respiration. Part of this respiration results from oxidative phosphorylation and from respiration induced by a futile cycle, the leak of protons at the mitochondria inner membrane. Oxidative phosphorylation generates ATP energy molecules and heat while proton leakage generates only heat. Both mechanisms could therefore be up-regulated in response to cold in order to meet the need for

thermogenesis. The hypothesis of this second chapter has been partially confirmed. We have demonstrated that mitochondrial functions differ quantitatively and qualitatively in response to cold acclimation in chickadees. However, only some of these functions co-vary with thermogenic capacity and basal maintenance costs, with patterns depending on acclimation temperature and body mass. Therefore, although the exact mechanisms leading to improvement in heat production in response to cold still requires clarification, our study suggests that this ability is nevertheless associated with adjustments of mitochondrial metabolism.

Key words: acclimation, cold, muscles, thermogenesis, mitochondrial respiration, birds, proton leak.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I.1 L'endothermie chez les Vertébrés

I.1.1 Caractéristiques générales

L'endothermie est un trait caractéristique de deux groupes majeurs de vertébrés, les mammifères et les oiseaux. Ces organismes sont dit endothermes car ils produisent leur propre chaleur interne par des mécanismes métaboliques, chaleur qu'ils sont capables de conserver ou de libérer (McNab, 2002; Grigg et al., 2004; Clavijo-Baquet et Bozinovic, 2012). La température corporelle chez les mammifères et les oiseaux est en moyenne comprise entre 36 et 42°C (Hochachka et Somero, 2002; Ivanov, 2006). Dans une gamme limitée de températures ambiantes nommée zone de thermoneutralité et délimitée par la température critique minimale et maximale, la dépense énergétique au repos est indépendante de la température extérieure (Silva 2003; Hill et al., 2004). La dépense énergétique augmente lorsque la température ambiante est en dessous ou au-dessus des limites de cette zone de thermoneutralité: des mécanismes de thermorégulation sont alors mis en marche, soit pour diminuer la température corporelle si l'organisme tend vers l'hyperthermie, soit pour l'augmenter si elle tend vers l'hypothermie.

Par l'endothermie, ces organismes se sont affranchis d'une dépendance thermique à leur environnement, contrairement aux vertébrés ectothermes dont la chaleur corporelle dépend des apports extérieurs (Huey et Berrigan, 2001; Angilletta et al., 2010). Cette stratégie leur a donc donné la capacité de s'adapter à un éventail plus large d'environnements thermiques et ainsi la possibilité d'occuper une diversité géographique plus grande (Bennett et Ruben, 1979). Ils peuvent exploiter des environnements où la température ambiante est par exemple en dessous du point de congélation des fluides

corporels et ce sur une période prolongée. Par ailleurs, la température interne étant plus élevée, les enzymes sont plus efficaces et les réactions biochimiques s'effectuent plus rapidement (Hochachka et Somero, 2002; Koteja, 2004). Cela induirait par conséquent une capacité aérobie supérieure, autorisant chez les endothermes un niveau d'activité plus élevé (Bennett et Ruben, 1979): il est alors possible d'être actif la nuit, d'assimiler plus rapidement les nutriments, de se déplacer à une plus grande vitesse et donc de mieux échapper aux prédateurs et trouver plus rapidement des ressources alimentaires (Bennett, 1991; Grigg et al., 2004).

Tous les endothermes ne sont pas homéothermes et certains sont hétérothermes, c'est à dire que leur température interne peut varier de plusieurs degrés contrairement aux homéothermes dont la température demeure préservée dans une gamme étroite (Hochachka et Somero, 2002). Les humains sont par exemple des endothermes homéothermes puisque leur température corporelle demeure pratiquement constante (variation de 1 à 2° entre la nuit et le jour). En revanche, le dromadaire (*Camelus dromedarius*), en l'absence de stress thermique, présente une température interne journalière variant avec une amplitude de 2°C (homéothermie) mais lors d'une forte chaleur, il peut supporter une hyperthermie contrôlée, laissant sa température augmenter de 6°C (hétérothermie) (Bouâouda et al., 2014). Le champion sans conteste dans ce domaine est l'oryx (*Oryx leucoryx*) avec une variation de température interne allant de 1.5 à 7.5°C durant le jour (Ostrowski et al., 2003). L'hétérothermie est également utilisée chez les mammifères qui hibernent et les oiseaux qui utilisent la torpeur ou l'hypothermie pour économiser leurs réserves énergétiques (Geiser et Ruf, 1995).

I.1.2 Défis de l'endothermie

En résumé, un endotherme est caractérisé par sa capacité à produire et maintenir une chaleur interne à une certaine température, ceci quelles que soient les conditions extérieures

et évidemment dans les limites de sa capacité physiologique. Bien que cette stratégie adaptative s'accompagne d'avantages physiologiques majeurs, elle est également coûteuse en énergie. Ainsi, la dépense énergétique au repos des mammifères et des oiseaux est de 5 à 10 fois supérieure à celle des ectothermes pour une même masse corporelle et une même température ambiante (Nagy et al., 1999; Gillooly et al., 2001; Hill et al., 2004; Ivanov, 2006). Les endothermes, et surtout les homéothermes, doivent donc dépenser une grande partie de leur énergie dans la thermorégulation quand ils sont confrontés à de nettes variations de températures. Par exemple, la température ambiante peut varier drastiquement avec des écarts de plus de 30°C entre le jour et la nuit dans les milieux désertiques chauds qui abritent des espèces endothermes tel que le sirli du désert (*Alaemon alaudipes*) (Williams et Tieleman, 2000). En milieu marin, à cause de la conductivité thermique élevée de l'eau, une vingtaine de fois plus élevée que celle de l'air, les mammifères et les oiseaux doivent lutter contre une perte de chaleur constante et élevée, particulièrement lorsqu'ils se déplacent entre les eaux superficielles et les eaux plus profondes qui sont plus froides car moins exposées aux infrarouges (Kruuk et al., 1994; Liwanag et al., 2009; Liwanag, 2010; Teulier et al., 2012; Lewden et al., 2017). D'autre part, les espèces habitants dans des zones géographiques soumises à une saisonnalité marquée subissent des réajustements physiologiques plusieurs fois dans l'année afin de maintenir une température interne fonctionnelle. C'est le cas tout particulièrement lorsque cette saisonnalité comprend un hiver rigoureux avec des températures ambiantes descendant en dessous de 0°C. La contrainte thermique est alors plus longue que dans les cas qui viennent d'être cités précédemment.

Les mammifères ont à ce propos deux façons principales de supporter l'hiver. Ceux de grande taille restent pour la plupart actifs car ils bénéficient d'un ratio surface sur volume faible qui favorise la rétention de la chaleur (Schmidt-Nielsen, 1984). Ajouté à cela, les individus de grande taille ont un pelage plus fourni et une couche de tissu adipeux résultant de l'engraissement hivernal, augmentant ainsi l'isolation et donc la rétention de la

chaleur (Hart, 1956; Heldmaier, 1989; Alexander et al., 2015). Plus fréquente chez les mammifères de petite taille, la torpeur journalière (moins de 24h) ou l'hibernation (plusieurs jours ou semaines) consiste toutes deux à réduire les besoins énergétiques en ralentissant le métabolisme et ainsi en baissant la température interne en dessous de la température de consigne pour laquelle l'organisme peut être actif (Heldmaier et Ruf, 1992; Geiser et Ruf, 1995; Heldmaier et al., 2004). Chez les oiseaux, certaines espèces utilisent la torpeur ou l'hypothermie facultative comme stratégie d'économie d'énergie en hiver (Sharbaugh, 2001; Cooper et Gessaman, 2005; Lewden et al., 2014). Cependant, ce n'est pas la stratégie la plus répandue car la plupart des espèces d'oiseaux gardent une température corporelle journalière assez stable et élevée toute l'année (Whittow, 1998) comprise en moyenne entre 39 et 41°C (Prinzinger et al., 1991). Une autre stratégie est la migration, par laquelle ces organismes s'affranchissent des contraintes thermiques et alimentaires hivernales.

Pour les espèces résidentes demeurant actives en hiver aux latitudes nordiques, les conditions hivernales imposent un défi considérable d'un point de vue physiologique et surtout métabolique en raison des conditions environnementales très contraignantes. La ressource alimentaire est nettement restreinte et le raccourcissement de la durée du jour réduit le temps disponible pour la recherche alimentaire (Leihikoinen, 1987; Carey et al., 1978). De plus, l'accès à la nourriture peut être empêché par le couvert neigeux (Dawson et Carey, 1976), alors que la demande énergétique pour la thermorégulation augmente en conséquence de la baisse de température ambiante (Cooper, 2000; Broggi et al., 2005). L'hiver serait d'ailleurs pour plusieurs espèces de petite taille la saison où la dépense énergétique est la plus élevée (Swanson, 2010). Lutter contre une surchauffe ou un refroidissement léthal de la température interne afin de maintenir des capacités physiologiques fonctionnelles est par conséquent tout le défi des endothermes. Cette étude va porter spécifiquement sur l'une des deux faces de cette lutte, celle de la réponse au froid chez les espèces résidentes.

I.2 La chaleur endogène des endothermes

I.2.1 Voies de production de la chaleur

La genèse de chaleur chez les endothermes, ou thermogenèse, est issue de différentes activités métaboliques. Lowell et Spiegelman (2000) ont défini la dépense énergétique totale en 3 catégories: (1) la dépense énergétique obligatoire, qui découle de réactions métaboliques exothermiques indispensables pour le bon fonctionnement et l'intégrité des cellules et des tissus; (2) l'activité physique et (3) la thermogenèse adaptative (Figure I.1). Cette dernière correspond pour ces auteurs à la chaleur générée en réponse à la variation de la température ambiante ou à la digestion. Nous présenterons cependant la digestion comme faisant partie de la thermogenèse basale dans le reste de cette étude.

I.2.2.a. Dépense énergétique obligatoire à l'origine d'une thermogenèse basale

Le métabolisme est défini comme l'ensemble des réactions biochimiques impliquées dans l'absorption, la transformation et l'allocation de l'énergie (Brown et al., 2004). Il est nommé basal lorsqu'il est mesuré chez un organisme au repos (Swanson, 2010). Le taux métabolique d'un animal correspond donc au taux de consommation énergétique, c'est à dire la vitesse à laquelle un animal converti l'énergie chimique ingérée en un travail externe ou en chaleur, qui est une forme d'énergie désordonnée (Mueller et Diamond, 2001; Hill et al., 2004). En effet, la conversion de l'énergie chimique en travail n'étant jamais totalement complète, efficace, elle mène nécessairement à une libération de chaleur. D'après les lois de la thermodynamique, la quantité totale d'énergie dans un système ne change pas, soit elle est transformée en travail, soit en chaleur. Ainsi, quand aucun travail externe (chimique ou mécanique) n'est réalisé, l'énergie est dissipée sous forme de chaleur. Le taux métabolique correspond donc à la vitesse à laquelle vit un organisme (Hulbert et Else, 2000). Chez les

vertébrés, il s'étend sur une gamme de l'ordre du 10^7 (Mueller et Diamond, 2001), ceci s'expliquant en grande partie par le fait que le métabolisme est dépendant de la masse corporelle (Schmidt-Nielsen, 1984 ; Hochachka et Somero, 2002). La respiration cellulaire, qui est à la base même du métabolisme, se fait à partir d'oxygène et d'un substrat énergétique, soit des glucides, des lipides ou des protéines. Cette réaction a pour produit du dioxyde de carbone, de l'eau, de la chaleur et une énergie chimique sous forme de molécules d'ATP qui sera utilisée dans un travail donné (Lowell et Spiegelman, 2000; Hill et al., 2004). Il a été estimé, en faisant une moyenne de la contribution des paramètres

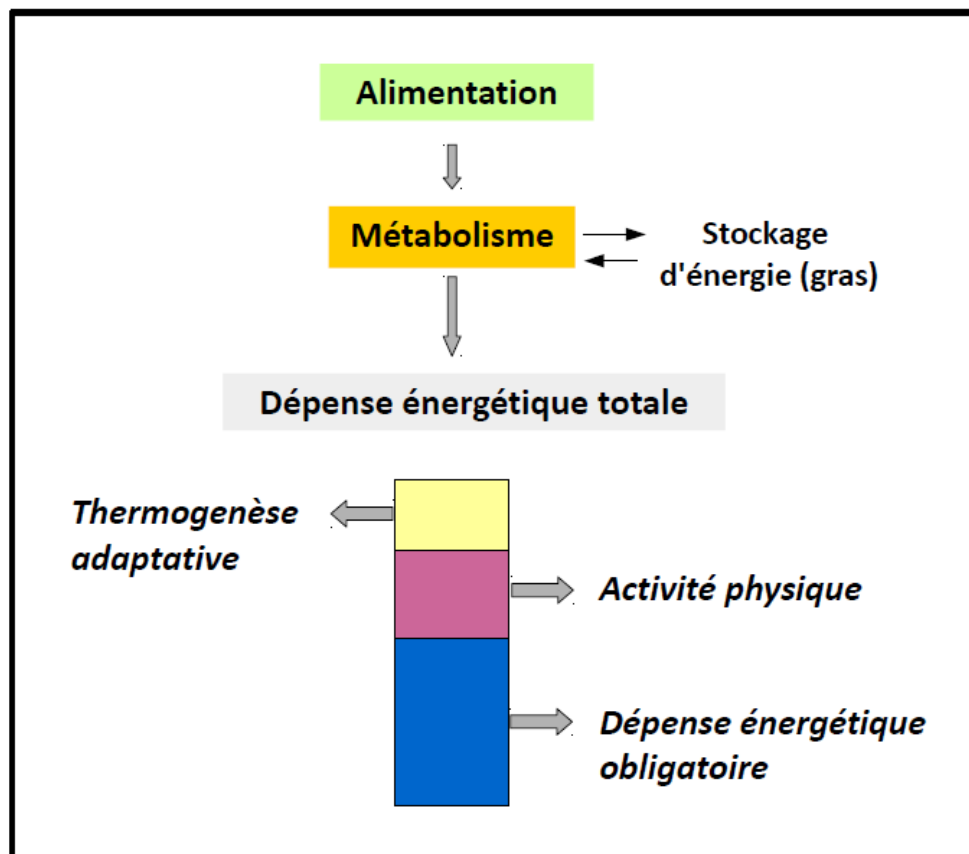


Figure I.1: Perspective thermodynamique de la dépense énergétique. Diagramme modifié d'après Lowell et Spiegelman, 2000.

suivants dans plusieurs tissus, que 10% du métabolisme au repos chez les mammifères est dû à la respiration non-mitochondriale, 20% à la consommation d'oxygène ayant lieu pour contrebalancer la fuite de protons au niveau de la membrane interne des mitochondries et 70% à la respiration cellulaire génératrice d'ATP, nommée phosphorylation oxydative (Rolfe et Brown, 1997; Hulbert et Else, 2000). En plus de la chaleur libérée par la respiration, les réactions impliquées dans le métabolisme et consommant de l'ATP vont libérer elles aussi de la chaleur car l'hydrolyse de l'ATP est une réaction exothermique (Rolfe et Brown, 1997; Hulbert et Else, 2000; Lowell et Spiegelman, 2000). Ces réactions sont par exemple l'action de l'actine-myosine ATPase et de la Ca^{2+} -ATPase durant les contractions du muscle cardiaque ou l'action des pompes Na^+/K^+ -ATPase au niveau de l'endothélium intestinal ou rénal ou encore la synthèse des protéines et d'acides nucléiques dans des tissus qui se développent. L'ensemble de cette chaleur générée va constituer la thermogénèse basale de l'organisme.

Thermogénèse induite par la digestion

La thermogénèse basale comprend également la thermogénèse induite par la digestion des aliments qui induit une rapide augmentation du métabolisme et ainsi une production importante de chaleur. Cette production est nommée action spécifique dynamique (SDA: specific dynamic action) (McCue, 2006; Secor, 2009). Il a été démontré que le jeûne pouvait faire diminuer le métabolisme au repos d'environ 40% alors que l'ingestion d'aliments entraîne une hausse de 25 à 40% du métabolisme chez les humains et les rongeurs (Lowell et Spiegelman, 2000). Chez des oiseaux de différentes tailles, du troglodyte familial (*Troglodytes aedon*) au manchot adélie (*Pygoscelis adeliae*), l'élévation du taux métabolique se fait en moyenne dans les 2h suivant l'ingestion d'aliments et revient à un niveau basal environ 12h plus tard, ce qui montre que la SDA est prolongée dans le temps (Secor, 2009). Le type, la quantité, la composition et la température de la nourriture

ainsi que d'autres éléments propres à l'organisme (taille, sexe, âge) et à son environnement (température) peuvent déterminer l'amplitude et la durée de réponse de la SDA. Ainsi, chez certaines espèces d'oiseaux, le métabolisme au repos est corrélé à la quantité ou au type de nourriture ingérée (Vézina et al., 2011; Barceló et al., 2017). Un ensemble de mécanismes seraient à l'origine de cette production de chaleur, tels que la mastication, la digestion par voie mécanique et chimique, le péristaltisme, l'absorption intestinale ainsi que le catabolisme des substrats ingérés (McCue, 2006; Secor, 2009). Toutes ces activités opérant durant la digestion et l'assimilation des nutriments contribueraient chacune à une production de chaleur interne. Parce que cette chaleur contribue à maintenir la température corporelle, le besoin d'utiliser le frissonnement durant la nuit diminue chez le pigeon lorsqu'il vient de s'alimenter (Rashotte et al., 1999). La SDA est par conséquent une autre forme de substitution thermique, c'est à dire que la chaleur dégagée par la SDA va remplacer une partie de celle produite par la thermorégulation (Enstipp et al., 2008; Swanson, 2010).

I.2.2.b. L'activité physique comme source de chaleur

Lorsque les organismes sont en mouvement, surtout durant la locomotion, le métabolisme augmente drastiquement, de plus de 10 fois le métabolisme basal chez certaines espèces (McKechnie et Swanson, 2010). Ceci est démontré par des études mesurant le taux métabolique maximal (maximal metabolic rate: MMR) par calorimétrie indirecte lors d'un effort intense lorsque la majorité des muscles locomoteurs travaillent à leur niveau maximal (Weibel et al., 2004; Wiersma et al., 2007; Dubois et al., 2016). La contraction musculaire associée à l'activité physique va générer une thermogénèse par hydrolyse d'ATP au niveau de l'actine-myosine ATPase et de la Ca^{2+} -ATPase (Saarela et al., 1995; Rolfe et Brown, 1997) et un cinquième seulement de l'énergie chimique disponible est alors convertie dans le travail de contraction, le reste étant dissipé sous forme

de chaleur (Hohtola, 2004). Ainsi, la chaleur libérée durant l'exercice est même réutilisée par certains endothermes en réponse au froid. Cette stratégie se nomme substitution thermique et fait référence à une diminution de la dépense énergétique due à la thermorégulation par "récupération" de la chaleur produite lors d'une activité locomotrice (Liwanag, 2010; Swanson, 2010). Cette stratégie a été mise en évidence chez de nombreuses espèces d'oiseaux et de rongeurs (Lovvorn, 2007), ainsi que chez certains mammifères marins pour lesquels une augmentation de la production de chaleur a été observée lors de la nage (Liwanag, 2010). Dans une étude chez la mésange à tête noire (*Poecile atricapillus*), il a été démontré que la chaleur produite durant la recherche alimentaire remplace une partie de la chaleur produite par le frissonnement (Cooper et Sonsthagen, 2007).

I.2.2.c. La thermogenèse adaptative

Thermogenèse induite par le frissonnement en réponse au froid

Le frissonnement musculaire est généralement considéré comme le mécanisme principal de production de chaleur lorsque la température ambiante est en dessous de la zone de thermoneutralité chez les mammifères et les oiseaux (Hart, 1962; West, 1965; Dawson et Carey, 1976; Hohtola et Stevens, 1986; Saarela et al., 1995; Hohtola et al., 1998; Marjoniemi and Hohtola, 1999; Hohtola, 2004). Le frissonnement étant avant tout une contraction involontaire de fibres musculaires, la thermogenèse associée au frissonnement est donc issue des mêmes processus cellulaires que ceux du muscle actif durant la locomotion (Hohtola, 2004). La thermogenèse s'effectue ainsi au travers de l'hydrolyse d'ATP et de la perte de chaleur inhérente à l'inefficacité de la phosphorylation oxydative. Chez les oiseaux de petite taille, les muscles pectoraux forment de 15 à plus de 30% de la masse corporelle (Swanson, 2010; Petit et al., 2014; Vézina et al., 2017) et représenteraient

le site principal de la production de chaleur par frissonnement (Swanson, 2010; Hohtola, 2004), bien que les muscles des jambes semblent y contribuer également de manière non négligeable (Stevens et al., 1986; Marjoniemi et Hohtola, 1999).

Thermogenèse sans frissonnements en réponse au froid

La thermogenèse sans frissonnements ou NST (non shivering thermogenesis) consiste en une production de chaleur n'impliquant pas de contractions musculaires. Bien qu'étudiée depuis longtemps (Kayser, 1929; Lee et Lardy, 1965; Snyder et al., 1991; Dawson et al., 1992; Oppenheimer et al., 1991; Marmonier et al., 1997), les variantes de la NST et leur fonctionnement nécessitent encore des recherches. Chez les mammifères, le tissu adipeux brun (TAB) est reconnu pour être un tissu majeur de thermogenèse. Ce TAB est particulièrement abondant chez les mammifères hibernants de petites tailles (rongeurs), chez les espèces hibernantes et chez les nouveaux-nés (Silva, 1995; Lowell et Spiegelman, 2000; Cannon et Nedergaard, 2004; Hill et al., 2004). La membrane interne des mitochondries du tissu adipeux brun contient en effet des protéines nommées « découplantes » ou UCPs (Ricquier et Bouillaud, 2000; Stuart et al., 2001; Silva, 2003; Cannon et Nedergaard, 2004; Dridi et al., 2004; Divakaruni et Brand, 2011). L'action de ces UCPs, surtout d'UCP-1, est de créer des fuites de protons au niveau de cette membrane, fuites allant à l'encontre du gradient généré par le système de transport d'électrons présente sur cette membrane. L'énergie est alors perdue sous forme de chaleur au lieu d'être transformée en ATP, produit final de la respiration oxydative (Lowell et Spiegelman, 2000; Golozoubova et al., 2001; Lanni et al., 2003). Chez les oiseaux, une thermogenèse sans frissonnement a également été mise en évidence depuis plusieurs décennies. Kayser (1929) a démontré une nette élévation du métabolisme chez des pigeons acclimatés au froid ayant pourtant subi une lésion à la colonne vertébrale afin de supprimer la capacité de frissonner. Les études de Saarela et Heldmaier (1987) et Saarela et al. (1995) montrent chez

cinq espèces de passereaux et chez la caille du Japon (*Coturnix coturnix japonica*) que plus la température baisse, plus le métabolisme et l'intensité du frissonnement dans le muscle pectoral augmentent. Cependant, à partir de -20°C , cette augmentation du métabolisme est découplée du frissonnement, suggérant l'existence d'une thermogenèse sans frissonnements. Deux mécanismes ont été avancés pour expliquer la présence d'une thermogenèse sans frissonnements chez les oiseaux (Duchamp et al, 1999).

Le premier implique une réduction de l'efficacité de synthèse de l'ATP dans le tissu musculaire, en favorisant un découplage de la phosphorylation oxydative par une fuite des protons (détails section I.4.1). Malgré l'absence de TAB chez les oiseaux, l'identification d'un homologue fonctionnel de l'UCP-3 mammalienne dans les muscles squelettiques a suggéré l'implication d'une UCP aviaire (avUCP) dans ce découplage en réponse au froid (Vianna et al., 2001; Talbot et al., 2004; Dridi et al., 2004; Teulier et al., 2010). Cependant, l'hypothèse selon laquelle l'avUCP aurait un rôle similaire dans la thermogenèse à celui observé chez les mammifères reste controversée. Bien qu'une augmentation de l'expression d'avUCP du muscle squelettique a été observée en réponse au froid dans certaines études (Raimbault et al., 2001; Toyomizu et al., 2002; Collin et al., 2003; Talbot et al., 2004; Teulier et al., 2010), d'autres montrent une absence de variation (Mujahid et al., 2005) et de plus en plus d'études suggèrent que cette avUCP ne serait finalement pas directement impliquée dans la production de chaleur (Walter et Seebacher, 2009; Teulier et al., 2010) mais probablement dans un autre mécanisme en lien avec la réponse au froid. Certaines études suggèrent que l'action d'avUCP dans l'acclimatation au froid contribueraient à la réduction de la production des ROS (Reactive Oxygen Species : espèces réactives de l'oxygène), prévenant ainsi de dommages néfastes causés aux cellules (Echtay et al., 2002; Talbot et al., 2004; Rey et al., 2010; Criscuolo et al., 2005). En contrepartie, la fuite de protons peut également s'effectuer par diffusion passive. La conductance protonique des membranes mitochondriales est dans ce cas dépendante de la composition lipidique de

celles-ci: plus la membrane sera riche en acides gras polyinsaturés, plus elle sera fluide et plus la conductance sera élevée (Porter et al. 1996; Brand et al., 2003; Hulbert et al., 2006)

Le deuxième mécanisme proposé est une augmentation de la consommation d'ATP mais à perte, sans que l'énergie soit convertie en travail. Cela s'effectuerait par le biais de la pompe Ca^{2+} -ATPase. Celle-ci, abondante dans le muscle squelettique et située sur la membrane du réticulum sarcoplasmique (RES), est responsable du transport de Ca^{2+} du cytosol vers la lumière du réticulum, durant la relaxation musculaire (De Meis et al., 2005). Ce mécanisme utilise l'hydrolyse de l'ATP dont une partie de l'énergie libérée sert au transport de ces molécules, l'autre partie étant dissipée sous forme de chaleur. Mais l'activité de cette pompe peut être découplée en favorisant une fuite de Ca^{2+} , entraînant ainsi le fonctionnement à perte de la pompe (De Meis, 2001; Hochachka et Somero, 2002).

I.3 Acclimatation hivernale chez les oiseaux résidents

Les conditions hivernales froides, comme nous l'avons énoncé précédemment, imposent un défi considérable aux organismes endothermes, surtout ceux de petite taille qui demeurent actifs, tels que les oiseaux résidents. Nous venons de voir que le maintien de la température corporelle dans un environnement qui se refroidit est réalisé et par l'activation de mécanismes physiologiques favorisant la production et la conservation de la chaleur (Liu et al., 2006; Swanson et Thomas, 2007). L'ensemble des ajustements physiologiques, en réponse à la variation d'un paramètre environnemental (photopériode, température, diète, précipitations, etc), est regroupé sous le terme d'acclimatation (Randall et al., 2002). Celle-ci maximise les chances de survie et le maintien des fonctions physiologiques, malgré les variations des conditions environnementales. Chez les oiseaux résidents de petites tailles, l'acclimatation hivernale en milieu froid correspond essentiellement à une réponse métabolique plus qu'à un ajustement saisonnier de l'isolation du plumage (Dawson et al., 1992; Saarela et al., 1995; O'Connor, 1996; Liknes and Swanson, 1996; Swanson, 2001;

Cooper, 2002). La température ambiante du milieu environnant serait par ailleurs le principal moteur à l'origine de la variation saisonnière du phénotype métabolique chez les passeraux résidents (Swanson et Vézina, 2015).

I.3.1 Variations métaboliques et prise de masse

L'un des paramètres le plus couramment utilisé pour mesurer les ajustements physiologiques associés à l'acclimatation hivernale est le taux métabolique de base (BMR pour « basal metabolic rate »). Cette variable reflète l'ensemble des coûts énergétiques associés à la maintenance physiologique d'un animal au repos, à thermoneutralité, en l'absence de digestion, de croissance et de reproduction. (McNab, 1997; McKechnie et Freckleton, 2006; McKechnie, 2008; McKechnie et Swanson, 2010; Swanson et al., 2017). Le BMR représente donc le coût métabolique minimal pour la maintenance d'un organisme. Le refroidissement dû à l'hiver ou à une acclimatation expérimentale mène typiquement à une augmentation du BMR chez les espèces aviaires (Tableau I.1).

Il a souvent été avancé que cette augmentation du coût de maintenance s'explique par un gain de masse des organes, surtout digestifs et excréteurs tels que le foie, l'intestin, le gésier et les reins (Piersma et al. 1996; Williams and Tieleman, 2000; Vézina et al., 2006; Zheng et al., 2008a; Zheng et al., 2013; Barceló et al., 2017), mais aussi des organes comme le cœur et les muscles (Petit et al., 2014, Barcelo et al 2017, Vézina et al 2017). En effet, la prise alimentaire augmentant en réponse au froid et à l'élévation de la demande énergétique (Williams et Tieleman, 2000; Tieleman et al., 2003; McKechnie, 2008) provoque un développement de ces organes, entraînant ainsi une hausse du métabolisme basal (Barceló et al, 2017). Il est donc admis que cette augmentation du BMR ne serait pas une réponse directe à la température en hiver mais plutôt la résultante de la prise de masse des organes impliqués dans l'apport d'énergie (Swanson, 2010). Ainsi, l'augmentation de la

masse de tissus chez les espèces hivernantes va impliquer plus de cellules et donc un coût de maintenance supérieur (Swanson et al., 2017).

Une réponse d'acclimatation est également d'élever la capacité thermogénique maximale ou M_{sum} (pour « summit metabolic rate ») (Tableau I.1). Le M_{sum} , dont l'augmentation saisonnière est typiquement de 3 à 8 fois supérieure au BMR (Swanson, 2010), est considéré comme un indice de l'endurance au froid (Liknes and Swanson, 1996; Swanson, 2001; Swanson et Liknes, 2006; McKechnie et al 2015), celui-ci étant assimilé à la capacité à frissonner sur de longues périodes (Hohtola and Stevens, 1986; Saarela and Heldmaier, 1987; Saarela et al., 1995). Le M_{sum} est limité, et donc réglable à plusieurs niveaux physiologiques. Tout d'abord, il peut y avoir limitation au niveau de la capacité oxidative. En effet, un métabolisme qui augmente implique une plus grande consommation en oxygène, consommation qui sera limitée à l'échelle de l'organisme par (1) la capacité de transport d'oxygène, mesuré dans les études à l'aide de l'hématocrite, volume relatif de globules rouges comparé au volume de sang total

Tableau I.1: Pourcentages d'augmentation du BMR ou du M_{sum} (non corrigés pour la masse) en hiver comparativement à l'été ou au printemps (Naturel: N) ou au froid comparativement au chaud (Expérimental: E) chez différentes espèces de petits passereaux

Espèces	BMR (%)	M_{sum} (%)	Naturel (N) ou Expérimental (E)	Références
<i>Carduelis tristis</i>	46	31	N	Liknes et al., 2002
<i>Passer domesticus</i>	64	29	N	Arens et Cooper, 2005
<i>Carpodacus mexicanus</i>	-	30	N	O'Connor, 1995
<i>Calidris canutus</i>	26	13	E	Vézina et al., 2006
<i>Poecile atricapillus</i>	-	36	N	Cooper et al., 1989
<i>Poecile gambeli</i>	14.8	26	N	Cooper, 2002
<i>Baeolophus griseus</i>	18.2	16.2	N	Cooper, 2002
<i>Poecile atricapillus</i>	-	36	N	Cooper et Swanson, 1994
<i>Sitta carolinensis</i>	-	55	N	Liknes et Swanson, 1996
<i>Pycnonotus sinensis</i>	18	-	N	Zheng et al., 2008b
<i>Passer montanus</i>	60 (printemps) 35 (été)	-	N	Zheng et al., 2008a
<i>Alaemon alaudipes</i>	42	-	E	Williams et Tieleman, 2000
<i>Passer domesticus</i>	-	10.8	N	Swanson et al., 2009
<i>Poecile atricapillus</i>	5.9	34.2	N	Petit et al., 2013
<i>Zonotrichia albicollis</i>	15	19	E	Barceló et al., 2017

(Swanson, 1990; O'Connor, 1996; Fair et al., 2007; Petit et Vézina, 2014), par (2) la structure du système circulatoire impliquant la taille des poumons et du cœur (Chapell et al., 1999; Hammond et al., 2000; Zheng et al., 2008a; Petit et al., 2014; Barceló et al., 2017) et la densité en capillaires sanguins (Mathieu-Costello et al., 1998) ainsi que par (3)

la capacité de respiration mitochondriale (Swanson et al., 2014a; Vézina et al., 2017). La capacité thermogénique peut également être limitée par (4) la capacité à cataboliser l'énergie disponible issue des nutriments et à la transporter au travers des membranes cellulaires (O'Connor et al., 1995; Liknes et Swanson, 2011a; Swanson et al., 2014b; Zhang et al., 2015; Vézina et al., 2017; Zhang et al., 2017). La vitesse à laquelle va fonctionner le métabolisme cellulaire pourrait donc potentiellement dépendre de la vitesse à laquelle les carburants nécessaires à son fonctionnement lui sont fournis. Enfin, le M_{sum} peut être limité par (5) la quantité de tissu qui va définir la capacité totale à produire de la chaleur dans un organisme. Ainsi, par un gain de masse musculaire, il y aurait un plus grand volume de fibres musculaires participant au frissonnement et à la production de chaleur. Parmi ces limitations potentielles, les variations de M_{sum} ont le plus souvent été associées à un développement des muscles pectoraux (O'Connor, 1995; Cooper, 2002; Liknes and Swanson, 2011b; Swanson et Merkord, 2012; Petit et al., 2014; Vézina et al., 2017; Tableau I.2), du cœur ou des muscles totaux (Vézina et al., 2011; Swanson et al., 2013; Petit et al., 2014; Swanson et al., 2014b; Barceló et al., 2017; Vézina et al., 2017). Le M_{sum} étant le paramètre reflétant le plus la réponse de thermogénèse au froid, nous nous intéresserons donc principalement à celui-ci dans le reste de cette étude.

I.3.2 Intensité métabolique

Bien que la masse des organes semble être un élément à considérer dans l'étude de l'acclimatation hivernale, de plus en plus d'évidences obtenues au cours d'expériences en captivité montrent qu'elle n'explique pas toujours et totalement la réponse

Tableau I.2: Variation saisonnière (hiver par rapport à été ou printemps) ou expérimentale (froid par rapport à thermoneutralité) de la masse du muscle pectoral et du M_{sum}

Espèces	Masse corporelle ⁴	Masse muscles	M_{sum}	Corrélation muscles vs M_{sum}	Références
<i>Junco hyemalis</i>	16-20 g	-	28%	-	Swanson, 1990
<i>Junco hyemalis</i>	17-20 g	28%	=	- ¹	Swanson, 1991
<i>Junco hyemalis</i>	-	-	-	n.s	Swanson et al., 2014a
<i>Junco hyemalis</i>	18 g	=	16-19%	-	Swanson et al., 2014b
<i>Junco hyemalis</i>	-	=	-	-	Stager et al., 2015
<i>Carpodacus mexicanus</i>	20 g	33%	28%	Absente	O'Connor, 1995
<i>Poecile gambeli</i>	10-12 g	33%	26%	Absente	Cooper, 2002
<i>Baeolophus ridgwayi</i>	16-19 g	24%	16%	Absente	Cooper, 2002
<i>Poecile atricapillus</i>	11-13 g	12%	> 25%	-	Liknes et Swanson, 2011a
<i>Poecile atricapillus</i>	-	=	-	-	Swanson et al., 2014c
<i>Poecile atricapillus</i>	11-12 g	11-14% ²	34.2%	signif.	Petit et al., 2014
<i>Sitta carolinensis</i>	20 g	11%	> 25%	-	Liknes et Swanson, 2011a
<i>Passer domesticus</i>	26-28 g	8%	> 25%	-	Liknes et Swanson, 2011a
<i>Passer domesticus</i>	-	-	-	n.s	Swanson et al., 2014a
<i>Zonotrichia capensis</i>	18-20 g	-30%	-	-	Peña -Villalobos et al., 2014
<i>Zonotrichia albicollis</i>	-	=	19%	signif. ³	Barceló et al., 2017
<i>Calidris canutus</i>	120-135 g	=	13%	signif.	Vézina et al., 2011
<i>Calidris canutus</i>	100-120 g	12%	16%	signif.	Vézina et al., 2017

¹: « - » quand la corrélation n'a pas été testée dans l'étude.

²: combinaison des muscles pectoraux, muscle supracoracoïde et muscles des cuisses.

³: corrélation muscles vs M_{sum} observée dans le groupe froid uniquement.

⁴: gamme de masse pour l'espèce donnée.

thermogénique. Certaines études suggèrent en effet que le M_{sum} peut augmenter en l'absence d'un gain de masse musculaire (Tableau I.2). L'exemple le plus flagrant est observé chez le junco ardoisé (*Junco hyemalis*) pour lequel une augmentation du M_{sum} de 25-28% et une augmentation de la masse de muscle pectoral jusqu'à 28% sont observés en hiver comparativement à l'été (Swanson, 1990; Swanson, 1991). En revanche, lorsqu'acclimatés en captivité à 24°C et à 3°C, la masse du muscle pectoral ne varie pas significativement entre ces deux températures, bien que le M_{sum} soit lui supérieur de 16-19% à 3°C (Swanson et al., 2014b). De façon similaire, malgré un M_{sum} supérieur de 13% chez des bécasseaux maubèches (*Calidris canutus*) acclimatés au froid (5°C) comparativement à ceux acclimatés à la thermoneutralité (25°C), l'épaisseur de muscles pectoraux demeure quant à elle similaire (Vézina et al., 2011). Enfin, plus récemment, Barceló et al. (2017) ont observé chez le bruant à gorge blanche (*Zonotrichia albicollis*) que les individus acclimatés à -8°C avaient un M_{sum} supérieur de 19% mais une masse de muscles similaire à ceux acclimatés à 28°C. Certaines études ont tenté de démontrer une régulation de la genèse de tissu musculaire en réponse au froid en mesurant le niveau d'expression du gène de la myostatine, une enzyme inhibitrice de la croissance musculaire, ainsi que de ses activateurs (TLL-1 et TLL-2). Ces études, menées sur plusieurs espèces, n'ont pas observé de variation du nombre de transcrits ou de protéines de myostatine, de TLL-1 et de TLL-2 entre l'hiver et l'été (Swanson et al., 2014c) ou entre 24°C et 3°C (Stager et al., 2015; Zhang et al., 2017).

Comme nous avons pu le voir dans la section précédente (cf Tableau I.2) le M_{sum} est souvent corrélé à la masse des muscles. Il apparaît donc que, parce qu'ils ont plus de tissus actifs pendant le frissonnement, les individus munis de muscles de grande taille soient favorisés en ce qui a trait à la production de chaleur. En fait, si le jeu de données étudié présente une gamme de valeurs de M_{sum} et de masse de muscles assez étendue, alors cette corrélation devrait normalement être détectée, ce qui est typiquement le cas dans les études intersaisonniers (Petit et al. 2014). Cependant, l'hypothèse selon laquelle les oiseaux

hivernants augmentent systématiquement leur endurance au froid par un gain de masse musculaire reste à être validée au vue des incohérences présentées ci-dessus. Comme nous l'avons vu, certaines études suggèrent plutôt que le gain de muscles n'est pas un prérequis pour augmenter le M_{sum} (Vézina et al., 2011; Swanson et al., 2014b; Stager et al., 2015; Barceló et al., 2017). D'autres mécanismes physiologiques à l'échelle cellulaire semblent par conséquent entrer en jeu dans ce gain de capacité thermogénique, mécanismes par lesquels l'intensité métabolique des organes, c'est à dire la quantité d'énergie utilisée par unité de masse tissulaire, serait modulée (Vézina et Williams, 2005; Swanson, 2010).

I.4 Ajustements à l'échelle cellulaire en réponse au froid

Si l'augmentation de la capacité thermogénique en réponse au froid s'opère par une hausse de l'intensité métabolique des tissus, c'est à dire au niveau du métabolisme cellulaire, il reste maintenant à savoir à quels niveaux de la cellule s'effectue concrètement cet ajustement. Plusieurs études se sont penchées sur le rôle de la mitochondrie dans le métabolisme énergétique dans un contexte d'acclimatation au froid. En effet, la mitochondrie, est « le poumon » de la cellule, là où plus de 90% de la respiration cellulaire mammalienne est effectuée (Rolfe et Brown, 1997). Bien qu'un tel pourcentage n'ait, à ma connaissance, pas été calculé chez les oiseaux, il est certain que de part ses fonctions dans la respiration, la mitochondrie ait également un rôle primordial dans le métabolisme énergétique chez les oiseaux. D'ailleurs, Tieleman et al. (2009) ont observé que le BMR du tarier pâtre (*Saxicola torquata*) est sous le contrôle de fonctions mitochondriales. Par conséquent, une partie des variations de performance métabolique (BMR, M_{sum}) entre les espèces et les études pourraient s'expliquer par des variations de capacité oxydative mitochondriale.

I.4.1. La mitochondrie, déterminante dans le métabolisme énergétique

La membrane interne de la mitochondrie contient des complexes protéiques (1 à 4) constituant le système de transport des électrons (ETS: Electron transport system) par lequel s'effectue la respiration oxydative (Fig. I.2). Les réactions d'oxydation des complexes I et II avec leurs substrats respectifs NADH et FADH₂, issus du cycle de Krebs, vont libérer des électrons qui vont circuler dans le système, par une succession de réactions d'oxydoréduction (Divakaruni et Brand, 2011; Lemieux et al., 2017). L'oxygène (O₂) intervient comme accepteur final des électrons au niveau du complexe IV (cytochrome C oxydase) où sa réduction produit des molécules d'eau. L'énergie relâchée au travers de ce flux d'électrons permet le pompage de protons H⁺ par les complexes I, III et IV, ceci de la matrice vers l'espace inter-membranaire (Divakaruni et Brand, 2011; Fig. I.2). L'accumulation de H⁺ dans l'espace intermembranaire crée ainsi un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane interne, gradient qui est également nommé force proton-motrice. Le retour dans la matrice de ces protons concentrés dans l'espace inter-membranaire se fait au travers de l'ATP-synthase (complexe V) qui utilise la force du gradient pour générer de l'ATP par phosphorylation d'ADP à l'aide de phosphate inorganique. Cet ensemble de réactions se nomme la phosphorylation oxydative qui en plus de générer de l'ATP, celle-ci génère aussi de la chaleur (Nicholls et Ferguson, 1992; Rolfé et Brown, 1997; Silva, 2003; Somero et al., 2017).

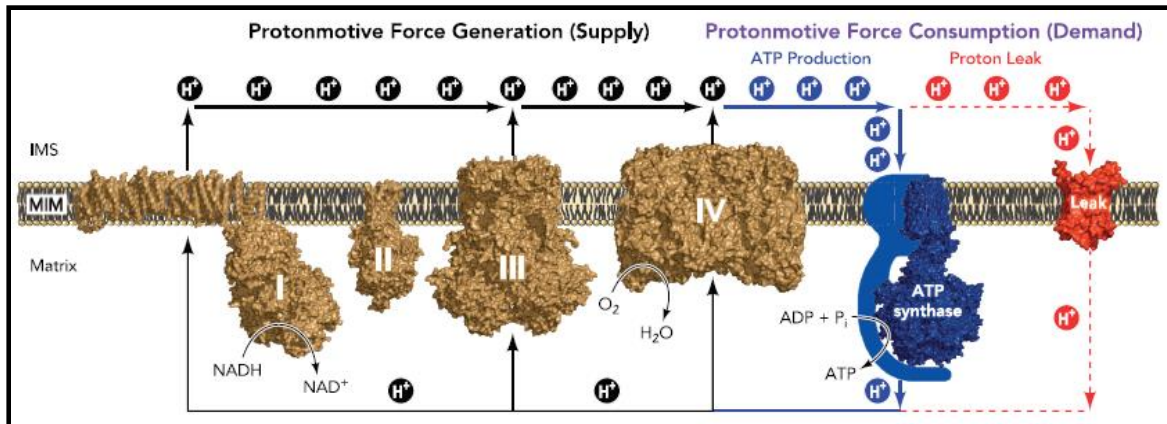


Figure I.2: Représentation schématique du système de transport des électrons dans la mitochondrie (Divakaruni et Brand, 2011)

Puisque les réactions biochimiques ne sont jamais totalement efficaces dans la conversion de l'énergie d'une forme (ex: gradient de protons) en une autre (ex: ATP), une partie de l'énergie disponible n'est par conséquent pas utilisée pour produire de l'ATP mais va être dissipée sous forme de chaleur (Hill et al., 2004; Silva, 2006). D'autre part, une perméabilité passive de la membrane interne va également générer une fuite de protons au travers de la membrane, diminuant ainsi l'efficacité de production de l'ATP (Divakaruni et Brand, 2011); l'énergie contenue dans la force proton-motrice ne sera donc pas utilisée pour produire de l'ATP mais elle sera dissipée en chaleur. La fuite de proton mitochondriale ou « leak » est en fait un élément important du métabolisme cellulaire chez les mammifères, représentant 20 à 30% du métabolisme basal chez le rat (Rolfe et Brand, 1996 et 1997; Rolfe et al., 1999; Divakaruni et Brand, 2011). L'intensité de respiration varie de façon inversement proportionnelle à l'amplitude du gradient de protons, c'est à dire que la respiration va augmenter quand le gradient va diminuer et inversement (Silva, 2003). Donc, dans un cas où la fuite de protons serait stimulée, il y aurait plus d'oxygène consommé pour moins d'ATP produit.

I.4.2. Flexibilité fonctionnelle des fonctions mitochondriales en réponse au froid

Certaines évidences suggèrent une flexibilité fonctionnelle des mitochondries en réponse au froid. Au niveau matriciel, parmi les paramètres cellulaires le plus mesurés pour évaluer l'intensité métabolique maximale, il y a tout d'abord la citrate synthase (CS), une enzyme intervenant dans le cycle de Krebs et donc dans l'apport en substrats dans le système de transport des électrons. Les oiseaux utilisant principalement les lipides comme substrat énergétique (Vaillancourt et al., 2005; Guglielmo, 2010; Swanson, 2010), la disponibilité en lipides est donc un paramètre qui limite potentiellement la capacité aérobie maximale. C'est pourquoi l'activité de la carnitine palmitoyl transferase (CPT), une protéine membranaire assurant le transport des lipides dans la mitochondrie et l'activité de l'hydroxyacyl CoA-déshydrogénase (HOAD), une enzyme intervenant dans le cycle de la β -oxydation des lipides, sont souvent mesurés. En effet, plusieurs études montrent chez des espèces acclimatées au froid une hausse d'activité de la CS (O'Connor et al., 1995; Liknes et Swanson, 2011a; Swanson et al., 2014 a, b; Peña-Villalobos et al., 2014; Vézina et al., 2017), de la CPT et de HOAD (Liknes et Swanson, 2011a; Swanson et al., 2014b; Zhang et al., 2015; Vézina et al., 2017). D'autres protéines, impliquées dans le transport des acides gras dans le cytosol de la cellule, sont également d'avantage exprimées lors de l'acclimatation au froid (Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2017). Au niveau membranaire, les études ont soit mesuré une enzyme particulière du système de respiration, la cytochrome C oxydase ou CCO (Fig. I.2) soit la consommation d'oxygène associée à la phosphorylation oxydative ou à la fuite de protons (Roussel et al., 1998; Zheng et al., 2008a; Teulier et al., 2010; Zheng et al., 2014; Zhou et al., 2016). Certaines études ont démontré, en réponse à une baisse de température, une hausse de l'activité de la CCO (Zheng et al. 2008a; Zheng et al., 2014; Zhou et al., 2016), de la phosphorylation oxydative ou de la fuite de protons (Roussel et al. 1998; Zheng et al. 2008a; Teulier et al. 2010; Zheng et al., 2014). Ainsi, ces fonctions mitochondriales sont de toute évidence flexibles dans un contexte d'acclimatation thermique.

L'acclimatation au froid n'induit cependant pas systématiquement une régulation positive de ces fonctions métaboliques. Par exemple, certaines études n'ont pas observé d'augmentation de l'approvisionnement en substrats par le transport membranaire ou de hausse d'oxydation des lipides ou de l'activité du cycle de Krebs (Sgueo et al., 2012; Zhang et al., 2015; Swanson et al. 2017). D'autres n'ont pas observé de changement d'activité des composantes impliquées dans la phosphorylation oxydative (Salin et al., 2010; Peña - Villalobos et al., 2014) ou dans la fuite de protons (Salin et al., 2010). Par ailleurs, la réponse au froid de ces fonctions mitochondriales varie en intensité selon le tissu. Chez le bécasseau maubèche (*Calidris canutus*), alors que l'activité enzymatique a été mesurée dans cinq tissus différents, l'activité de la CPT est supérieure au froid seulement dans le muscle pectoral et la cuisse, HOAD seulement dans le muscle pectoral et CS seulement dans le foie et les reins (Vézina et al. 2017). En revanche, le M_{sum} est corrélé à ces trois enzymes uniquement dans le cœur.

La corrélation des fonctions mitochondriales avec l'endurance au froid (M_{sum}) varie également selon les études et les espèces. Par exemple, l'augmentation du M_{sum} chez le junco ardoisé est associée à l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le transport et l'oxydation des lipides ainsi que dans la phosphorylation oxydative (Stager et al., 2015). Dépendamment de l'espèce et du tissu considéré (foie, muscle pectoral, cuisses ou cœur), l'activité de la CS, de la CPT et de la HOAD est positivement corrélée au M_{sum} chez le moineau domestique et le bécasseau maubèche (Swanson et al., 2014a; Vézina et al., 2017). En revanche d'autres études démontrent chez des espèces de petits passereaux une absence de corrélation entre le M_{sum} et l'activité de ces enzymes (Swanson et al., 2013; Swanson et al., 2014a; Zhang et al., 2017). Il semble donc que la réponse métabolique à une acclimatation au froid soit multiple et diversifiée selon les espèces et le contexte.

A notre connaissance, cependant, aucune étude chez les oiseaux n'a investigué l'influence des composantes de la respiration mitochondriale, à savoir celles de la phosphorylation oxydative ainsi que de la fuite de protons sur la capacité thermogénique.

Or ces deux éléments de la respiration mitochondriale sont susceptibles d'avoir un impact sur celle-ci. D'une part, le « leak » comme nous l'avons vu est un mécanisme qui génère de la chaleur, donc il pourrait contribuer à surélever le M_{sum} . D'autre part, l'augmentation de la phosphorylation oxydative pourrait contribuer de plusieurs façons à l'augmentation du M_{sum} . Soit en élevant la capacité de frissonnement par l'apport d'ATP, indispensable à l'activité de l'actine-myosine-ATPase et de la Ca^{2+} -ATPase durant les contractions musculaires (Rolfe et Brown, 1997), soit en fournissant plus d'ATP aux mécanismes de NST, en l'occurrence le cycle futile de la pompe Ca^{2+} -ATPase (Duchamp et al., 1999; De Meis, 2001). Enfin, l'augmentation de la phosphorylation oxydative pourrait générer une hausse de production de chaleur de part l'inefficacité du système de respiration à convertir toute l'énergie disponible en ATP (Rolfe et Brown, 1997).

I.5. Présentation de l'étude

I.5.1 Hypothèses et prédictions

Bien qu'il soit admis que l'augmentation de la capacité thermogénique puisse s'effectuer principalement par un gain de masse musculaire, des incohérences entre les études suggèrent que cette interprétation est à remettre en question et qu'une amélioration de l'endurance au froid pourrait se faire sans changer la masse des muscles (Swanson et al., 2014a; Barceló et al., 2017). Pourtant, aucune étude à ce jour en a fait la claire démonstration. Ainsi, dans le **chapitre 1** de cette thèse, nous nous pencherons dans un premier temps sur l'ajustement de la capacité thermogénique par la variation de masse des organes en réponse à une acclimatation au froid chez une espèce résidente, la mésange à tête noire (*Poecile atricapillus*). Nous ferons **l'hypothèse 1** que la capacité thermogénique maximale (M_{sum}), bien que pouvant tirer bénéfice d'une masse musculaire plus élevée, serait augmentée au froid par des processus cellulaires et non par un gain de masse

musculaire. Ce gain ne serait donc pas un prérequis chez les oiseaux résidents pour acquérir une meilleure endurance au froid. Notre **prédiction** pour cette première hypothèse est que le M_{sum} devrait être positivement corrélé à la masse des muscles, avec cependant un niveau de M_{sum} supérieur au froid pour des individus de même masse musculaire.

Nous avons présenté dans la section « Acclimatation hivernale chez les oiseaux résidents » (n° I.3) des études ayant une approche « systémique » où l'organisme est étudié dans son ensemble, c'est à dire en prenant en compte en même temps tous les « compartiments » physiologiques de l'organisme (système cardio-vasculaire, excréteur, digestif, cérébral, etc). Nous avons aussi présenté dans la section « Ajustement à l'échelle cellulaire en réponse au froid » (n° I.4) des études ayant une approche « réductionniste », visant à comprendre le système par l'étude de ses sous-parties, c'est-à-dire les mécanismes cellulaires et moléculaires (Fell, 1997). Nous avons de plus présenté différentes études ayant fait quant à elles la jonction entre l'approche systémique et réductionniste (Swanson et al., 2013; Swanson et al, 2014b; Stager et al., 2015; Vézina et al., 2017; Zhang et al., 2017). Cependant, malgré le rôle prépondérant de la phosphorylation oxydative et du leak dans le métabolisme, aucune étude à ce jour n'a tenté de corréler ces deux composantes du fonctionnement mitochondrial avec l'endurance au froid chez les oiseaux. Nous ne savons donc pas si le M_{sum} pourrait être régulé à ce niveau. C'est donc dans ce contexte que s'insère le **chapitre 2**, entre l'approche « systémique » et « réductionniste ». Si comme nous le supposons dans le chapitre 1, une capacité thermogénique élevée résulte en partie d'un métabolisme masse-spécifique élevé, nous pouvons deuxièmement supposer que cette augmentation de la capacité thermogénique s'effectuerait au niveau mitochondrial. Par conséquent, notre **hypothèse 2** est que l'augmentation de la capacité thermogénique lors de l'acclimatation au froid implique une augmentation du leak et/ou de la phosphorylation oxydative, soit par un ajustement quantitatif (densité en mitochondries) soit/et par un ajustement qualitatif (propriétés intrinsèques de la mitochondrie) dans un organe impliqué dans la thermogénèse, le muscle pectoral. Nous faisons ainsi la **prédiction** que

l'acclimatation au froid devrait induire une hausse à au moins un de ces quatre niveaux: la capacité catalytique (1) à fournir des électrons à l'ETS au travers de l'apport en NADH ou FADH₂ (activité de la CS), (2) à faire entrer les électrons dans l'ETS et à générer un gradient de protons (activité des complexes I et II), (3) à évacuer les électrons (activité de la CCO) et (4) la capacité à laisser les protons s'échapper au travers de la membrane (Figure I.2). Si ces changements sont associés à une hausse de capacité thermogénique, une autre **prédiction** est que nous devrions également détecter des corrélations entre l'endurance au froid estimée par le M_{sum} et certaines des composantes du métabolisme mitochondrial énumérées ci-dessus. Les individus ayant un M_{sum} supérieur seront donc ceux ayant une capacité de phosphorylation oxydative ou un leak plus élevé.

I.5.2. Méthodologie générale

I.5.2.a. Modèle d'étude

La mésange à tête noire (*Poecile atricapillus*) est un petit passereau (10-12g) largement distribué dans les forêts mixtes d'Amérique du nord (Sharbaugh, 2001), où il réside l'hiver dans des conditions climatiques considérées rudes. Les passereaux forestiers résidents des milieux tempérés et boréaux forment un modèle idéal pour l'étude de l'acclimatation hivernale car ils sont actifs à l'année et leur métabolisme est parmi les plus élevés chez les endothermes (Schmidt-Nielsen, 1984; Nagy et al., 1999). L'hiver présente sans conteste un défi pour ces oiseaux de petite taille: leur ratio surface/volume étant élevé, leur taux de déperdition de chaleur, défini par la conductance thermique (Schleucher et Withers, 2001), est supérieure à celui des espèces de grande taille (Schmidt-Nielsen, 1984; Brodin, 2007).



Figure I.3: Mésange à tête noire dans son milieu naturel

De plus, plusieurs études fournissent des connaissances importantes sur l'écologie (Miles et Ricklefs, 1984; Barraclough et al., 1995), la physiologie (Lasiewski et Dawson, 1967; Arens et Cooper, 2005; Olson et al., 2010), et le comportement (Desrochers, 1990; Schubert et al., 2008; Vézina et Thomas, 2000) de cette espèce.

I.5.2.b. Protocole général

Les deux chapitres présentés dans cette thèse s'appuient sur deux études réalisées à partir des données issues d'une même expérience consistant en une acclimatation thermique menée en captivité sur les mésanges. Nous avons en parallèle récolté les données spécifiques à l'étude du chapitre 1 et à l'étude du chapitre 2.

La capture des mésanges s'est effectuée entre janvier et avril 2015, sur deux sites à proximité de Rimouski alimentés à l'aide de mangeoires. Transportées à l'animalerie de

l'UQAR, les mésanges ont été acclimatées à la captivité, puis ont été séparées en deux groupes maintenus chacun dans une salle à température contrôlée pendant 28 jours. Le groupe contrôle (n=25) a été maintenu à thermoneutralité (27°C; Rising et Hudson 1974; Cooper et Swanson 1994) et le groupe acclimaté au froid (n=24) à été maintenu à -10°C. Durant cette période d'acclimatation, les oiseaux ont été pesés tous les 4 jours afin de confirmer la stabilisation de la masse. A l'issue des 28 jours, nous avons effectué une mesure de consommation alimentaire journalière pendant 6 jours pour obtenir un indice moyen de l'apport énergétique dans les deux traitements. Nous avons ensuite mesuré le taux métabolique de base (coût de maintenance: BMR) et la capacité thermogénique (métabolisme maximal au froid: M_{sum}) de chaque individu par respirométrie (calorimétrie indirecte) à raison de 4 oiseaux par jour pendant 49 jours. Deux à trois jours après les enregistrements de performance métabolique, chaque oiseau a été sacrifié par décapitation afin de récolter :

- (1) des biopsies de muscle pectoral et de foie (organe non thermogénique servant de comparatif) utilisées aussitôt après la dissection pour mesurer à l'aide d'un analyseur à oxygène la respiration mitochondriale.
- (2) des biopsies de muscle pectoral et de foie congelées aussitôt dans l'azote liquide afin de procéder ultérieurement au dosage de la CS et de la CCO.
- (3) la masse des organes (cerveau, muscles pectoraux, cuisses, cœur, poumons, foie, pancréas, intestin, gésier, peau), la carcasse et le gras furculaire afin de mesurer leur influence sur le BMR et le M_{sum} .

CHAPITRE I

**DES MUSCLES DEVELOPPÉS SONT AVANTAGEUX MAIS NON INDISPENSABLES
POUR AUGMENTER LA CAPACITÉ THERMOGÉNIQUE CHEZ LES OISEAUX DE
PETITE TAILLE**

Large muscles are beneficial but not required for improving thermogenic capacity in small birds.

Myriam S. Milbergue^{1,2,3,4*}, Pierre U. Blier^{1,2,4}, François Vézina^{1,2,3,4}

Citation: Milbergue, M. S., Blier, P.U., Vézina, F. (2018) « Large muscles are beneficial but not required for improving thermogenic capacity in small birds » *Scientific Reports* 8:14009.

DOI:10.1038/s41598-018-32041-w

1 Département de biologie, chimie et géographie, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Québec, Canada. **2** Groupe de recherche sur les environnements nordiques BORÉAS, Rimouski (Qc), Canada. **3** Centre d'études nordiques, Rimouski, Québec, Canada. **4** Centre de la Science de la Biodiversité du Québec, Rimouski, Québec, Canada.

Contributions: Conception de l'expérience: F.V, P.U.B, M.M; Réalisation de l'expérience: M.M; Analyse des données: M.M; Financement: F.V, P.U.B; Rédaction: M.M, F.V.

Résumé

Il a été suggéré par plusieurs études que le développement de la masse musculaire, particulièrement celle des muscles pectoraux, joue un rôle majeur dans la hausse de la thermogénèse au froid chez les oiseaux de petite taille. Cependant, certaines études présentent une hausse de la capacité thermogénique en l'absence de variation de la masse musculaire entre les saisons ou les traitements thermiques, mettant ainsi en évidence des incohérences entre les études. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle une augmentation de la masse musculaire ne serait pas un prérequis obligatoire à l'augmentation de la capacité thermogénique chez la mésange à tête noire (*Poecile atricapillus*). Nous avons acclimaté les mésanges à thermoneutralité (27°C) et au froid (-10°C) durant 28 jours. Nous avons ensuite mesuré leur taux métabolique basal (BMR) et maximal au froid (M_{sum}) ainsi que la masse des organes prélevés durant dissection. Comparés aux oiseaux maintenus à thermoneutralité, ceux acclimatés au froid ont en moyenne consommé 44% de nourriture en plus, et avaient un BMR et un M_{sum} supérieur de 5% et 20% respectivement. Par contre, la masse sèche maigre des muscles pectoraux et des muscles totaux n'a pas présenté de différence significative entre les traitements (<1% de différence pour les muscles totaux), confirmant ainsi qu'un gain de masse musculaire n'est pas requis pour élever la capacité thermogénique. Néanmoins, l'analyse des masses d'organes a révélé que les variations inter-individuelles du BMR et du M_{sum} résultaient en premier lieu de la variation de la masse des muscles squelettiques, qui représentent 80% de la masse sèche maigre totale. M_{sum} est corrélé positivement à tous les muscles squelettiques, incluant le pectoral, et ceci indépendamment de la température d'acclimatation. Par conséquent, nos résultats suggèrent que l'élévation de la capacité thermogénique nécessite une stimulation des fonctions cellulaires, les individus avec des muscles plus développés pouvant cependant bénéficier de l'apport de chaleur qu'offre une plus grande quantité de tissu musculaire, qu'ils soient ou non acclimatés au froid.

Mots clés: M_{sum} , muscle pectoral, BMR, organes, mésanges, énergétique, froid, acclimatation, thermorégulation.

Abstract

Several studies suggest that muscles mass development, particularly that of the pectoralis, play a major role in improving thermogenic response to cold in small birds. However, some studies have reported enhancement of thermogenic capacity in absence of muscles mass variation between seasons or thermal treatments, leading to inconsistencies in findings. We tested the hypothesis that an increase in muscles mass is not an absolute prerequisite for improving thermogenic capacity in captive black capped chickadees (*Poecile atricapillus*). We acclimated chickadees to thermoneutral (27°C) and cold (-10°C) temperatures during 28 days. We then measured their basal (BMR) and summit (M_{sum}) metabolic rates and obtained body composition data from dissections. Cold acclimated birds consumed 44% more food on average, and had 5% and 20% higher BMR and M_{sum} , respectively, compared to individuals kept at thermoneutrality. However, lean dry pectoralis and total muscle mass did not differ between treatments (<1% difference in total muscles), confirming that the improvement of thermogenic capacity did not require an increase in skeletal muscle mass. Nevertheless, body composition analyses revealed that inter-individual variation in both BMR and M_{sum} were firstly explained by mass variation of skeletal muscle, which represent 80% of lean dry body mass. M_{sum} was positively correlated with the mass of all measured skeletal muscles, including the pectoralis, and that independently from acclimation temperature. Therefore, our results suggest that improving thermogenic capacity requires an upregulation of cell functions but that individuals with large muscles can nevertheless benefit from muscle size in term of heat production, whether they are acclimated to cold or not.

Key words: M_{sum} , pectoralis, BMR, organs, chickadee, energetics, cold, acclimatization, acclimation, thermoregulation.

Introduction

For small avian species wintering at high latitudes, winter acclimatization is mainly a physiological phenomenon¹⁻⁵ where cold hardiness is improved as temperature decline from fall to peak of winter⁵⁻⁸. This improved capacity is typically associated with increases in basal (BMR) and summit (M_{sum}) metabolic rates, which are respectively thought to reflect physiological maintenance costs⁹⁻¹³ and cold endurance^{4,12,14,15}. The seasonal elevation in BMR is often interpreted as resulting from an increase in daily food consumption requiring larger digestive and excretory organs (e.g. liver, gizzard, intestine), in turn leading to higher maintenance cost^{7,16-19}. However, as the influence of body composition on BMR is context-specific^{20,21} and can be affected by tissue metabolic intensity^{10,22-25}, this scenario may not be generalizable¹³. For example, in cases where acclimatization also leads to considerable increases in skeletal muscle size, the influence of digestive and excretory organs on BMR can be overshadowed by the amount of muscle tissues consuming energy during measurements^{25,26}.

In contrast, since M_{sum} is a measure of maximal shivering heat production^{2,27,28}, the influence of skeletal muscle size, particularly the flight muscles and heart size, on thermogenic capacity appears much more consistent. In several small free-living wintering species, elevated winter M_{sum} is indeed associated with seasonally larger pectoralis muscles^{5,26,29-33}. The mass of skeletal muscles and heart has also been found to correlate significantly and positively with M_{sum} several times^{19,25,26,34-37}. Despite the seasonal changes in muscles size and M_{sum} observed in the wild, a small number of studies, although they were not designed to investigate this specific phenomenon, reported improvements of thermogenic capacity in controlled conditions independently from changes in muscles size^{19,38,39}. This phenomenon was found to occur even in species known to increase pectoralis muscle mass in winter. For example, dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*) are known to increase both their M_{sum} and the size of their pectoralis muscles in winter relative

to summer²⁹ but recently, Swanson *et al.* [ref.³⁸, see also⁴⁰] conducted an experiment with captive juncos and found a 16–19% higher M_{sum} in cold-acclimated (3°C) birds relative to individuals exposed to a warm treatment (24°C) with no difference in pectoralis muscle mass. Similarly, Barceló *et al.*¹⁹ documented a 19% higher M_{sum} in captive white-throated sparrows (*Zonotrichia albicollis*) acclimated to –8°C compared to individuals maintained at thermoneutrality (28°C). In this particular case, although the expected positive correlation between heart and muscles mass and M_{sum} was found in cold acclimated birds, there was no significant difference in the mass of pectoralis or other skeletal muscles between thermal treatments. Since shivering does not produce external work, and thus most of the chemical energy consumed during contraction is released as heat⁴⁰, there is no doubt that large muscles should produce more heat, for a given level of shivering, compared to small muscles. Consequently, in a given dataset if muscles mass and M_{sum} cover a range of variation sufficiently wide, which is often the case with interseasonal studies^{5,26,30,31,35}, positive correlations between muscle mass and M_{sum} should be detectable across or within seasons. However, the experimental evidence presented above suggest that developing larger muscles may not be an obligate prerequisite for improving individual thermogenic capacity, even in species known to increase the size of their muscles during cold winters.

To test this hypothesis, we conducted an experimental study with captive black-capped chickadees (*P. atricapillus*). Chickadees are small (11 g) non-migratory passerines that typically express elevated M_{sum} in winter relative to summer^{8,26,41}. This improvement of thermogenic capacity parallels or statistically correlates with the development of larger muscles and heart^{26,31,42}. However, at least one case of chickadees going through a cold winter without significant changes in pectoralis muscles size has been documented⁴³. This suggests that in experimental conditions, where only temperature is manipulated, this species could also show improvement of thermogenic capacity independently from skeletal muscle mass variation. We therefore exposed birds to two thermal treatments (–10°C and 27°C), with the expectation that cold acclimated birds, would show a higher M_{sum} than

those maintained at thermoneutrality but no difference in mean mass of pectoralis and other skeletal muscles. We nevertheless expected a correlation between muscle mass and M_{sum} across or within treatments as individuals with larger muscles could still benefit from the mass of these tissues in terms of maximal shivering heat production, independently from their acclimation temperature. We also measured BMR in these birds to document maintenance costs. In this particular case, we expected that BMR variation across treatments would correlate with the mass of digestive and excretory organs if there was no major difference in muscle mass between treatments¹⁹. In contrast, we expected BMR to correlate with the mass of skeletal muscles if cold acclimated birds enlarged the size of these organs²⁶.

Material and Methods

Birds collection and acclimation. From January to April 2015, we captured 49 black capped chickadees using mist nets at two sites, the Forêt d'Enseignement et de Recherche Macpès, (48°19N, 68°30W) and lac à l'Anguille (48°25N, 68°25W), both in eastern Québec, Canada. These birds were brought into captivity at the avian facilities of the Université du Québec à Rimouski. Birds were held in individual cages (39 × 43 × 31 cm) and exposed to a constant photoperiod (10 L:14 D) for the remainder of the experiment. Birds consumed a diet of living mealworms and freshly-thawed crickets (0.20 g and 0.30 g per day, respectively), sunflower seeds, Mazuri small birds maintenance diet (MAZURI® exotic animal nutrition, USA) and water, which were available *ad libitum*. The birds also received vitamin supplements, daily (Electrolytes plus, Vetoquinol N.-A.INC, QC, Canada) and once per week (Poly-tonine A® complex, Vetoquinol N.-A.INC, QC, Canada) in their water. Our experimental groups were formed of 24 individuals maintained at -10°C (cold) and 25 individuals maintained at 27°C (thermoneutral zone of this species^{41,44}). Birds were

acclimated to these conditions for a minimum of 39 days (mean = 61.5, max = 84) after which we measured average daily food consumption over 6 days (same diet but excluding Mazuri) by subtracting the mass of food left in food trays in the morning from what had been offered the day before at the same time. Following the 6 days of food intake measurements, we proceeded with metabolic rate trials (see below). All bird manipulations have respected the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines and were approved by the animal care committee of the Université du Québec à Rimouski (CPA-60-15-160). They also have been conducted under scientific and banding permits from Environment Canada–Canadian Wildlife Service.

BMR and M_{sum} measurement. Because tissues collected on birds were also analyzed in another experiment that required fresh samples (results not shown, Milbergue *et al.*, in prep), our measurements sequence for metabolic rate was limited to recording BMR and M_{sum} on 8 birds per week, until all birds had been measured (49 days). Each day of respirometry trial involved measurement on four birds (2 from each treatment) and followed the protocols described in details by Lewden *et al.*⁴⁵ and Petit *et al.*^{8,26} where the animals VO_2 were measured using FoxBox oxygen analyzers (Sable Systems, Las Vegas, NV, USA). Each M_{sum} trials were conducted on two randomly chosen birds from a same temperature treatment and began approximately at 9:00 and at 12:30 (alternating treatments between measures). Trials began by weighing the birds (0.00 g, Scout Pro, Ohaus, NJ, USA) and placing each of them individually in a stainless steel metabolic chamber (volume = 1350 ml). The birds then received air during 20 min before being exposed to helox gas (21% oxygen, 79% helium) using a flow rate of $900 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ controlled by mass flow controllers (Omega, FMA 5400/5500, QC, Canada) calibrated with a Bubble-O-Meter (Dublin, OH, USA). We used a sliding cold exposure protocol⁴⁶, where ambient temperature was first set to either 0°C (cold group) or 10°C (thermoneutral group) and then ramped down by 3°C every 20 min. Trials ended when birds became hypothermic, which

was easily identifiable in real time as a steady decline in oxygen consumption for several minutes. Body temperature was immediately measured after taking birds out of their chamber using a thermocouple reader (NIST-traceable Omega model HH-25KC, QC, Canada) and a copper constantan thermocouple inserted into the cloacae, approximately 10 mm deep. Only data from birds showing a body temperature after trials lower or equal to 38.5°C ^{47,48} were used in the analyses. This removed five M_{sum} measurements from our sample. Body mass was again recorded at the end of trial and average body mass was used in statistical analyses on M_{sum} . After M_{sum} , birds were brought back to their cage and had access to food and water until BMR measurement, starting at around 19:00. BMR trials were done on all 4 birds at 30°C (thermoneutral zone^{41,44}) in chambers that received $500 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ of dry, CO_2 free air. Trials ended the following morning (at approximately 7:30). As for M_{sum} , body mass was measured prior to and after BMR measurement and the average was used in statistical analyses. Birds were then returned to their cage. Metabolic rates were calculated with the EXPEDATA software, v1.8.4 (Sable Systems, Las Vegas, NV, USA) using the equation 10.1 of Lighton⁴⁹. M_{sum} and BMR were calculated from the highest and lowest averaged 10 min of VO_2 . Because birds use lipids as metabolic fuel during shivering⁵⁰ and the duration of BMR trials (>720 min) insured that birds were post-absorptive at time of BMR measurement, we estimated heat production in Watts assuming an energy equivalent for lipid oxidation of $19.8 \text{ kJ}\cdot\text{l}^{-1} \text{ O}_2$ ⁵¹. Five individuals died of unknown cause during the experiment, leaving a final sample size of $n = 20$ (-10°C) and 18 (27°C) for BMR and $n = 18$ (-10°C) and 19 (27°C) for M_{sum} .

Organ collection. Birds were euthanized by decapitation in the 2 to 5 days following their respirometry trial (delay caused by measurements conducted on tissues in parallel to this experiment, Milbergue et al., in prep). The right and left pectoralis muscles, heart, liver, empty intestine, pancreas and gizzard were removed within minutes of the birds death and weighed (0.0001 g) with a precision balance (Cole-Parmer Symmetry, PA-Series,

Canada). These organs were placed in Eppendorf tubes and immersed in liquid nitrogen before being transferred to a -80°C freezer. Carcasses were preserved at -20°C until we completed dissections. This was done by removing and weighing the brain, lungs, kidneys, skin (feathers removed) and upper right and left leg muscles, considered as a single organ and including bones. The remaining carcasses were therefore composed mainly of skeletal muscles and bones. Organs were then freeze-dried (FreeZone 2.5, Labconco, Kansas city, KS, USA) for 2 days to obtain constant dry mass of tissues²⁶. Adipose tissues have low metabolic activity and can bias analyses on relationships between mass or body composition and metabolic rates when birds contain differing amounts of fat^{52,53}. We therefore extracted lipids from these samples with a Soxhlet apparatus using petroleum ether to obtain final lean dry mass of organs. It should be noted here that we do not have lean dry mass data for the heart as the entire organ was needed for tissue analyses (Milbergue et al., in prep). Wet mass is therefore presented for this organ. For pectoralis muscles and liver, since we used subsamples for tissue analyses and processed the remaining tissue as the other organs (freeze-drying and fat extraction), we recalculated lean dry mass of these organs in proportion to the original wet mass of the complete organ. In this experiment, we originally planned on obtaining ash-free lean dry mass for leg muscles and the remaining carcass but a technical problem during the burning of samples in a furnace led to the loss of a large number of samples. We therefore cannot present ash-free data.

Statistical analysis. Our analyses first tested whether birds differed between treatments before the temperature change. We thus used one-way ANOVAs to test for a treatment effect (cold or thermoneutral) on furcular fat score (estimated according to Gosler⁵⁴), structural body size and body mass measured prior to group formation. Structural body size was calculated as the first principle component (PC) from a principal component analysis combining variation in length measurements of head plus beak, tarsus, wing and

tail^{55–57}. To determine how thermal environments might have influenced body composition after acclimation, we ran ANCOVA models testing for the effect of thermal treatment on organ lean dry mass. Since structurally larger birds might also have larger organs, we included body size as a covariate in these models. We used the same approach to determine the influence of thermal treatments on BMR and M_{sum} . Models included the effect of time since capture to consider a potential influence of captivity duration, but this last variable was not significant and is therefore not considered further. The models were first run on whole BMR and M_{sum} . We then included structural body size or body mass as covariate but the size effect was not significant in any models thus this effect is not presented here.

To determine the influence of body composition on metabolic performance, analyses are typically based on stepwise regressions or a model selection approach where the influence of all body constituents on BMR and M_{sum} are compared and ranked in order of significance and importance of their effect (e.g.^{25,58}). However, results from these analyses depend on the variables included in models and missing variables can influence results⁵⁹. In the present case, we could not include lean dry heart mass in our analyses. However, although this organ typically represents only 1% of total body mass, the heart has been shown to significantly contribute to variation in both BMR^{25,60} and M_{sum} ^{19,25,26}. We therefore chose a simpler approach for our analyses. We conducted separate ANCOVA models including thermal treatment, lean dry mass of the organ (fresh mass for heart) and their interaction. These models were then ranked according to the Bayesian information criterion (BIC). Analyses testing for the effect of muscle tissues on metabolic rates were first conducted considering muscle groups separately. Models thus included either pectoralis muscles, leg muscles (including bones) or carcass (including bones) as independent variables. As leg muscles and carcass mass included bones and bone mass should closely correlate with structural body size, we also included body size as an additional covariate in these models to control for bone mass. Then, we combined pectoralis muscles, legs muscles and carcass to generate a “total muscle” variable and used

total muscle as our independent variable in the model. Here again, structural size was included as a covariate to control for bones mass. In all of these cases, however, the effect of structural body size was never found to be significant, likely because bones mass (measured as ash) only represents a small proportion of lean dry body mass in chickadees (27% of carcass mass, including all bones, based on data from²⁶). This effect is therefore not included in the models presented here.

Table 1.1: Least square means (\pm s.e.m) and differences between cold (-10°C : C) and thermoneutral (27°C : T) treatments for body composition variables in black-capped chickadees. Units are in grams except for food intake (g/day). Least square means (\pm s.e.m) and differences between cold (-10°C : C) and thermoneutral (27°C : T) treatments for body composition variables in black-capped chickadees. Units are in grams except for food intake (g/day).

Variable	Cold	Thermoneutral	F (df)	P	% difference (C relative to T)
Food intake	3.86 ± 0.09	2.69 ± 0.08	96.4 (1,45)	< 0.0001	43.5
Mass and fat					
Body mass	11.96 ± 0.16	12.25 ± 0.16	1.5 (1,47)	0.2	-2.4
Total organ fat mass	0.88 ± 0.07	1.25 ± 0.06	16.1 (1,35)	< 0.001	-29.6
Furcular fat mass	0.11 ± 0.01	0.15 ± 0.01	5.7 (1,35)	< 0.05	-26.7
Muscles					
LD pectoralis	0.41 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.97 (1,34)	0.33	5.1
LD legs ¹	0.23 ± 0.005	0.25 ± 0.004	9.2 (1,33)	< 0.01	-8.0
LD carcass ¹	1.21 ± 0.02	1.24 ± 0.02	0.83 (1,33)	0.37	2.4
LD total muscles ¹	1.86 ± 0.04	1.85 ± 0.04	0.0005 (1,33)	0.98	0.5
Cardio pulmonary					
Heart	0.16 ± 0.004	0.14 ± 0.004	12.0 (1,34)	< 0.001	14.3
LD lungs	0.025 ± 0.001	0.028 ± 0.001	6.4 (1,35)	< 0.05	-10.7
Digestive and excretory					
LD gizzard	0.087 ± 0.005	0.079 ± 0.005	1.35 (1,35)	0.25	10.1
LD intestine	0.039 ± 0.002	0.036 ± 0.002	1.6 (1,34)	0.22	8.3
LD liver	0.078 ± 0.004	0.066 ± 0.004	2.0 (1,25)	0.17	18.2
LD pancreas	0.0094 ± 0.0007	0.0048 ± 0.0007	23.6 (1,32)	< 0.0001	95.8
LD kidneys	0.030 ± 0.001	0.029 ± 0.001	0.21 (1,35)	0.65	3.4
Other					
LD skin ¹	0.11 ± 0.003	0.11 ± 0.003	0.01 (1,33)	0.91	0.0
LD brain	0.10 ± 0.001	0.11 ± 0.001	0.78 (1,35)	0.38	-9.1
Total LD body mass ¹	2.33 ± 0.05	2.30 ± 0.04	0.18 (1,33)	0.67	1.3

¹Includes bone mass and controls for structural body size (see text for details).

Table 1.2: Effects of thermal treatments, body mass on BMR and M_{sum} and least square means (\pm s.e.m) per treatment.

	Treatment		Body mass		Interaction		Cold	Thermoneutral	% difference
	F (df)	P	F (df)	P	F (df)	P	(Watts)	(Watts)	
BMR	7.15 (1,33)	< 0.05	0.0002 (1,33)	0.99	5.65 (1,33)	< 0.05	0.23 ± 0.005	0.22 ± 0.004	4.5
M_{sum}	36.8 (1,36)	< 0.0001	16, 1 (1,36)	< 0.001	-	-	1.65 ± 0.03	1.38 ± 0.03	19.6

Analyses were conducted using R Studio (3.3.1) and JMP Pro (12.0.1). In all analyses, we eliminated non-significant interactions and variables to obtain final models. Normality of model residuals was confirmed in using Shapiro-Wilk tests and we used Cook distance test to identify outlier values and remove them from analyses.

Results

Treatment effect on body composition. Birds from both groups did not differ prior to treatment. There was no significant effect of treatment on furcular fat score ($F_{1,47} = 2.4$, $P = 0.1$), structural body size ($F_{1,46} = 1.2$, $P = 0.3$) or body mass ($F_{1,47} = 0.97$, $P = 0.3$). Groups did not differ in sex ratio either ($\chi^2 = 0.19$, $P = 0.66$, sex determined during dissection). After 28 days of acclimation, differences were detected (Table 1.1). At the end of acclimation, cold-acclimated birds were eating 43.5% more food but nevertheless had, at the time of dissection, 27–30% less fat than individuals maintained at thermoneutrality (Table 1.1). Despite this difference in fat content, post-acclimation body mass did not differ significantly between treatments (Table 1.1). Among organs, only the heart (fresh mass), lungs, pancreas and leg muscles differed between experimental temperatures (Table 1.1). Cold-acclimated birds had a 10.7% and a 8.0% smaller lungs and legs muscles but had a

14.3% and a 95.8% larger heart and pancreas, respectively. No other organs differed between treatments, including pectoralis muscles, carcass, digestive and excretory organs. Total lean dry muscles mass differed by less than 1% between treatments (Table 1.1). Influence of temperature and body composition on metabolic performance. Cold-acclimated birds had a BMR 4.5% higher on average than individuals kept at thermoneutrality, but the temperature effect depended on body mass (interaction body mass*treatment, Table 1.2). Indeed, although the influence of body mass on BMR was clear at thermoneutrality (independent regression $r^2 = 0.61$, $n = 19$, $P < 0.0001$), this effect appeared uncoupled at $-10\text{ }^\circ\text{C}$ (independent regression: $P = 0.99$, Fig. 1.1a). Therefore, most birds kept in the cold had a BMR as high as the heaviest birds kept at thermoneutrality (Fig. 1.1a). Ranking independent ANCOVA models for relationship between organ mass and BMR revealed a clear influence of skeletal muscle mass on BMR (Table 1.3).

The model including total muscle mass (Fig. 1.1b) ranked first followed by the models including skin, carcass, leg and pectoralis muscle (Fig. 1.1c). Digestive, cardio-pulmonary and excretory organs all ranked after these organs and thus apparently had less influence on BMR variation (Table 1.2). Msum was 19.6% higher in cold-acclimated birds when considering the significant effect of body mass (Table 1.2, Fig. 1.2a). As for BMR, muscles had a prominent influence on Msum variation. Total muscles (Fig. 1.2b), pectoralis muscles (Fig. 1.2c), leg muscles and carcass were all positively correlated with Msum and ranked first based on BIC values for independent ANCOVA models (Table 1.4).

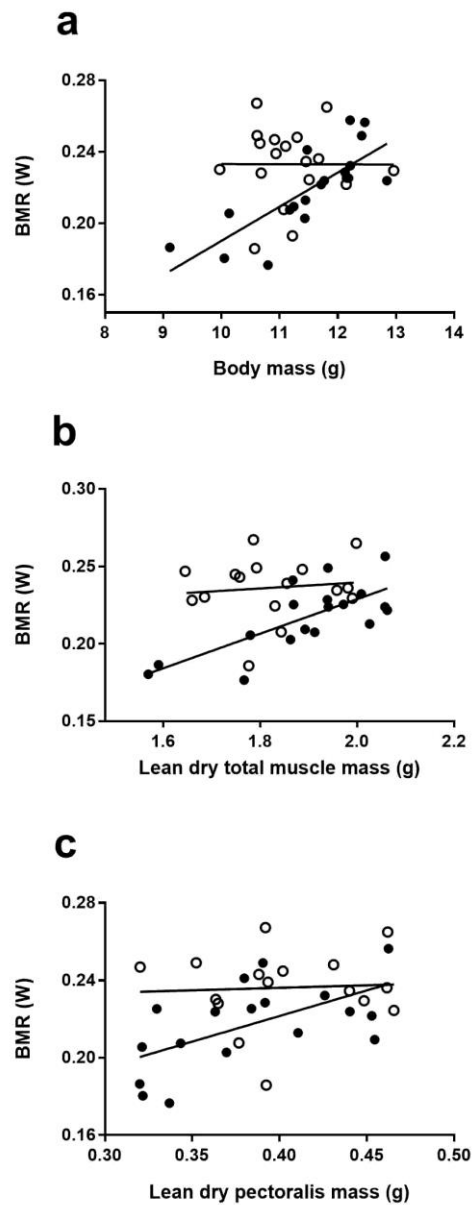


Figure 1.1. Relationships between BMR and body mass or lean dry mass of skeletal muscles in black-capped chickadees: (a) body mass, (b) total lean dry muscle mass (including bones), (c) lean dry pectoralis muscle mass (filled circles: 27°C, open circles: -10°C).

Discussion

In this experiment, we expected higher thermogenic capacity in cold-acclimated birds relative to individuals kept at thermoneutrality and predicted that this difference would not result from larger skeletal muscles in the cold. Our data support this hypothesis as cold-acclimated individuals had an M_{sum} 20% higher but had smaller leg muscles and did not develop larger pectoralis, carcass or total muscles than birds kept at 27°C. We also expected that variation in BMR would correlate with digestive and excretory organs if there were no major differences in muscle mass between treatments, or with skeletal muscles if their development was part of the response to cold. This hypothesis was only partially supported since skeletal muscles did correlate positively with BMR across treatment despite a lack of increase in muscle mass in the cold. Birds acclimated to -10°C consumed on average 44% more food per day during the last 6 days of acclimation than individuals kept at 27°C. They also had 5% higher maintenance costs, based on average BMR, and 20% higher thermogenic capacity, based on average M_{sum} . Therefore, the cold treatment was associated with considerable demands for thermoregulation and a consequent physiological response.

Table 1.3: Correlations between BMR and body composition. Results are from final ANCOVA models, including lean dry mass of organ and treatment as variables.

	Organ		Treatment		Interaction		Adjusted r ²	BIC	ΔBIC
	F (df)	P	F (df)	P	F (df)	P			
Total muscles ¹	9.8 (1,31)	< 0.01	13.7 (1,31)	< 0.001	-	-	0.33	-163.4	-
Skin	9.0 (1,31)	< 0.01	11.9 (1,31)	< 0.01	-	-	0.32	-162.7	-0.7
Carcass ¹	8.9 (1,31)	< 0.01	14.6 (1,31)	< 0.001	-	-	0.32	-162.6	-0.8
Legs ¹	6.4 (1,31)	< 0.05	14.5 (1,31)	< 0.001	-	-	0.28	-160.5	-3.0
Pectoralis	4.9 (1,31)	< 0.05	5.1 (1,31)	< 0.05	-	-	0.24	-159.0	-4.4
Lungs	1.8 (1,30)	0.19	8.0 (1,30)	< 0.01	5.6 (1,30)	< 0.05	0.26	-157.2	-6.2
Brain	2.6 (1,31)	0.11	9.1 (1,31)	< 0.01	-	-	0.19	-156.8	-6.6
Kidneys	2.3 (1,31)	0.14	7.1 (1,31)	< 0.05	-	-	0.19	-156.5	-6.9
Heart (wet)	0.99 (1,30)	0.33	6.1 (1,30)	< 0.05	-	-	0.24	-156.3	-7.1
Intestine	6.1 (1,31)	< 0.05	3.7 (1,30)	0.06	-	-	0.17	-155.6	-7.8
Gizzard	0.74 (1,31)	0.4	5.9 (1, 31)	< 0.05	-	-	0.15	-154.9	-8.6
Pancreas	1.2 (1,28)	0.3	6.9 (1,28)	< 0.05	-	-	0.15	-138.6	-24.8
Liver	0.12 (1,22)	0.7	2.1 (1, 21)	0.16	-	-	-0.04	-102.9	-60.6

¹Includes bone mass (see text for details).

Nevertheless, body mass did not differ between treatments. In fact, although we found the expected larger heart (based on wet mass) and larger pancreas in cold-acclimated birds, these individuals carried 27–30% less body fat and had smaller lungs and leg muscles than birds acclimated to thermoneutral conditions. The other components of lean body mass did not differ significantly between temperatures although most had higher mean values in cold acclimated birds (Table 1.1). Similar body masses between contrasting thermal treatments have been reported before but previous captive experiments used milder cold exposure (e.g. 15°C^{38, 61,62}). However, in a study using white throated sparrows, Barceló et al.¹⁹ reported that, when controlling for the effects of food consumption and body size, birds exposed to

-8°C had less body fat reserves, despite their heavier mass, compared to individuals kept at thermoneutrality (28°C). Therefore, it appears, as suggested by Barceló et al.¹⁹, that the cold treatment experienced by our chickadees represented a considerable energy challenge as for a given amount of food consumed, less nutrients could be converted into fat reserves under cold conditions. Larger pancreases in the cold are likely attributable to higher food and protein intake^{19,63,64}, but the exact causes for the smaller lungs and leg muscles are unclear. As birds maintained at -10°C tended to be less active in their cage (M. Milbergue, unpublished observations), this could potentially be attributed to selective nutrient investment under a constrained energy budget where some organs like the heart and liver (+14% and +18% in the cold respectively) could be favored at the expense of others. The cold acclimated phenotype was associated with 5% higher maintenance costs on average but this effect differed between treatments when considering the influence of body mass. Indeed, we observed the typical relationship between BMR and body mass in birds at thermoneutrality but this relationship was uncoupled in cold-acclimated birds (Fig. 1a). This was not a simple effect of the range of data since both BMR and body mass spanned roughly the same range of values in both treatments (Fig. 1.1a). It was not a statistical “dilution” effect of body fat⁵³ either since this effect lowers mass-corrected BMR values in fatter birds⁵³, which in the present case were the birds kept at thermoneutrality. For this effect to take place, the lightest birds in the warm treatment (those with the lowest BMR) would have had to be the fattest, which was not the case (positive relationship between body and total organ fat mass at 27°C , $r^2 = 0.26$ $n = 19$, $P < 0.05$). Clearly, physiological changes in cold-acclimated birds has led to the observed pattern. The exact mechanism is unknown but, given the uncoupled effect of body mass on BMR, these changes are likely to have occurred at the cellular level^{17,10,18,23,24,65–67}. In the observed scenario where temperature did not influence skeletal muscle mass, we expected a significant effect of digestive and excretory organs on BMR^{17,19}. Instead, total mass of muscles across treatments were positively related to maintenance costs. Despite the elevated food intake in

the cold, none of the digestive and excretory organs, except pancreas, responded significantly to temperature and all of these organs ranked after skeletal muscles for their importance on explaining BMR. Skeletal muscles represent 73% of ash-free lean dry body mass in free-living wintering chickadees (Petit and Vézina, unpublished data) and pectoralis muscles alone represented 17% of total lean dry body mass in our birds (Table 1.1). Therefore, without major changes in digestive and excretory organs, the energy consumed by resting skeletal muscles in birds under standard BMR conditions likely overshadowed the influence of other metabolically active organs such as the gut, liver or kidneys. This correlation between pectoralis or skeletal muscles and BMR has previously been observed in other avian species^{25,62,68,69}, including free-living black capped chickadees²⁶.

With regards to the relationship between skeletal muscle mass and BMR, an important point to consider is that it was only apparent in the thermoneutral group (see Fig. 1.1b,c). Independent regression models for total skeletal muscles, pectoralis, leg muscles and carcass were all significant at 27°C ($r^2 = 0.35-0.54$, all $P < 0.01$) but the same analyses for birds acclimated to -10°C yielded no significant relationships ($P > 0.6$ in all cases). As stated earlier, and since most of lean body mass was made of skeletal muscles, this uncoupling in cold acclimated birds is likely resulting from changes in metabolic intensity taking place at the cellular level. For a given body mass, cold-acclimated black capped chickadees had 20% higher thermogenic capacity than birds maintained at thermoneutrality (Fig. 1.2a). That difference did not result from larger skeletal muscles since these organs did not differ between groups (<1% difference in total muscle mass) or were smaller (legs) in cold-acclimated birds (Table 1.1).

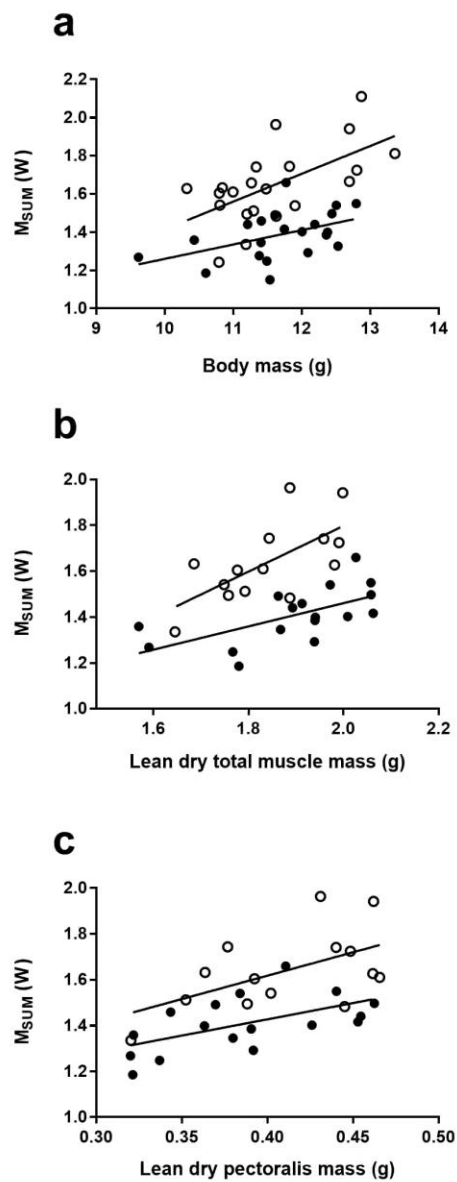


Figure 1.2. Relationships between M_{SUM} and body mass and lean dry mass of skeletal muscles in black-capped chickadees: (a) body mass, (b) total lean dry muscle mass (including bones), (c) lean dry pectoralis muscle mass (filled circles: 27°C, open circles: -10°C).

The combined mass of the heart and lungs has previously been shown to correlate with M_{sum} variation across seasons in our chickadee population²⁶. Recent evidence also suggests that cardiovascular functions could play a significant role in thermogenic capacity as larger hearts^{18,25,26,31,37,38,43,60,61} and upregulated.

With regards to the relationship between skeletal muscle mass and BMR, an important point to consider is that it was only apparent in the thermoneutral group (see Fig. 1.1b,c). Independent regression models for total skeletal muscles, pectoralis, leg muscles and carcass were all significant at 27°C ($r^2 = 0.35\text{--}0.54$, all $P < 0.01$) but the same analyses for birds acclimated to -10°C yielded no significant relationships ($P > 0.6$ in all cases). As stated earlier, and since most of lean body mass was made of skeletal muscles, this uncoupling in cold acclimated birds is likely resulting from changes in metabolic intensity taking place at the cellular level. For a given body mass, cold-acclimated black capped chickadees had 20% higher thermogenic capacity than birds maintained at thermoneutrality (Fig. 1.2a). That difference did not result from larger skeletal muscles since these organs did not differ between groups (<1% difference in total muscle mass) or were smaller (legs) in cold-acclimated birds (Table 1.1). The combined mass of the heart and lungs has previously been shown to correlate with M_{sum} variation across seasons in our chickadee population²⁶. Recent evidence also suggests that cardiovascular functions could play a significant role in thermogenic capacity as larger hearts^{18,25,26,31,37,38,43,60,61} and upregulated cardiac physiology^{25,70,71} are often found in association with cold acclimation or acclimatization in birds. In the current study, however, the lungs were smaller and the heart (based on wet mass) was larger in cold acclimated birds, but the mass of these organs did not correlate with M_{sum} . Therefore, if cardiorespiratory function influences or limits thermogenic capacity²⁵, its effect might result from system performance rather than from organ size. Complementing previous observations in black capped chickadees⁴³, dark-eyed juncos (*J. hyemalis*)^{38,39} and white-throated sparrows (*Z. albicollis*)¹⁹, our results support

the hypothesis that the enlargement of skeletal muscles is not an absolute prerequisite for improving thermogenic capacity in small birds. Enhancement of maximal heat production in cold-acclimated chickadees could therefore result from changes occurring at the muscle cell level^{19,39,71–73} and these could take several forms. For example, Teulier et al.⁷² showed that muscovy ducklings (*Cairina moschata*) were able to increase heat production before the onset of leg muscles shivering at temperatures below the lower critical temperature (but note that this may not be the case in black-capped chickadees⁷⁴).

Table 1.4: Correlations between M_{sum} and body composition. Results are from final ANCOVA models, including lean dry mass of organ and treatment as variables. All interactions were non-significant.

	Organ		Treatment		Adjusted r^2	BIC	Δ BIC
	F (df)	P	F (df)	P			
Total muscles ¹	14.3 (1,25)	< 0.001	31.7 (1,25)	< 0.0001	0.33	-26.85	-
Pectoral	12.0 (1,25)	< 0.01	13,9 (1,25)	< 0.001	0.32	-25.2	-1.65
Legs ¹	10.7 (1,25)	< 0.01	31.7 (1,25)	< 0.0001	0.32	-24.1	-2.75
Carcass ¹	10.3 (1,25)	< 0.01	29.1 (1,25)	< 0.0001	0.28	-23.8	-3.05
Skin	4.2 (1,25)	0.05	20.5 (1,25)	< 0.0001	0.24	-18.5	-8.35
Brain	3.8 (1,25)	0.06	20.5 (1,25)	< 0.0001	0.26	-18.1	-8.75
Lungs	2.9 (1,25)	0.10	19.7 (1,25)	< 0.001	0.19	-17.2	-9.65
Pancreas	1.7 (1,22)	0.21	19.6 (1,22)	< 0.001	0.19	-15.9	-10.95
Gizzard	0.92 (1,25)	0.35	13.7 (1,25)	< 0.01	0.24	-15.2	-11.65
Kidneys	0.1 (1,25)	0.75	15.0 (1,25)	< 0.001	0.17	-14.3	-12.55
Heart (wet)	1.0 (1,24)	0.32	8.8 (1,24)	< 0.01	0.15	-13.5	-13.35
Intestine	0.3 (1,24)	0.61	12.0 (1,24)	< 0.01	0.15	-12.7	-14.15
Liver	0.2 (1,17)	0.65	15.1 (1,17)	< 0.01	-0.04	-11.1	-15.75

¹ includes bone mass (see text for details)

This was associated with an upregulation of avian uncoupling proteins (avUCP) in these same muscles, although the thermogenic role of avUCP could not be confirmed. Mathieu-Costello et al.⁷⁰ further reported that king pigeons (*Columba livia*) decreased aerobic muscle fiber diameter and increased muscle vascularization and mitochondrial volume density in response to cold acclimation. Similarly, Stager et al.³⁹ observed an upregulation of pectoralis muscle genes known to play a role in muscle angiogenesis and repair in captive cold-acclimated juncos that had shown no increase in muscle mass. Although M_{sum} was higher in cold acclimated birds for a given skeletal muscle mass (Fig. 2b,c), we also found, as predicted and previously observed in this and other species^{10,26,32} significant correlations between M_{sum} and lean dry mass of muscles in both cold and thermoneutral groups (Table 4, Fig. 2b,c). Consequently, while upregulating cell functions seems to be a requirement for improving thermogenic capacity in chickadees (see also¹⁹), our data also showed that birds with larger muscles still experienced the added benefit of generating more heat under acute cold stress and that this was independent from their acclimation temperature. If larger muscles are not an absolute prerequisite for improving thermogenic capacity, then why are chickadees typically found with larger flight muscles in winter compared to summer [e.g. refs^{26,31}]? One possibility is that winter locomotion for active foraging and daily fattening during cold, short working days requires a different flight pattern leading to larger flight muscles. Given that muscle mass correlates positively with M_{sum} at all temperatures, this hypothesis could also potentially explain why a number of individuals in our wild source population were found to maintain M_{sum} levels above that required to guarantee intra-winter survival⁷⁵ if these individuals were also the most active in that population.

In sum, our experimental data showed a clear influence of muscle mass on both maintenance energy costs, measured as BMR, and maximal thermogenic capacity, measured as M_{sum} , in black-caped chickadees. Our results also showed that, although large

muscles may be beneficial in terms of heat production capacity, an increase in muscle size is clearly not required to elevate M_{sum} in these birds. Instead, improvement in thermogenic capacity appear to be related to cellular-level adjustments during cold-acclimation. The mechanisms underlying these adjustments deserves further study.

Acknowledgements We are grateful to the Corporation de la Forêt d'Enseignement et de Recherche de Macpès, who granted us access to the field facilities for capturing the birds used in this study. We thank Mikaël Jaffré, Aymeric Bodin and Gael Lafenêtre for their help in capturing the birds as well as Véronique Desrosiers, Claire Bottini and Karine Dubois for their help with dissections, organ processing and data entry. We are also grateful to Lyette Régimbald for the maintenance of captive birds and for food intake measurement as well as to Jonathan Coudé for his help with laboratory material. Alain Caron provided precious statistical advice. This work was funded by a Team Research Project grant from the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FRQNT) and by Discovery grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to F.V. and P.U.B. This work also benefited from a Leader Opportunity Fund award from the Canada Foundation for Innovation (CFI) to F.V. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

CHAPITRE II

**DE QUELLES FAÇONS LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES SONT-
ELLES IMPLIQUÉES DANS LA CAPACITE THERMOGÉNIQUE ET LE
MÉTABOLISME BASAL CHEZ DES OISEAUX DE PETITE TAILLE?**

How does mitochondrial functions relate to thermogenic capacity and basal metabolic rate in small birds?

Myriam S. Milbergue^{1,2,3,4}, Véronique Desrosiers¹, François Vézina^{1,2,3,4}

Pierre U. Blier^{1,2,4}

1 Département de biologie, chimie et géographie, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Québec, Canada. **2** Groupe de recherche sur les environnements nordiques BORÉAS, Rimouski (Qc), Canada. **3** Centre d'études nordiques, Rimouski, Québec, Canada. **4** Centre de la Science de la Biodiversité du Québec, Rimouski, Québec, Canada.

Contributions: Conception de l'expérience: F.V, P.U.B, M.M, V.R.;

Réalisation de l'expérience: M.M, V.R.; Analyse des données: M.M;

Financement: F.V, P.U.B; Rédaction: M.M, F.V., P.U.B.

Résumé

Nous avons investigué le rôle des fonctions mitochondriales (la fuite de protons et la phosphorylation oxydative) dans la réponse aviaire de thermorégulation au froid. En utilisant des mésanges à tête noire (*Poecile atricapillus*) acclimatées au froid (-10°C) et à thermoneutralité (27°C), nous avons mesuré la capacité respiratoire mitochondriale du muscle pectoral, un organe thermogénique, et du foie en tant qu'organe non-impliqué dans la thermogénèse. Nous nous attendions à observer chez les oiseaux acclimatés au froid une régulation à la hausse de la capacité respiratoire du muscle pectoral qui seraient le résultat d'ajustements quantitatifs (densité mitochondriale) et/ou qualitatifs (phénotype mitochondrial) de ces fonctions. Nous avons aussi prédit que ces changements seraient corrélés à la capacité thermogénique (M_{sum}) et au métabolisme basal (BMR). La capacité de respiration mitochondriale a été mesurée par le le taux de respiration induit par la fuite de protons et le taux de respiration induit par l'activité du complexe I (OXPHOS_{CI}) et du complexe I+II (OXPHOS_{CI+CI}) dans le foie et le muscle pectoral. L'activité de la citrate synthase (CS) et de la cytochrome C oxydase (CCO) ont également été utilisé comme marqueurs de la densité mitochondriale. Nous avons trouvé une augmentation de 26% de l'activité de la CS dans le muscle pectoral total et de 39% pour l'activité de la CCO dans le foie total des mésanges acclimatées au froid comparativement à celles acclimatées au chaud. Les traitements thermiques n'ont pas altéré la capacité de respiration mitochondriale dans le pectoral mais nous avons détecté une corrélation positive entre le M_{sum} et la fuite de protons dans le muscle des oiseaux acclimatés au froid. Le BMR chez les oiseaux acclimatés au froid corrélait avec OXPHOS_{CI} dans le foie d'une façon différente entre les traitements. Par conséquent, cette étude présente certaines évidences que les aspects quantitatifs et qualitatifs des fonctions mitochondriales diffèrent entre les températures d'acclimatation chez les oiseaux. Certaines de ces fonctions covarient avec la capacité thermogénique et le métabolisme basal en dépendant de la température et de la masse corporelle.

Mots-clés: acclimatation, froid, mitochondries, M_{sum} , phosphorylation oxydative, fuite de protons, oiseaux.

Abstract

We investigated the role of mitochondrial functions (proton leak and oxydative phosphorylation) in avian thermoregulatory response to cold environment. Using black capped chickadees (*Poecile atricapillus*) acclimated to cold (-10°C) and to thermoneutrality (27°C), we measured mitochondrial respiratory capacity of pectoralis muscle, a thermogenic organ, and liver as an organ non-involved in thermogenesis. We expected to observe in cold acclimated birds an upregulation of pectoralis muscle respiratory capacity that would be the result of quantitative (mitochondrial density) and/or qualitative (mitochondrial phenotype) adjustments of these functions. We also predicted that these changes would correlate with thermogenic capacity (M_{sum}) and basal metabolic rate (BMR). Mitochondrial respiration capacity was measured as respiration rate triggered by the proton leak and by the respiration rate triggered by activity of complex I (OXPHOS_{CI}) and complex I + II (OXPHOS_{CI+CII}) in liver and pectoralis muscle. The activity of citrate synthase (CS) and cytochrome c oxidase (CCO) were also used as markers of mitochondrial density. We found 26% higher CS activity in the whole pectoralis muscle and 39% higher CCO activity in the whole liver of cold acclimated chickadees relative to that of birds kept at thermoneutrality. Thermal treatments did not alter mitochondrial respiratory capacity in pectoralis muscle but M_{sum} correlated positively with mitochondrial leak in the muscle of cold acclimated birds. The BMR in cold acclimated birds correlated with OXPHOS_{CI} in liver with a pattern that differed between treatments. Consequently, this study presents some evidence that quantitative and qualitative aspects of mitochondrial functions differ between acclimation temperatures states in birds. Some of these functions covary with thermogenic capacity and basal maintenance costs depending on temperature and body mass.

Keywords: acclimation, cold, mitochondria, M_{sum} , oxidative phosphorylation, proton leak, birds.

Introduction

Upregulation of thermogenesis in small wintering avian species is typically associated with an enlargement of skeletal muscles, heart and digestive organs and with elevated physiological maintenance costs (basal metabolic rate: BMR) and maximal heat production capacity (summit metabolic rate: M_{sum} ; Swanson and Liknes 2006; McKechnie 2008; McKechnie and Swanson 2010; Swanson and Vézina 2015; McKechnie et al. 2015; Swanson et al. 2017). As shivering appears to be the main thermogenic mechanism used by birds living in cold environments (Saarela et al. 1995; Hohtola et al. 1998; Marjoniemi and Hohtola 1999; Hohtola 2004), the seasonal increase in muscles mass is often interpreted as the driver of M_{sum} variation. This interpretation is supported by a number of studies showing that seasonal elevations of M_{sum} are indeed associated with parallel increases of muscle mass (O'Cooper 1995; Cooper 2002; Vézina et al. 2011; Swanson et al. 2013; Petit et al. 2014; Swanson et al. 2014a; Swanson and Vézina 2015) and by correlations between muscle mass and M_{sum} at the individual level (Vézina et al. 2011; Swanson et al. 2013; Petit et al. 2014; Barceló et al. 2017; Milbergue et al. 2018). However, recent studies have suggested that metabolic intensity, the energy consumed per unit mass of tissue (Vézina and Williams 2005; Swanson 2010), may also play a significant role in explaining variation in both BMR and M_{sum} (Swanson et al. 2014a; Swanson et al. 2014b; Stager et al. 2015; Milbergue et al. 2018) and that mitochondrial functions could be a key player in this phenomenon (Roussel et al. 1998; Zheng et al. 2008; Teulier et al. 2010; Zheng et al. 2014; Stager et al. 2015; Vézina et al. 2017).

Oxidative phosphorylation is a major mitochondrial process involving the electron transport system (ETS), a set of proteins complexes that transfers electrons and creates a proton-driving force from either side of mitochondrial inner membrane, which is then used to generate ATP, the energetic molecule supporting most of cellular processes such as muscle contractions in shivering (Nicholls and Ferguson 1992; Silva 2003; Divakaruni and Brand 2010). Higher capacity of oxidative phosphorylation could thus allow higher muscle activity (shivering), as ATP is required for actine-myosine-ATPase and Ca^{2+} ATPase activities. Moreover,

as oxidative phosphorylation do not succeed to transfer all the energy from the food maintained in chemical bond into ATP (Rolfe and Brown 1997; Hill et al. 2004), heat is produced and this production can be magnified by a proton leak through inner mitochondrial membrane (Brand et al. 2005; Divakaruni et Brand, 2010). In mammals, mitochondrial proton leak is estimated to represent up to 20-30% of basal metabolism (Rolfe and Brand 1996, 1997; Rolfe et al. 1999; Divakaruni and Brand 2011) and to be involved in thermogenesis in response to cold through activation of uncoupling proteins (Collin et al., 2003; Cannon and Nedergaard, 2004).

In birds, the use of leak in non-shivering thermogenesis (NST) has not yet been clearly demonstrated. Nevertheless, cold environment can induce higher mitochondrial respiratory activity in birds. This has been demonstrated by increases in the activity of citrate synthase (CS), a regulatory enzyme of the Krebs cycle, and of cytochrome c oxidase (CCO), the last complex of the ETS, in the liver, kidneys and muscles of small passerines (Zheng et al. 2008; Liknes and Swanson 2011; Vézina et al. 2017). Increases of leak respiration following exhaustion of ADP (state 4 respiration of mitochondria) has also been observed in liver or muscles of cold acclimatized or acclimated chinese bulbul (*Pycnonotus sinensis*), tree sparrow (*Passer montanus*) and duckling (*Cairina moschata*) (Roussel et al. 1998; Zheng et al. 2008; Teulier et al. 2010; Zheng et al. 2014). However, the involvement of these cellular adjustments in whole organism metabolic response to cold still needs clarification. Indeed, although some studies have investigated the relationship between M_{sum} variation and mitochondrial properties such as lipids transport across membranes (Stager et al. 2015; Vézina et al. 2017; Zhang et al. 2017) and CS activity (Swanson et al. 2013; Swanson et al. 2014b; Stager et al. 2015; Vézina et al. 2017; Zhang et al. 2017), to our knowledge no studies have investigated the potential influence of the proton leak and oxidative phosphorylation capacity on M_{sum} .

Mitochondrial respiratory capacity can be adjusted in two ways. Firstly, through an increase in mitochondrial density (quantitative change of total mitochondrial volume and/or surface) and therefore in enzyme content and

maximal enzymatic activity. Such an increase typically enhances aerobic capacity (Johnston et al. 1998) and is known to occur both in mammals and birds in association with winter or experimental cold conditions (Mathieu-Costello et al. 1998; Nisoli et al. 2003; Zheng et al. 2008, 2014). Alternatively, or concomitantly, changes of respiratory capacity could also occur through adjustments of the mitochondrial structure and function (qualitative change). Because of their respective location in the mitochondria (matrix and inner membrane), CS and CCO activities can be used as proxies of mitochondrial volume and surface density, respectively, and thus as proxies of tissue mitochondrial content (Picard et al. 2011 and 2012; Larsen et al. 2012; Munro et al. 2013), which allows for quantitative evaluation of mitochondrial adjustments. On the other hand, reporting mitochondrial respiration per unit CS and CCO partly controls for mitochondrial content and therefore allows for studying changes in mitochondrial phenotype. This approach has been used in fishes, rats, humans and bivalves (Salin et al. 2016; Picard et al. 2010; Picard et al. 2011*b*; Rabøl et al. 2010; Munro et al. 2013) but studies on birds are scarce.

In a recent study (Milbergue et al. 2018), we found that captive cold-acclimated (-10°C) black-capped chickadees (*Poecile atricapillus*) increased their M_{sum} by 20%, compared to individuals kept at thermoneutrality (27°C), without changing the mass of their pectoralis or total skeletal muscles and we suggested that the observed improvement in thermogenic capacity required an upregulation of cell functions. Here, we present a follow-up study where we documented quantitative and qualitative changes in mitochondrial respiratory capacity (oxidative phosphorylation and leak) in the liver and pectoralis muscles of these same birds with the aim of shedding light on the potential mechanisms involved. Pectoralis muscle is a thermogenic organ because of shivering and potentially of non-shivering thermogenesis that operate in this tissue. Liver, although not an organ involved in thermoregulation (Barceló et al. 2017) is used because of its influence on BMR (Williams and Tieleman 2000; Zheng et al. 2008; Barceló et al. 2017) and as a comparative. If the observed improvement of thermogenic capacity resulted from changes in mitochondrial functions, we expected to find higher oxidative phosphorylation and/or leak in the cold and that these parameters would be

positively correlated with M_{sum} . As changes in metabolic intensity occurring with thermal acclimation can influence energy consumption in a resting state, we also investigated potential relationships between mitochondrial properties and BMR variation. In this particular case, we predicted to observe positive relationships between BMR and parameters of oxidative phosphorylation (Zheng et al. 2008; Zheng et al. 2013; Peña-Villalobos et al. 2014; Zhou et al. 2016) as well as leak, as up to 15-30% of BMR variation has been explained by leak in pectoralis muscle and liver of rats (Rolfe and Brown 1997; Rolfe et al. 1999) and because significant correlations have been found between BMR and leak in birds (Zhou et al. 2016).

Material and methods

Animals

Wild black capped chickadees were captured at the Forêt d'enseignement et de recherche de Macpès (48°19N, 68°30W) and lac à l'Anguille (48°25N, 68°25W), both in eastern Québec, Canada. They were then held in individual cages (39 cm × 43 cm × 31 cm) at the avian facilities of the Université du Québec à Rimouski under a constant photoperiod (10L:14D). Birds had *ad libitum* access to sunflower seeds, Mazuri small birds maintenance diet (MAZURI® exotic animal nutrition, USA) and water. They were fed with 0.20g of living mealworms and 0.30g of freshly thawed frozen crickets each day. They also received a supplement of vitamins daily (Electrolytes plus, Vetoquinol N.-A.INC, QC, Canada) and once per week (Poly-tonine A® complex, Vetoquinol N.-A.INC, QC, 17 Canada) in their water. Our experimental groups were formed of 24 individuals acclimated to -10°C (cold) and 25 individuals acclimated to 27°C (thermoneutral zone of this species, Rising and Hudson 1974, Cooper and Swanson 1994) for a minimum of 28 days before the experiment. All bird manipulations have respected the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines and were approved by the animal care committee of the Université du Québec à Rimouski

(CPA-60-15-160). They also have been conducted under scientific and banding permits from Environment Canada–Canadian Wildlife Service.

BMR and M_{sum} measurement

Following thermal acclimation, we carried out metabolic rate measurements using the protocol and respirometry setup described by Milbergue et al. (2018) with measurements conducted on 4 birds per day (2 per trial). Briefly, each M_{sum} trials was conducted on two randomly chosen birds from a same temperature treatment and began approximately at 9:00 and at 12:30 (alternating treatments between measures). Trial began by exposing the birds, in individual stainless steel metabolic chambers (volume = 1350 ml), to temperatures declining by 3°C every 20 minutes in a 79% helium, 21% oxygen environment (flow rate = 900 ml.min⁻¹, start temperature = 3°C for cold acclimated birds and 10°C for birds from the thermoneutral treatment). Trial ended when birds became hypothermic, which was identifiable as a decline in oxygen consumption for several minutes and confirmed by body temperature measured immediately after taking birds out of their chamber

After M_{sum}, birds were brought back to their cage and had access to food and water until BMR measurement, which were conducted on all 4 birds starting at around 19:00 (temperature = 30°C, within the thermoneutral zone, Rising and Hudson 1974, Cooper and Swanson 1994). Trials ended the following morning (at approximately 7:30). For both M_{sum} and BMR, body mass was measured prior to and after measurement and the average was used in analyses. Birds were then returned to their cages.

Permeabilization of hepatocytes and muscles fibers

Birds were euthanized by decapitation and biopsies of the right pectoralis muscle and liver were sampled in the first 10 min of the bird's death and weighed with a precision balance (Cole-Parmer Symmetry, PA-Series; 0.0001g). These

fresh biopsies were then immediately immersed in an ice-cold wash and preservation solution (in mM: 2.77 CaK₂EGTA, 7.23 K₂EGTA, 6.56 MgCl₂, 20 taurine, 0.5 DTT, 50 potassium-methane sulfonate, 5.77 Na₂ATP, 15 creatine phosphate, and 20 imidazole; pH 7.1, solution I; Scott et al. 2009). We triturated biopsies in this solution using dissecting probes to help the penetration of the liquid, and transferred them in a permeabilizing solution (mix of solution I and of 50 µg/ml of saponin) and stirred for 30 min (Pesta and Gnaiger 2011). Tissues were then put in a respiration solution (in mM: 0.5 EGTA, 3 MgCl₂, 60 K-lactobionate, 20 taurine, 10 KH₂PO₄, 20 HEPES, 110 sucrose and 1 g/L fatty acid-free BSA; pH 7.1, solution II; Kuznetsov et al. 2002), were triturated again with dissecting probes and were leaved to stir for 10 min to wash out endogenous adenine nucleotides and creatine. After drying them quickly on a soft paper, we weighed tissues using an analytical balance (Mettler Toledo, Canada).

Mitochondrial respiratory measurements

We inserted hepatocytes and muscles fibers (from 0.7 to 2.7 mg wet mass) in respiration chambers of a high-resolution respirometer (Oroboros Oxygraph-2k, Innsbruck, Austria), in 2 ml of respiration solution (II) at 35°C under continuous stirring. Oxygen, glutamate (10 mM) and malate (10 mM) were injected in chambers to stimulate non-phosphorylating respiration (i.e. LEAK, the mitochondrial respiration in absence of ATP production). Then stepwise additions of ADP (5 mM) and succinate (10 mM) were conducted to measure OXPHOS, which is the respiration rate induced by the activation of NADH-dehydrogenase (CI) and of succinate-dehydrogenase (CII), which provides electrons for the ETS. Stable rate of O₂ consumption was reached after 5 to 30 min between each addition of substrates or inhibitors. In preliminary trials, we tried to stimulate leak and oxydative phosphorylation with pyruvate+malate and with lipidic substrates (acetyl, octanoyl, palmitoyl carnitines). None of these substrates induced significant respiration rate during oxidative phosphorylation. Activity of LEAK,

OXPHOS_{CI} and OXPHOS_{CI+CII} are presented as pmol O₂.sec⁻¹.mg⁻¹ of wet tissue, as well as values calculated for the whole tissue.

CCO and CS activity assays in liver and pectoralis muscle homogenates

Part of the pectoralis muscle and liver biopsies were frozen in liquid N₂ around 10 min after extraction and stored at -80°C. Later, the frozen tissues were weighed and chopped with a razor blade and then homogenized on ice in 9 volumes of homogenization buffer (in mM: 2 EDTA, 100 TRIS-HCl and 0.05% Tween-20; pH 7.5) using an Heidolph DIAX 900 (Sigma-Aldrich, USA) blender for 3x10s for pectoralis muscle and 2x10s for liver, at 40% of full power. The homogenates were then centrifuged at 4000 g for 5 min in a refrigerated centrifuge (Eppendorf 5810R, Germany) to pellet down contractile proteins and cellular debris and to recover the supernatant. Part of the homogenate supernatant was stored to -80°C to later assays for proteins content in our samples (see below).

CCO and CS activities were assayed according to Thibeault et al. (1997) with a Perkin Elmer spectrophotometer at 35°C. The CCO assay medium contained 100 mM potassium phosphate, 100 µM cytochrome C which was reduced with 500 mM dithiotreitol at pH 8.0 (final concentration: 4.5 mM). Enzyme activity was calculated by following oxidation of reduced cytochrome c using an extinction coefficient of 29.5 ml.cm⁻¹.µmol⁻¹ at 550 nm. The CS assay medium contained 100 mM Tris, 2 mM EDTA, 0.1 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 0.2 mM acetyl CoenzymeA (Acetyl CoA) and 0.5 mM oxaloacetic Acid (OAA), at pH 8.0. Enzyme activity was calculated using an extinction coefficient of 13.6 ml.cm⁻¹.µmol⁻¹ at 412 nm. All enzyme assays were run in quadruplicate and activities are presented in U.mg⁻¹ of proteins (U=µmol.min⁻¹) and as total activity for the whole organ.

Proteins content quantification

Total proteins concentration of the pectoralis muscle and the liver were determined using the bicinchoninic acid (BCA) method (Walker 1994). All protein assays were run in triplicate with an incubation time of 30 min at 37°C. BSA was used for standards.

Statistical analysis

Our analyses first tested whether thermal treatments (-10°C and 27°C) generated quantitative and/or qualitative differences in mitochondrial functions of the liver and pectoralis muscle. We therefore investigated the effects of thermal treatments on (1) mitochondrial density by comparing the activity of CS and CCO between treatments (quantitative). We also (2) studied how treatments affected mitochondrial respiratory capacity by testing for treatment effects on LEAK and OXPHOS (CI and CI+CII) respiration rate (quantitative). We then (3) determined whether temperature generated phenotypic changes in mitochondria (qualitative) by testing for effects of thermal treatments on mitochondrial respiratory capacity (leak and OXPHOS) reported per unit of CS and CCO activity. These analyses were performed using ANCOVA models that included the effect of thermal treatment and the effect of body mass as a covariate to consider its effect on tissue metabolism (West et al. 2002; Krijgsveld et al. 2012). Models also included the interaction treatment*body mass. Furthermore, we investigated (4) the potential links between mitochondrial respiratory capacity and maximal heat production, measured as M_{sum} , and resting energy consumption, measured as BMR. This was done using separate ANCOVA models testing for the effects of each mitochondrial parameters (CS, CCO, LEAK, OXPHOS) on M_{sum} and BMR using raw values and values per unit CS and CCO. The models included the effects of treatment, body mass and the interactions treatment*body mass and treatment*mitochondrial parameter.

Analyses were conducted using R Studio (3.3.1) and JMP Pro (12.0.1). In all models, we eliminated non-significant interactions and variables. Outliers values were discriminated by Cook distance test and removed from analyses if necessary. Normality and homoscedasticity of model residuals were confirmed in all analyses using Shapiro-Wilk, Bartlett test and the “par” function to visualize residuals distribution graphically (Murrell 2005). Unfortunately, the unexpected death of some of the birds and technical issues during measurements led to differing sample size among treatments and among mitochondrial parameters.

Results

Markers of mitochondrial density

There was no significant influence of thermal treatment on CS and CCO activities in both liver and pectoralis muscle when expressed per mg of proteins (Table 2.1). When considering enzymatic activity for the whole organ (activity per unit of proteins multiplied by the total content of protein in the tissue), the activity of CS and of CCO were 25.9% and 38.6% higher at -10°C compared to 27°C in the pectoralis muscle and the liver, respectively (Table 2.1, Fig. 2.1). Total CS activity was also significantly and positively correlated with body mass in the pectoralis muscle (Table 2.1, Fig. 2.1). Therefore, birds living in the cold had higher total and maximal oxidative capacity in their liver and pectoralis muscles.

Mitochondrial respiration

Thermal treatment did not affect mitochondrial respiratory measurements of pectoralis muscles (all $P > 0.25$, Table 2.S1). In the liver, we have observed a marginally non-significant effect of thermal treatment on LEAK and $\text{OXPHOS}_{\text{CI+CII}}$ normalized by CCO activity, with cold acclimated birds expressing lower LEAK/CCO and lower $\text{OXPHOS}_{\text{CI+CII}}/\text{CCO}$ compared to birds maintained

Table 2.1: Effect of thermal treatments and body mass on CS and CCO activity. Values are means \pm s.e.m ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ of proteins $^{-1}$).

	Treatment		Body mass		Cold	Thermoneutral
	F (df)	P	F (df)	P		
<i>Liver</i>						
CS	0.4 (1,33)	0.55	1.0 (1,30)	0.32	0.14 \pm 0.009	0.15 \pm 0.008
CCO	0.5 (1,32)	0.49	13.3 (1,32)	<0.001	0.16 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01
CS _{TOT}	0.9 (1,23)	0.35	8.2 (1,23)	<0.01	11.3 \pm 0.9	10.1 \pm 0.9
CCO _{TOT}	8.4 (1,24)	<0.01	3.0 (1,23)	0.09	14.0 \pm 0.95	10.1 \pm 0.95
<i>Pectoralis</i>						
CS	1.0 (1,33)	0.33	0.4 (1,30)	0.54	2.5 \pm 0.1	2.4 \pm 0.1
CCO	0.09 (1,35)	0.76	0.01 (1,32)	0.9	0.14 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01
CS _{TOT}	7.3 (1,30)	<0.05	4.9 (1,30)	<0.05	503.4 \pm 27.2	399.9 \pm 26.3
CCO _{TOT}	1.0 (1,33)	0.32	0.6 (1,32)	0.44	27.1 \pm 3.0	22.9 \pm 2.9

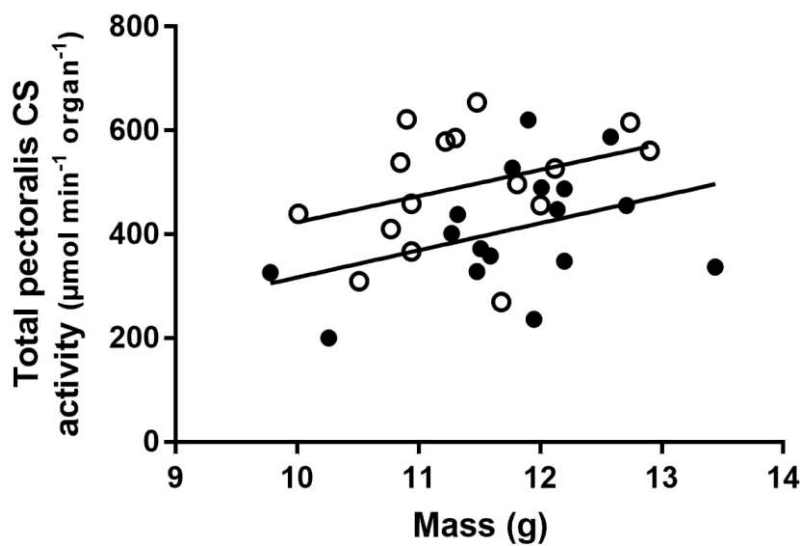


Figure 2.1: Effect of body mass and treatment on CS activity in the pectoralis muscle (-10°C : open circles; 27°C : filled circles).

at thermoneutrality (Table 2.2). Our data also showed that LEAK/CS in the liver declined with body mass in cold acclimated individuals and remained stable with mass in birds acclimated to 27°C (Table 2.2, Fig. 2.2). Independent regression analysis showed that this negative relationship with body mass was significant only for birds kept at -10°C (adjusted $r^2 = 0.46$, $n = 13$, $P < 0.01$; $P = 0.4$ at 27°C). In the liver, we observed an interaction between treatment and body mass for OXPHOS_{CI} respiration rate (Table 2.2). This was apparent in all cases, for absolute values and when normalizing by CS and CCO (Fig. 2.2, Table 2.2). OXPHOS_{CI} rate tended to increase with body mass in warm acclimated birds and to decrease with mass in cold-acclimated individuals, although independent regressions were not significant in any cases (lowest P value = 0.26, range of r^2 : 0.02-0.48). Collectively, these results show that the respiration rate induced by proton leak and the activity of complexes CI and CII in the liver varied with body mass depending on thermal regime (Fig. 2.2).

BMR, M_{sum} and mitochondrial activity

As observed before (Milbergue et al. 2018), both thermogenic capacity and basal metabolic rate were higher in cold acclimated birds than in individuals kept at thermoneutrality. In this specific sample of birds, M_{sum} ($n = 30$) and BMR ($n = 34$) were 20.4% and 14.3% higher, respectively, in the cold relative to the warm treatment (M_{sum} : $F_{1,27} = 31.2$, $P < 0.0001$; BMR: $F_{1,30} = 13.6$, $P < 0.001$) when considering the effect of body mass (M_{sum} : $F_{1,27} = 9.5$, $P < 0.01$, no interaction; BMR: $F_{1,30} = 6.5$, $P < 0.05$, interaction: $F_{1,30} = 4.1$, $P = 0.05$).

Analysis testing the relationship between M_{sum} and mitochondrial respiration in muscles confirmed the effect of treatment and body mass on thermogenic capacity in the models (Table 2.3). We found that LEAK (per mg of tissue, normalized by CS or total) was correlated with M_{sum} (Table 2.3). Independent regressions showed no clear relationship at thermoneutrality (per mg: $P = 0.2$; normalized by CS: $P = 0.3$; whole pectoralis. $P = 0.4$) but a strong covariation between M_{sum} and leak in cold acclimated individuals (per mg: adj. r^2

= 0.67, n = 11, P < 0.05; normalized by CS: adj. $r^2 = 0.71$, n = 10, P < 0.01; whole pectoralis: adj. $r^2 = 0.70$, n = 11, P < 0.01, Fig. 2.3).

Table 2.2: Effect of treatments and body mass on mitochondrial LEAK, OXPHOS_{CI} and OXPHOS_{CI+CII} in the liver. Values are means \pm s.e.m in pmol O₂.sec⁻¹mg tissue⁻¹. C: cold, T:thermoneutral.

	Treatment		Body mass		Interaction		C	T
	F (df)	P	F (df)	P	F (df)	P		
<i>Per mg tissue</i>								
LEAK	0.95 (1,30)	0.3	0.0 (1,30)	1.0	-	-	28.5 \pm 3.4	33.5 \pm 2.9
/CS	1.34 (1,26)	0.3	0.35 (1,26)	0.6	6.0 (1,26)	<0.05	202.8 \pm 31.5	251.1 \pm 27.2
/CCO	3.9 (1,30)	<u>0.06</u>	0.96 (1,28)	0.3	-	-	160.4 \pm 33.0	245.2 \pm 27.3
OXPHOS _{CI}	0.9 (1,28)	0.35	0.01 (1,28)	0.9	5.7 (1,28)	<0.05	25.3 \pm 4.1	30.4 \pm 3.5
/CS	1.5 (1,25)	0.2	0.0 (1,25)	1.0	9.1 (1,25)	<0.01	186.8 \pm 35.8	245.6 \pm 31.9
/CCO	2.3 (1,26)	0.1	0.73 (1,26)	0.4	7.6 (1,26)	<0.05	149.5 \pm 34.4	218.6 \pm 29.8
OXPHOS _{CI+CII}	0.28 (1,30)	0.6	0.0 (1,30)	0.95	-	-	96.1 \pm 9.8	102.6 \pm 8.2
/CS	0.7 (1,29)	0.4	0.07 (1,27)	0.8	-	-	713.1 \pm 91.2	813.4 \pm 77.6
/CCO	3.8 (1,30)	<u>0.06</u>	0.78 (1,28)	0.4	-	-	509.0 \pm 85.2	725.3 \pm 70.5
<i>Total</i>								
LEAK	0.01 (1,23)	0.9	1.4 (1,22)	0.25	-	-	2.2 \pm 0.3	2.2 \pm 0.3
OXPHOS _{CI}	0.06 (1,20)	0.8	0.9 (1,20)	0.4	5.3 (1,20)	<0.05	2.0 \pm 0.4	2.1 \pm 0.3
OXPHOS _{CI+CII}	0.02 (1,23)	0.9	3.5 (1,22)	0.07	-	-	6.7 \pm 0.7	6.8 \pm 0.6

The same pattern was found when analyzing the relationship between M_{sum} and LEAK per unit of CCO activity (significant interactions, Table 2.3). Although interaction between LEAK/CCO and thermal treatment was significant,

independent regressions showed no significant correlation with M_{sum} at $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($P = 0.07$) as well as $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($P = 0.3$) (Table 2.3). Independent regressions per treatment showed also that the influence of $\text{OXPHOS}_{\text{CI}}$ on M_{sum} was not significant

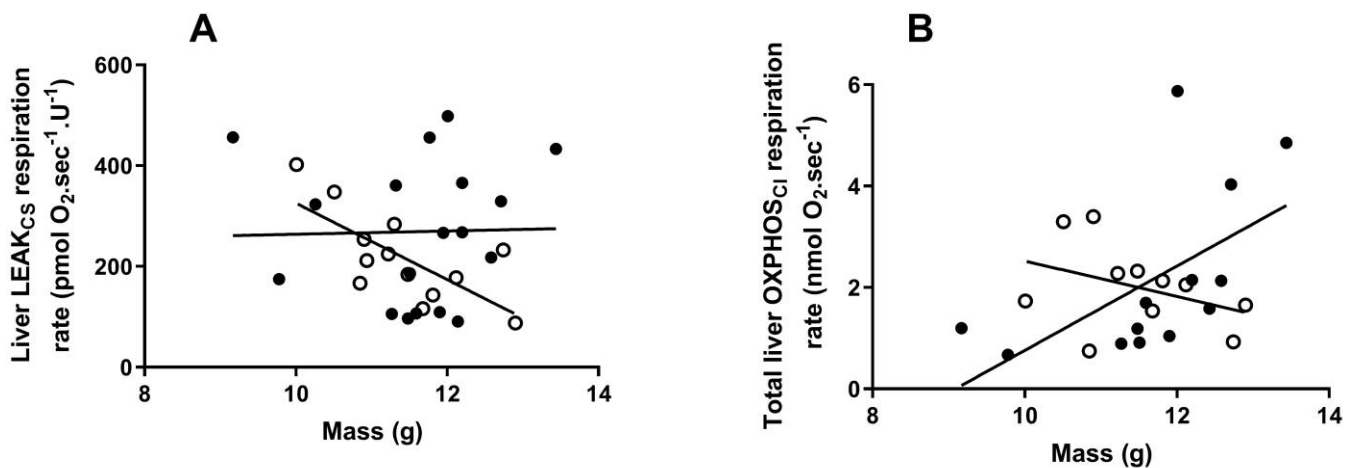


Figure 2.2: Relationships between body mass and liver mitochondrial parameters: (A) LEAK respiration rate per mg of liver normalized by CS, (B) total $\text{OXPHOS}_{\text{CI}}$ respiration rate. Cold: open circles, thermoneutral: filled circles.

($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$: $P = 0.2$; $27\text{ }^{\circ}\text{C}$: $P = 0.2$). Therefore, birds expressing high thermogenic capacity also had muscle fibers characterized by high levels of mitochondrial leak but this effect was only visible in the cold.

For BMR, we found no influence of mitochondrial content or respiratory capacity (only treatment and body mass were significant) in pectoralis muscle. In the liver, while considering the effects of treatment and body mass on BMR, we found a negative correlation across treatments between BMR and the activity of CCO (Table 2.4). This effect was, however, very weak (not shown). We also found that BMR variation was related to $\text{OXPHOS}_{\text{CI}}$ and that this influence depended on thermal treatment (significant interaction, Table 2.4, Fig. 2.4). But independent regression analyzes per treatment showed that the only significant relationship was between total $\text{OXPHOS}_{\text{CI}}$ and BMR in $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ acclimated birds ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$: $r^2 = 0.39$, $n = 10$, $P < 0.05$; $27\text{ }^{\circ}\text{C}$: $P = 0.5$). Although a similar pattern was also observed when normalizing

OXPHOS_{CI} respiration rate with CS or CCO activities, independent regressions revealed no significant correlation between BMR and OXPHOS_{CI} in both thermal groups. Therefore, we found evidences that mitochondrial functions influence BMR differently at -10°C and 27°C but only in the liver.

Tableau 2.3: Influence of mitochondrial parameters in pectoralis muscles on M_{sum} . The interactions Treatment*Body mass were non significant in all ANCOVA models.

	Parameter		Treatment		Mass		Parameter* [*] Treatment	
	F (df)	P	F (df)	P	F (df)	P	F (df)	P
<i>Per mg tissue</i>								
LEAK	2.2 (1,19)	0.15	34.5 (1,19)	<0.0001	9.4 (1,19)	<0.01	12.7 (1,19)	<0.01
/CS	5.0 (1,16)	<0.05	30.9 (1,16)	<0.0001	4.9 (1,16)	<0.05	9.2 (1,16)	<0.01
/CCO	0.9 (1,18)	0.35	24.1 (1,18)	0.0001	6.9 (1,18)	<0.05	4.5 (1,18)	<0.05
<i>Total</i>								
LEAK	2.7 (1,19)	0.1	30.9 (1,19)	<0.0001	9.9 (1,19)	<0.01	9.4 (1,19)	<0.01
/CS	4.4 (1,16)	0.05	29.4 (1,16)	<0.0001	4.5 (1,16)	<0.05	8.2 (1,16)	<0.01
/CCO	0.9 (1,18)	0.35	24.1 (1,18)	0.0001	6.9 (1,18)	<0.05	4.5 (1,18)	<0.05
OXPHOS _{CI}	0.2 (1,16)	0.6	20.6 (1,16)	<0.001	9.4 (1,16)	<0.01	5.2 (1,16)	<0.05

Tableau 2.4: Influence of mitochondrial parameters in the liver on BMR. The interactions Treatment*Mass were non significant in all ANCOVA models except for CCO ($F_{1,28} = 5.2$, $P < 0.05$).

	Parameter		Treatment		Mass		Parameter*Treatment	
	F (df)	P	F (df)	P	F (df)	P	F (df)	P
<i>Per mg tissu</i>								
CCO	4.0 (1,28)	<u>0.05</u>	19.7 (1,28)	0.0001	9.9 (1,28)	<0.01	-	n.s
OXP _{HOS} _{CI}	6.4 (1,25)	<0.05	20.6 (1,25)	0.0001	16.7 (1,25)	<0.001	8.9 (1,25)	<0.01
/CS	8.0 (1,22)	<0.01	22.2 (1,22)	0.0001	13.5 (1,22)	<0.01	7.3 (1,22)	<0.05
<i>Total</i>								
OXP _{HOS} _{CI}	8.1 (1,16)	<0.05	10.9 (1,16)	<0.01	11.4 (1,16)	<0.01	9.2 (1,16)	<0.01
/CCO	5.5 (1,15)	<0.05	12.9 (1,15)	<0.01	6.6 (1,15)	<0.05	4.8 (1,15)	<0.05

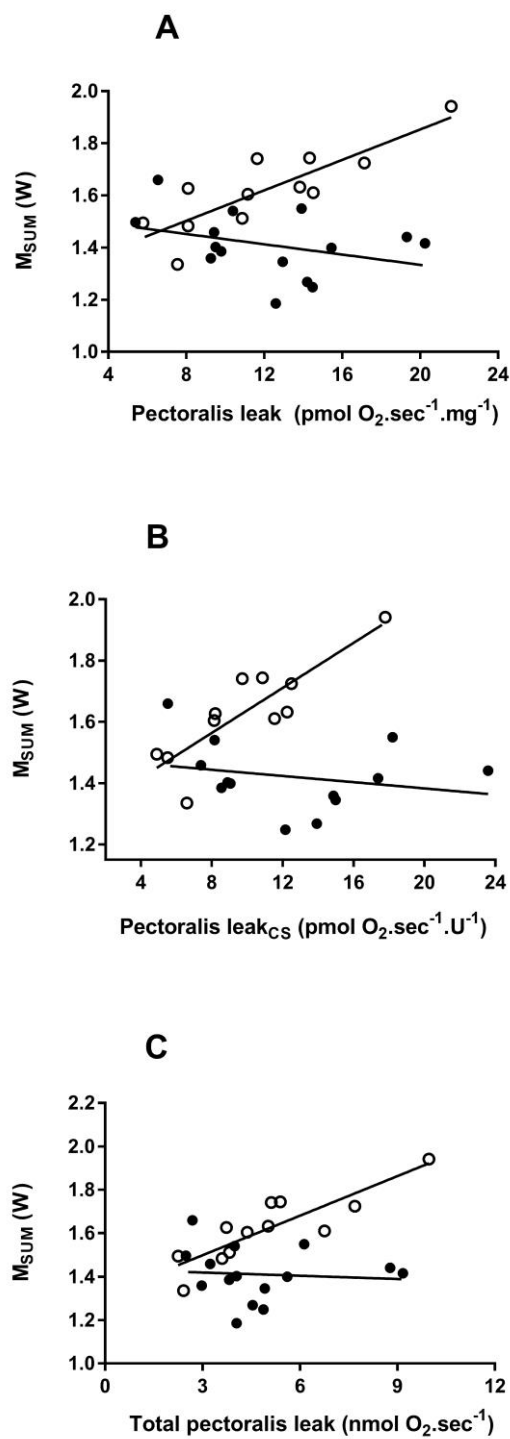


Figure 2.3: Relationships between mitochondrial leak in pectoralis muscle and M_{sum} . (A) LEAK respiration rate per mg of tissue, (B) LEAK respiration rate normalized by CS activity (C) total LEAK respiration rate, (-10°C: open circles; 27°C: filled circles)

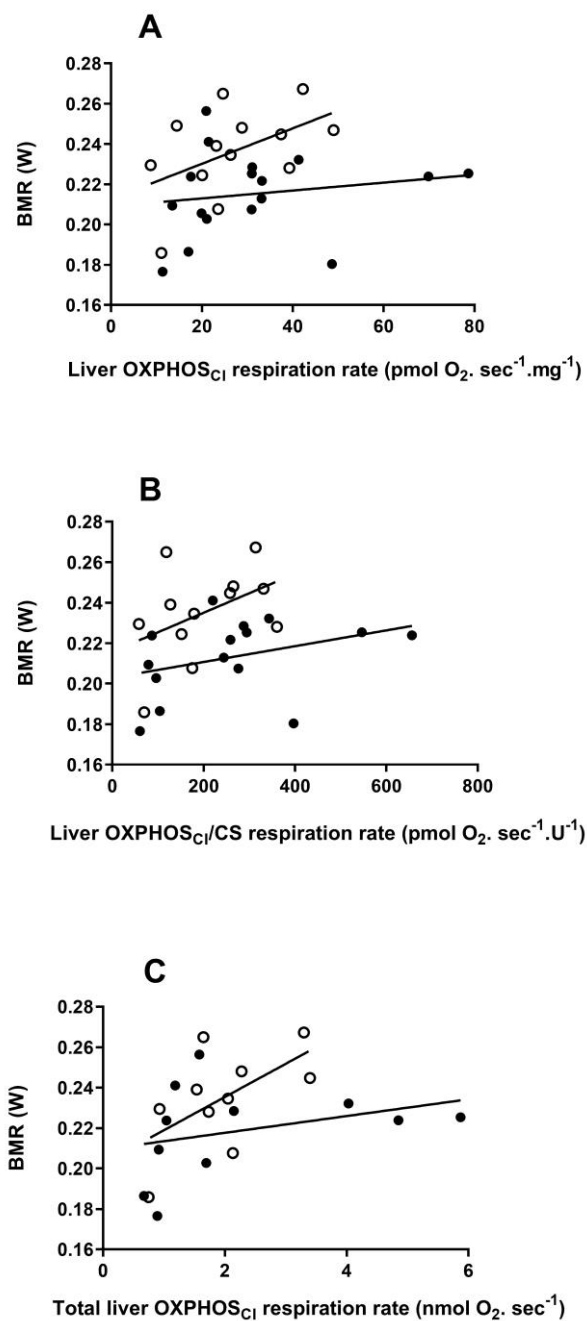


Figure 2.4: Relationships between mitochondrial respiratory parameters in the liver and BMR: (A) OXPPOS_{CI} respiration rate per mg of tissue, (B) OXPPOS_{CI} respiration rate normalized by CS (C), total OXPPOS_{CI} respiration rate, (10°C: open circles; 27°C: filled circles).

Discussion

Assuming that cold acclimation was associated with changes in mitochondrial content or respiratory properties, we expected divergences in mitochondrial characteristics between cold and warm-acclimated chickadees. We predicted that, if the previously observed improvement of thermogenic capacity resulted mostly from changes in mitochondrial properties rather than muscle mass (Barceló et al. 2017; Milbergue et al. 2018), then oxidative phosphorylation and/or leak should be higher at -10°C than at 27°C and should correlate positively with M_{sum} . We also expected that changes in metabolic intensity resulting from thermal acclimation could lead to correlations between BMR and both oxidative phosphorylation and/or leak. Our data partially supported these hypotheses. Indeed, we found a higher mitochondrial content, resulting in higher oxydative capacity, in the liver and pectoralis muscles of cold relative to warm acclimated individuals. Mitochondrial respiratory capacity did not vary between treatments in pectoralis muscle. Nevertheless, proton leakage measured in the pectoralis did correlate significantly with M_{sum} , but only in the cold treatment.

Markers of mitochondrial content

Citrate synthase and cytochrome c oxidase are often used as proxies of tissue maximal oxidative capacity and it has been shown that their activity increase in the liver and muscles of birds acclimated to cold wintering environments or cold experimental conditions (O'Connor 1995; Dawson and Olson 2003; Zheng et al. 2008; Liknes and Swanson 2011*b*; Peña-Villalobos et al. 2014; Zheng et al. 2014; Vézina et al. 2017). In this study there was no treatment effect on these enzymatic activities when reported per mg of proteins but we found a 26% higher total CS activity in pectoralis muscle and a 39% higher total CCO activity in liver of cold acclimated chickadees compared with birds kept at thermoneutrality. Despite being of lower magnitude, this finding corroborates the observations of Liknes and Swanson (2011*b*) who reported a 62.5% higher total CS activity in the pectoralis muscles of black capped chickadees wintering

in South Dakota relative to summer counterparts. Similarly, Zhou et al. (2016) reported higher total CCO activity in the liver of hwamei (*Garrulax canorus*) acclimated to 15°C relative to individuals kept at thermoneutrality (35°C). However, in contrast with our observations, Liknes and Swanson (2011b) also found notably higher (52%) CS activity per unit wet tissue mass in the pectoralis muscle of wintering chickadees and Zheng et al. (2008) reported 37% higher CCO activity per mg of protein in the liver of winter-acclimatized Eurasian tree sparrow (*Passer montanus*) relative to birds measured in summer. The exact reasons for the discrepancies between these results and our study are not obvious but might be induced by the difference of settings between the studies (experimental captives vs free living). For example, similar to our observations, Peña-Villalobos et al. (2014) observed no differences in tissue mass-specific activity of CS or CCO between winter and summer in rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*) but found a 70% higher total CS activity in flight muscles of cold (15°C) compared to warm-acclimated (30°C) captive birds. In our case, it appears that the difference in total enzymatic activity between treatments might result from difference in organ mass, at least for the liver. Indeed, albeit being non-significant ($P = 0.17$) Milbergue et al. (2018) found that cold acclimated chickadees carried 18% larger livers (lean dry mass). Pectoralis muscles however only 5% were heavier in the cold and did not differ significantly between treatments.

Mitochondrial respiration

Given that in our experiment, birds increased thermogenic capacity without significantly changing the size of their muscles (Milbergue et al. 2018), we expected to find higher oxidative phosphorylation and/or higher leak respiration in muscles of cold-acclimated birds as this could contribute to heat production mechanism (Duchamp et al. 1999; Hochachka and Somero 2002; Lowell and Spiegelman 2010). Instead, our data revealed no effect of thermal treatment on pectoralis muscle mitochondrial respiration when comparing mean parameters between the two groups. This result came as a

surprise since proton leak upregulation in endotherms is suspected to dissipate the protomotive force in the mitochondria, thus leading to heat production (Duchamp et al. 1999, Divakaruni and Brand 2011). Several previous studies have reported a higher “state 4” respiration in isolated mitochondria of pectoralis muscles of cold acclimated birds (Roussel et al. 1998; Teulier et al. 2010; Zheng et al. 2014; Zhou et al. 2016). It is however not uncommon to find inconsistencies among such studies. For instance, muscles mitochondria of muscovy ducklings (*Cairina moschata*) had 38% higher state 3 respiration in individuals reared at 4°C compared to individuals reared at thermoneutrality (25°C, Teulier et al. 2010) and this contrasts with a previous study on the same species using the same thermal treatment where no significant difference in muscle state 3 respiration was observed (Roussel et al. 1998). Furthermore, another study on ducklings reported no effect of thermal treatment (11°C relative to 25°C) on oxidative phosphorylation and proton leak in the gastrocnemius muscle (Salin et al. 2010). Cheviron et al. (2017) also reported no upregulation of genes putatively involved in non-shivering thermogenesis in winter compared to summer acclimatized American goldfinch and black capped chickadee. Collectively, these findings suggest that the cellular adjustments observed in muscles of several species in association with cold (Roussel et al. 1998; Zheng et al. 2008; Teulier et al. 2010; Zheng et al. 2014; Stager et al. 2015; Zhou et al., 2016) may be context-specific or simply not part of an obligate adaptive response to cold environment. Moreover, the presented studies have worked as we said with isolated mitochondria but it is shown that working with isolated mitochondria versus permeabilized fibers or cells can lead to important differences (Kuznetsov et al. 2008; Korzeniewski 2015).

As for pectoral muscles, we expected to find higher oxidative phosphorylation capacity and/or higher leak respiration in the liver. For example, previous studies reported higher state 4 respiration in the liver of cold-acclimated Eurasian tree sparrow, Chinese bulbul (*Pycnonotus sinensis*) and hwamei relative to values measured in livers of individuals acclimated to summer or to thermoneutrality (Zheng et al. 2008; Zheng et al. 2014; Zhou et al. 2016). In contrast with these studies, liver mitochondrial phenotype

in our study was likely adjusted to temperature acclimation but in an opposite direction. Indeed, both the leak and the rate of electrons entrance in the ETS expressed per unit of mitochondrial marker tended to be lower in the cold (OXPHOS_{CI+CIII}/CCO 30%, LEAK/CCO 35%, Table 2.2) with the effect approaching significance for both variable ($P = 0.06$). This suggest that the electron entrance capacity in the respiratory system relative to the reducing capacity of cytochrome oxidase was reduced in association with cold acclimation in chickadee's liver at the level of complex I and II. This therefore indicates that, in the liver of cold acclimated birds, the electron pressure in the ETS might be lower during non-phosphorylating and phosphorylating respiration or that other electron entrance pathways might be preferred in these conditions.

In the liver, the proton leak (when express per CS) respiration rate varied differently with body mass depending on thermal regime. The respiration rate tended to decrease with body mass in the cold and to show an opposite or an absence of pattern in the thermoneutral treatment (Fig. 2.2). Negative correlations such as those found in the current study at -10°C have previously been reported in studies comparing species of various body size. For example, proton leak in the liver is negatively correlated to body mass in frogs (Roussel et al. 2015), mammals (Porter et al. 1996) and birds (Brand et al. 2003; Else et al. 2004). This correlation could potentially be explained by variation of fatty acyl composition in the mitochondrial membrane. Indeed, across a wide range of body mass in birds, from the 13g zebra finches (*Taeniopygia guttata*) to the 35kg emus (*Dromaius novaehollandiae*), proton conductance correlate positively to polyunsaturation and negatively to monounsaturated of phospholipid fatty acyls (Brand et al. 2003, this is also found in mammals: Porter et al. 1996; Couture and Hulbert 1995), supporting the idea that mitochondrial membranes act as a metabolic pacemaker (Hulbert and Else, 1999). Liver and muscle mitochondrial membranes from larger birds also have less polyunsaturated and more monounsaturated fatty acyl chains than those from smaller birds (Hulbert et al. 2002; Brand et al. 2003). Thus, mitochondrial membranes of smaller birds are more fluid, and thereby have higher membrane proton

conductance (Hill et al. 2004). The exact cause for the apparent lack of body mass effect at thermoneutrality is not obvious, however, and will require more study.

M_{sum}, BMR and mitochondrial activity

In this experiment we found no relationship between maximal thermogenic capacity measured as M_{sum} and tissue oxidative capacity measured as CS and CCO activity (Swanson et al. 2014b; Vézina et al. 2017). However, M_{sum} was strongly and positively correlated with mitochondrial proton leak in the pectoralis. Interestingly, this was the case only for cold acclimated individuals, even though the range of leak values was the same at -10°C and 27°C (Fig. 2.3). At first glance, the strong positive relationship found here between muscle proton leak and M_{sum} suggests that cold-acclimated birds expressing higher leak values might have benefited from the increase in heat generated by less efficient mitochondria. Yet, this result is counterintuitive given that there was no treatment effect on leak *per se*. Therefore, the contribution of mitochondrial leak to maximal thermogenic capacity is not straightforward. Moreover, even if the range of leak values is similar to cold acclimated birds, those kept at thermoneutrality presented no correlation with M_{sum} . It is possible that the proportion of mitochondrial capacity used during the M_{sum} varies according to temperature acclimation which might partly explain these divergences in correlation. Yet, this result will need further investigation by measuring, for example, oxidative phosphorylation efficiency (ATP/O₂).

In endotherms a significant part of resting energy requirements results from anabolic processes such as lipid membranes formation and proteins turn-over as well as mitochondrial respiration (Rolfe and Brown 1997; Hochachka and Somero 2002; Divakaruni and Brand 2010). In birds, BMR variation has been associated in some studies with proton leak (Zheng et al. 2008; Zheng et al. 2013b; Zheng et al. 2014), CS activity (Pena-Villalobos et al. 2014; Vézina et al. 2017) and oxidative phosphorylation (Zheng et al. 2013b; Zheng et al. 2014 but with RMR) in both liver and muscles. We

therefore expected to find in chickadees relationships between BMR and parameters of oxidative phosphorylation and leak. In our study, BMR was correlated with OXPHOS_{CI} respiration rate of the liver but the effect differed between treatments (Fig 2.4). In a previous study (Milbergue et al. 2018) we found that the relationship between body mass and BMR was uncoupled in cold-acclimated chickadees in such a way that the lightest birds had a BMR as high as the heaviest birds whereas BMR was positively correlated to body mass at thermoneutrality. We suggested that this phenomenon could be rooted in adjustments of metabolic intensity at the cellular level in cold. Interestingly, the patterns we observed in liver OXPHOS_{CI} in the present study showed that in the cold, the lightest birds had high mitochondrial respiration rates, relative to those of larger size (Fig. 2.2), and that overall, cold-acclimated birds with high OXPHOS_{CI} respiration rate also had high BMR (Fig. 2.4). The current finding is therefore consistent with our previous hypothesis. It suggests that mitochondrial adjustments affecting metabolic capacity of internal organs such as the liver might contribute to overall resting energy consumption, although this influence might differ depending on the acclimation state of the birds. Changes in liver phenotype in association with cold acclimation have been reported in several birds species before. Reported changes are often increases of liver mass (Williams and Tieleman, 2000; Zheng et al. 2008; Petit et al. 2014; Zheng et al. 2014; Barceló et al. 2017), which has been identified as a response to elevated cold-induced food consumption (Barceló et al 2017), and which may significantly influence BMR variation (Chapell et al. 1999; Williams and Tieleman 2000; Petit et al. 2014; Barceló et al. 2017). In our experiment, cold acclimated chickadees responded as expected, consuming 44% more food on average and, although not-significant, having an 18% larger liver than individuals from thermoneutral group.

Our study showed variations in quantitative and qualitative aspects of mitochondrial respiration between thermal acclimation states in birds. Some of the respiratory parameters covary with maximal thermogenic capacity and basal maintenance costs, depending on temperature and body mass. Although the exact

mechanism explaining how birds can improve thermogenic capacity without changing muscle mass still needs clarification, our study suggests that this capacity is nevertheless associated with significant adjustments in muscle mitochondrial machinery. Furthermore, this study demonstrated that increase of thermogenic capacity is not a result of non-shivering thermogenesis through an increase of proton leak or oxidative phosphorylation. It might also not be the result of an improvement of muscles fibers ATP production for shivering.

Acknowledgements

We are grateful to the Corporation de la Forêt d'Enseignement et de Recherche Macpès, who granted us access to the field facilities for capturing the birds used in this study. We thank Mikaël Jaffré, Aymeric Bodin and Gael Lafenêtre for their help in capturing the birds as well as Karine Dubois for her help with dissections and organ processing. We thank Nicolas Pichaud, Daniel Munro and Felix Christen for their help and advices concerning mitochondrial processing. We are also grateful to Lyette Régimbald for the maintenance of captive birds and for food intake measurement as well as to Jonathan Coudé for his help with laboratory material. Alain Caron provided precious statistical advices. This study was supported by a FRQNT (Team) grant to F. Vézina and P.U. Blier.

Supplementary material

Table 2.S1: Effect of treatments and body mass on mitochondrial leak, OXPHOS_{CI} and OXPHOS_{CI+CII} in the pectoralis muscle. Values are means \pm s.e.m.

	Treatment		Body mass		Cold	Thermoneutral
	F (df)	P	F (df)	P		
Per mg of tissue						
LEAK	0.0 (1,31)	0.9	0.18 (1,29)	0.7	12.0 \pm 1.1	12.2 \pm 1.0
/ CS	1.1 (1,28)	0.3	0.0 (1,26)	1.0	10.6 \pm 1.2	12.3 \pm 1.1
/ CCO	0.79 (1,30)	0.4	0.27 (1,28)	0.6	209.7 \pm 30.6	247.0 \pm 28.7
OXPHOS _{CI}	0.0 (1,27)	0.95	0.25 (1,25)	0.6	23.7 \pm 4.7	24.1 \pm 4.2
/CS	0.26 (1,24)	0.6	0.12 (1,22)	0.7	20.9 \pm 4.5	24.1 \pm 4.2
/CCO	0.11 (1,26)	0.7	0.12 (1,24)	0.7	442.8 \pm 134.1	505.0 \pm 124.8
OXPHOS _{CI+CII}	0.46 (1,31)	0.5	0.5 (1,29)	0.5	56.6 \pm 7.7	49.5 \pm 7.1
/CS	0.46 (1,28)	0.5	0.57 (1,26)	0.5	44.2 \pm 6.9	50.7 \pm 6.5
/CCO	0.03 (1,30)	0.9	0.31 (1,28)	0.6	994.1 \pm 191.3	1040.7 \pm 179.7
Total						
LEAK	0.0 (1,30)	0.9	2.7 (1,29)	0.1	4.9 \pm 0.6	4.9 \pm 0.5
/ CS	1.4 (1,27)	0.25	0.0 (1,26)	1.0	0.01 \pm 0.001	0.01 \pm 0.001
/ CCO	1.0 (1,29)	0.3	0.3 (1,28)	0.6	0.21 \pm 0.03	0.25 \pm 0.03
OXPHOS _{CI}	0.04 (1,26)	0.8	1.2 (1,25)	0.3	9.6 \pm 2.0	9.1 \pm 1.8
/CS	0.1 (1,23)	0.7	0.15 (1,22)	0.7	0.02 \pm 0.004	0.02 \pm 0.004
/CCO	0.08 (1,25)	0.8	0.1 (1,24)	0.7	0.44 \pm 0.13	0.50 \pm 0.13
OXPHOS _{CI+CII}	1.2 (1,30)	0.3	0.02 (1,29)	0.9	22.8 \pm 3.1	18.3 \pm 2.9
/CS	0.2 (1,27)	0.6	0.5 (1,26)	0.5	0.04 \pm 0.007	0.05 \pm 0.007
/CCO	0.01 (1,29)	0.9	0.3 (1,28)	0.6	0.99 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'endothermie, c'est à dire la capacité à produire une chaleur endogène indépendamment du milieu environnant, confère chez les oiseaux la possibilité de vivre dans des environnements variés tels que ceux situés aux latitudes nordiques où la saison hivernale est caractérisée par des températures considérablement froides. Dans ces milieux, la thermorégulation devient alors un défi énergétique de taille car ces organismes doivent lutter constamment contre la diminution de leur température interne et de leurs réserves énergétiques. Ce défi est d'autant plus grand chez les oiseaux passériformes de part leur petite taille qui favorise une perte de chaleur accrue (Swanson, 2010). Pour réduire les coûts associés à la thermorégulation et vivre dans de tels environnements, les endothermes ont recours à des mécanismes d'acclimatation. Chez les endothermes de petite taille, ces mécanismes sont essentiellement physiologiques. Outre la production d'une chaleur basale résultant de l'ensemble des réactions chimiques nécessaires au maintien de l'intégrité des cellules (Lowell et Spielgelman, 2000; Silva, 2003), les endothermes bénéficient d'une thermogenèse issue de l'activité physique, ainsi qu'une thermogenèse adaptative activée lors de variations importantes de températures ambiantes (Lowell et Spielgelman, 2000).

La thermogenèse adaptative en réponse à la variation de température ambiante s'effectue soit au travers du frissonnement musculaire (Hohtola, 2004) soit au travers de mécanismes cellulaires n'impliquant pas de frissonnements (Duchamp et al., 1999). Le frissonnement a souvent été mis en avant comme le mécanisme universel de thermogenèse chez les oiseaux et les mammifères (Hohtola, 2004; Swanson, 2010). Chez les oiseaux de petite taille, les muscles pectoraux peuvent représenter jusqu'à un tiers de la masse corporelle (Dawson et Carey, 1976; Petit et al., 2014; Vézina et al., 2017). Ainsi, de par leur taille et leur capacité de frissonnement, les muscles pectoraux auraient une influence majeure dans l'amélioration de l'endurance au froid chez les passereaux résidents en contribuant à l'augmentation de la capacité thermogénique.

D'ailleurs, des corrélations entre la masse des muscles et la capacité thermogénique ont souvent été rapportées chez les oiseaux (Swanson, 1991; O'Connor, 1995; Cooper, 2002; Liknes and Swanson, 2011a; Swanson et Merkord, 2012; Petit et al., 2014; Vézina et al., 2017). Cependant, certaines études, bien qu'elles n'aient pas porté directement sur cette question précise, ont observé une hausse de la capacité thermogénique chez des passereaux acclimatés au froid sans développement parallèle de la masse musculaire. Ces résultats contradictoires remettent donc en question la nécessité du développement musculaire dans la réponse au froid et suggèrent qu'il y aurait certainement d'autres mécanismes en jeu. Les oiseaux pourraient améliorer leur endurance au froid via une hausse de la production de chaleur par unité de masse tissulaire plutôt que par un gain de masse musculaire. Nous avons ainsi émis l'**hypothèse 1** dans le *chapitre 1* que, même si de gros muscles peuvent être avantageux en terme de production de chaleur, le développement de la masse musculaire n'est pas un prérequis à une amélioration de la capacité thermogénique (M_{sum}) pendant l'acclimatation au froid chez les oiseaux.

La thermogénèse adaptative chez les oiseaux, qu'elle soit réalisée au travers du frissonnement et/ou au travers de mécanismes n'impliquant pas le frissonnement, pourrait être modulée autrement que par l'ajustement de la masse musculaire. Plusieurs études se sont intéressées à différentes composantes pouvant être impliquées dans cette thermogénèse comme par exemple la capacité à distribuer l'oxygène (Swanson, 1990b; O'Connor, 1996; Chappell et al., 1999; Hammond et al., 2000; Petit et Vézina, 2014) et les substrats énergétiques (O'Connor et al., 1995; Liknes et Swanson, 2011b; Swanson et al., 2014 a,b; Zhang et al., 2015b; Vézina et al., 2017; Zhang et al., 2017) aux cellules, mais aussi à la capacité respiratoire mitochondriale (Teulier et al., 2010; Swanson et al., 2014b). La mitochondrie est un élément prépondérant dans le métabolisme énergétique, puisqu'elle est le siège de 90% de la respiration cellulaire (Rolfe et Brown, 1997). Une partie de cette respiration correspond à la phosphorylation oxydative et à la respiration induite par un cycle futile, la fuite de protons au niveau de la membrane interne des mitochondries (Rolfe et al., 1999). La phosphorylation oxydative génère des molécules énergétiques d'ATP et de la chaleur alors que la fuite

de protons ne génère que de la chaleur (Divakaruni et Brand, 2010). Ces deux mécanismes pourraient par conséquent être stimulés en réponse au froid afin de répondre au besoin de thermogénèse. Mais il semble que les recherches à ce sujet chez les oiseaux soient encore trop peu nombreuses car on ne sait toujours pas quel pourrait être le rôle de ces mécanismes dans l'augmentation de la capacité thermogénique (M_{sum}). Nous avons émis l'**hypothèse 2** dans l'étude du *chapitre 2* que l'augmentation de la capacité thermogénique lors de l'acclimatation au froid chez les oiseaux de petite taille implique une hausse de la fuite de protons et/ou de la phosphorylation oxydative et que ces ajustements mitochondriaux s'effectuent soit par un changement quantitatif (densité en mitochondries) soit/et par un changement qualitatif (propriétés intrinsèques du système de respiration) des mitochondries. Ces ajustements prendraient la forme d'une augmentation de la capacité (1) à fournir des électrons au système de transport des électrons (ETS) au travers de l'apport en NADH ou FADH₂ (activité de la citrate synthase, CS), (2) à faire entrer les électrons dans l'ETS et à générer un gradient de protons (taux de respiration de CI et CII), (3) à évacuer les électrons de l'ETS (activité de la cytochrome C oxydase, CCO) et (4) à découpler la phosphorylation oxydative par une fuite de protons à travers la membrane interne.. Pour déterminer si ces composantes de la respiration mitochondriale sont effectivement impliquées dans l'acquisition d'une meilleure endurance au froid, nous avons étudié dans le chapitre 2 l'influence potentielle de la température d'acclimatation sur ces deux types de respiration, phosphorylante et non-phosphorylante. Nous avons de plus investigué l'existence de relations entre ces composantes de la respiration mitochondriale et la capacité de thermogénèse (M_{sum}) et le métabolisme basal chez les mésanges à tête noire acclimatées à -10 et 27°C.

C.1 Chapitre I

Question 1: La variation de masse musculaire est-elle un prérequis pour devenir plus endurant au froid?

Une de nos principales prédictions était que le M_{sum} serait positivement corrélé à la masse des muscles chez la mésange à tête noire, en étant cependant plus élevé dans un environnement froid pour une masse de muscle donnée que dans un environnement à thermoneutralité. Cette prédiction découle d'études précédentes qui ont documenté, à quelques reprises, une hausse de capacité thermogénique en hiver ou au froid en captivité sans développement de musculature (Vézina et al., 2011; Swanson et al., 2014a,c; Barceló et al., 2017) chez des espèces qui sont pourtant connues pour développer leur muscles pendant la saison froide, et chez qui une corrélation entre le M_{sum} et la masse des muscles a déjà été documentée, entre autre chez la mésange à tête noire (Swanson, 1990, 1991b; Petit et al., 2013, 2014; Vézina et al., 2017). En maintenant cette espèce en conditions contrôlées, nous avons pu mettre en évidence l'élévation attendue (+20%) du M_{sum} en milieu froid et observer que cette dernière était survenue en l'absence de variation significative de la masse des muscles, quels qu'ils soient (pectoraux, cuisses, carcasse). Ceci suggère que la hausse hivernale de M_{sum} observée a plusieurs reprises dans d'autres études (O'Connor, 1995; Cooper, 2002; Swanson et al., 2009; Liknes et Swanson, 2011a; Petit et al., 2013) n'est pas la conséquence d'un développement de musculature pendant l'acclimatation thermique. Cependant, la capacité thermogénique était tout de même corrélée à la masse musculaire, et ce tant à -10°C qu'à 27°C . En d'autres termes, les individus munis de gros muscles sont avantagés au niveau de leur thermogénèse, quelle que soit le traitement thermique. Le métabolisme musculaire reste donc fortement impliqué dans la thermogénèse. L'augmentation de celle-ci se ferait potentiellement au moyen d'un ajustement de l'intensité métabolique des tissus, surtout musculaires, par l'activation de fonctions cellulaires.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons supposer que la différence de masse musculaire démontrée chez cette espèce (Petit et al., 2013) entre l'hiver et l'été pourrait être la conséquence de facteurs environnementaux autres que la température ambiante tels que la vitesse du vent ou le temps de recherche alimentaire, poussant les individus à faire travailler davantage les muscles du vol. Petit et Vézina (2014), ont démontré que la réduction de la surface des ailes entraîne chez la mésange à tête noire une augmentation de la masse des muscles et que les individus avec un M_{sum} élevé sont ceux ayant une masse de muscles élevée. Donc, à cause de cette manipulation, les individus ont développé de plus gros muscles que les individus contrôles pour soutenir le vol. Cependant, le traitement (contrôle ou surface des ailes réduite) n'était pas corrélé avec le M_{sum} , ce qui est d'ailleurs cohérent avec les résultats de cette étude (l'augmentation du M_{sum} n'est pas la conséquence d'un développement de musculature). D'autre part, Vézina et al. (2007) ont démontré que chez le bécasseau maubèche (*Calidris canutus*), le développement pré-migratoire de la musculature, en préparation à de longs vols, résultait aussi en une hausse du M_{sum} . Ces individus ont donc acquis une meilleure endurance au froid par le biais d'un gain de masse musculaire ne résultant pas d'un changement de température. Par conséquent, ainsi que suggéré par Petit et Vézina (2014), le développement de la musculature chez la mésange à tête noire pourrait être la conséquence d'une activité de vol accrue en hiver. La raison principale à cela serait que les coûts de thermorégulation étant plus grands qu'en été, l'activité de quête alimentaire serait également augmentée afin de répondre au besoin énergétique (+44% de consommation alimentaire dans notre étude).

Conclusion: Un gain de masse musculaire n'est pas un prérequis obligatoire à l'acquisition d'une meilleure endurance au froid, bien que les individus avec une musculature plus développée soient avantagés pour la thermogénèse.

Question 2: Quels sont les effets de l'acclimatation au froid sur le métabolisme basal?

Nous avons obtenu un BMR supérieur de 5% dans le groupe acclimaté au froid comparativement au groupe acclimaté à thermoneutralité. Les études qui tentent d'expliquer les variations de BMR en fonction de la température ambiante chez les oiseaux portent généralement sur l'influence de la masse des organes considérés métaboliquement actifs sur le BMR en utilisant une approche corrélative. Plusieurs études ont fait ressortir des relations entre le métabolisme de base et les organes impliqués dans l'acquisition de l'énergie (i.e. intestin) et l'excrétion (i.e. reins) (Swanson, 1991a; Piersma et al. 1996; Williams and Tieleman, 2000; Liu et Li, 2006; Vézina et al., 2006; Zheng et al., 2008a; Zheng et al., 2013b; Barceló et al., 2017), ce qui a mené à l'interprétation de plus en plus acceptée que la hausse de la consommation de nourriture dans un environnement froid mène à un développement de ces organes et, conséquemment, à une hausse des coûts de maintenance, visibles sous forme d'une hausse de BMR (Barceló et al., 2017, Swanson et al., 2017). Dans le cadre de notre étude, en revanche, ces relations n'ont pas été observées. À l'exception du pancréas, aucun organe digestif et excréteur (foie, intestin, gésier, reins) n'a présenté de différence significative de masse entre les deux températures. En fait, notre étude a plutôt fait ressortir une influence importante de la masse musculaire sur la variation de BMR, une observation qui rejoint les résultats de Petit et al. (2014) chez les mésanges à tête noire et de Vézina et al. (2017) sur le bécasseau maubèche (*Calidris canutus*). Étant donné la proportion de tissu que représentent les muscles dans la masse sèche maigre totale (73%), leur influence forte sur le métabolisme au repos n'est donc pas surprenante. Un résultat surprenant, par contre, a été l'observation d'un découplage entre le BMR et la masse corporelle chez les oiseaux acclimatés au froid alors que cette variable était, telle qu'attendue, positivement corrélée à la masse chez les individus maintenus à thermoneutralité. Les mésanges acclimatées au froid ont augmenté leur métabolisme basal par rapport à celles acclimatées à thermoneutralité et ceci indépendamment d'une variation de masse corporelle. Ceci est surprenant étant donné que la masse corporelle est en général corrélée à la masse des organes plus qu'à la température ambiante

(Swanson, 2010). Il semble donc que cette augmentation de BMR est la conséquence d'une augmentation de l'intensité métabolique tissulaire.

Conclusion: Le métabolisme basal est supérieur au froid, relativement à la température thermoneutre, et ce ne sont pas les organes digestifs et excréteurs qui sont impliqués dans cette augmentation mais essentiellement la musculature. Dans notre expérience, l'élévation des coûts de maintenance basale chez les oiseaux acclimatés au froid pourrait être la conséquence d'une augmentation d'intensité métabolique dans les muscles.

C.2 Chapitre 2

Question 1: Le densité en mitochondries augmente-t-elle en réponse au froid?

L'activité enzymatique de la CS et de la CCO a été utilisée comme marqueurs de la densité en mitochondries dans les tissus musculaires et hépatiques, la CS représentant un marqueur du volume mitochondrial et la CCO, un marqueur de la surface membranaire mitochondriale (Picard et al. 2011, 2012; Larsen et al. 2012; Munro et al., 2013). Nos résultats démontrent que l'acclimatation thermique n'influence pas l'activité de la CS et de la CCO rapportée par mg de tissu. Cependant, l'activité totale de la CS dans le muscle pectoral et de la CCO dans le foie sont de 26% et de 39% supérieures, respectivement, dans le groupe acclimaté au froid relativement au groupe maintenu à thermoneutralité. Ceci révèle donc que la capacité à fournir des électrons à l'ETS dans le muscle pectoral et la capacité à évacuer ces électrons de l'ETS dans le foie sont supérieures chez les individus acclimatés au froid quand on considère l'activité totale. Étant donné que la masse du foie est supérieure, bien que non significativement, de 18% chez les individus du groupe acclimaté au froid (chapitre 1), nous pouvons envisager que celle-ci expliquerait cette augmentation de l'activité de la CCO. Un foie plus large impliquerait une plus grande surface totale de mitochondries, donc une plus grande

quantité d'enzymes et donc également une plus grande capacité oxydative. En revanche, la masse du muscle pectoral est supérieure (non significativement) de seulement 5% chez les individus maintenus à -10°C . Il nous est donc plus difficile de conclure dans ce cas-ci de la même manière que pour le foie. Vraisemblablement, le fait de multiplier l'activité de la CS et de la CCO avec la masse totale de l'organe a permis détecter un effet significatif du traitement sur ces activités dans le foie et dans le muscle pectoral.

Conclusion: L'acquisition d'une meilleure endurance au froid ne s'effectue pas par un ajustement quantitatif, c'est à dire de la densité en mitochondries, par unité de masse tissulaire dans le muscle pectoral ou le foie.

Question 2: Il y a-t-il eu un changement qualitatif de la capacité de respiration mitochondriale?

Étant donné que les muscles sont impliqués dans la thermogénèse, au moins par le frissonnement (Hohtola et al., 1998; Marjoniemi and Hohtola, 1999; Hohtola, 2004), nous nous attendions à observer un effet du traitement thermique sur les paramètres mitochondriaux du muscle. Nous avons cependant constaté dans cet organe une absence d'effet du traitement sur (1) la respiration due à la fuite de protons, c'est à dire la capacité à produire de la chaleur par un cycle futile, et sur (2) la respiration due à l'activité de CI et CII en présence d'ADP, c'est à dire la capacité à générer le gradient de protons nécessaire à la production d'ATP. Ceci vient donc rejeter notre hypothèse : l'endurance au froid n'est pas améliorée par une thermogénèse sans frissonnement due à une fuite de protons mitochondriale ou à la phosphorylation oxydative. Elle n'est probablement pas non plus améliorée par une augmentation de la capacité à produire de l'ATP dans le cadre de la phosphorylation oxydative. Ceci rejoint les résultats de Salin et al. (2010) et Teulier et al. (2010) qui ont observé une absence de variation de la phosphorylation oxydative chez des canetons de canards musqués acclimatés au froid.

Salin et al. (2010) ont aussi observé une absence de variation de la fuite de protons membranaire chez ces mêmes canetons. Cependant, nous pouvons nous interroger à propos de ces études d'un possible impact de l'effet de la croissance sur le métabolisme des canetons comparativement à notre étude où nous avons travaillé avec des oiseaux adultes. Par conséquent, si la capacité thermogénique en réponse au froid s'ajuste à l'échelle des cellules musculaires, nos résultats suggèrent que cela ne s'opère probablement pas au niveau de la capacité de respiration mitochondriale telle que mesurée mais plutôt par l'entremise de mécanismes non mesurés.

Dans le foie, en revanche, nous avons observé une variation de certaines composantes de la respiration en réponse au traitement thermique. Notre étude présente des évidences de l'existence d'une réduction qualitative au froid de la fuite de protons (LEAK) et de la capacité maximale du transport d'électrons dans l'ETS (OXPHOS_{CI+CII}) quand normalisés par l'activité de la CCO. Ces résultats s'avèrent surprenant car une augmentation de l'intensité métabolique du tissu hépatique était également envisagée. L'acclimatation au froid stimule chez des canetons de canards musqués (*Cairina moschata*) l'activation des voies métaboliques tels que la lipogénèse et la gluconéogénèse, voies qui consomment de l'énergie (Bedu et al., 2001, 2002). Or, nous avons observé une consommation alimentaire supérieure de 44% chez les oiseaux acclimatés au froid, suggérant que les besoins énergétiques sont accrus chez ces individus, certainement pour répondre aux coûts de thermorégulation. Par conséquent, l'intensité métabolique du foie devrait augmenter, à cause de la stimulation des voies métaboliques induite par une plus grande consommation de nourriture. Dans notre cas, c'est le contraire qui est observé. Bien que toutes les autres valeurs de respiration mitochondriale ne diffèrent pas significativement entre les traitements, nos résultats révèlent cependant que la respiration non-phosphorylante et phosphorylante est globalement inférieure à -10° comparativement à 27°C (Tableau 2.2). Par conséquent, même si nous n'avons pas pu le détecter statistiquement, il y a pour une raison que nous ignorons, une nette tendance dans nos valeurs à une réduction du métabolisme mitochondrial dans le foie chez les mésanges acclimatées au froid.

Un autre effet surprenant du traitement observé dans le foie est une influence de la masse corporelle sur certains paramètres mitochondriaux, influence qui diffère en fonction des traitements thermiques. Ainsi, à -10°C , plus un individu est petit, plus son taux respiration non-phosphorylant normalisés par l'activité de la CS (mesure qualitative) est élevée, alors qu'à thermoneutralité aucune corrélation n'est observée. Bien que nous ne connaissions pas exactement le mécanisme à l'origine d'une telle observation, le taux de respiration semble être plus élevé chez les oiseaux les plus légers mais ceci spécifiquement chez les individus acclimatés à -10°C .

Conclusion: La respiration phosphorylante et non-phosphorylante du muscle pectoral est similaire entre les individus des deux traitements thermiques. L'augmentation de l'endurance au froid n'est donc pas le résultat d'une augmentation de thermogénèse sans frissonnement utilisant la fuite de protons ou la phosphorylation oxydative et d'une augmentation de la capacité à produire de l'ATP (phosphorylation oxydative) pour soutenir une meilleure capacité de frissonnement. En revanche, il semble y avoir dans le foie des individus acclimatés au froid une réduction de la performance métabolique mitochondriale.

Question 3: La respiration mitochondriale est-elle corrélée au M_{sum} ?

Notre hypothèse étant que le mécanisme de fuite de protons et/ou la phosphorylation oxydative sont impliqués, soit par l'apport en chaleur, soit par l'apport en ATP, dans la thermogénèse, nous nous attendions à observer une corrélation entre l'endurance au froid estimée par le M_{sum} et les paramètres caractérisant la respiration mitochondriale dans cette étude. C'est à dire que les individus ayant un M_{sum} supérieur seraient aussi ceux ayant une capacité de phosphorylation oxydative ou une fuite de protons plus élevée. Nos résultats ont mis en évidence une relation significative entre la respiration non-phosphorylante et la capacité thermogénique. Les individus au froid

avec un M_{sum} élevé sont ceux ayant un LEAK élevé. Donc, les individus avec une plus grande capacité thermogénique dans le groupe froid pourrait bénéficier d'un ou des avantages que procureraient une fuite de protons membranaire plus élevée. La fuite de protons pourrait participer à un autre mécanisme que celui de la thermogénèse et celui-ci serait suscité lors d'une augmentation de métabolisme (MMR ou M_{sum}). Mais quel bénéfice pourrait apporter la fuite de protons à la capacité thermogénique au froid, tout en ne variant pas entre les deux traitements? Les principaux éléments qui pourraient faire un lien entre la capacité thermogénique et la fuite de protons sont d'une part la gestion du stress oxydatif, d'autre part la composition lipidique des membranes mitochondriales. Nous allons y revenir dans la fin de cette partie conclusive.

Conclusion: Il existe, chez les mésanges acclimatées au froid, une association entre la capacité thermogénique et la capacité de fuite de protons mais cette relation ne peut vraisemblablement pas témoigner d'un rôle de la fuite de protons dans la thermogénèse étant donné l'absence de différence entre les traitements.

C.3. Synthèse générale

L'objectif premier de cette étude était d'améliorer la compréhension des mécanismes régissant la thermogénèse adaptative en réponse au froid chez les oiseaux, spécifiquement ceux de petite taille. Des études montrent que l'acclimatation au froid chez les oiseaux a pour conséquence une augmentation de l'activité du transport et du catabolisme des lipides (Liknes et Swanson, 2011a; Swanson et al., 2014b; Zhang et al., 2015; Vézina et al., 2017; Zhang et al., 2017), du cycle de Krebs (O'Connor et al., 1995; Liknes et Swanson, 2011a; Swanson et al., 2014 a, b; Peña-Villalobos et al., 2014; Vézina et al., 2017) et de la respiration due à la fuite de protons et à la phosphorylation oxydative (Roussel et al., 1998; Zheng et al., 2008a; Teulier et al., 2010; Zheng et al., 2014; Zhou et al., 2016). D'autres études ont cependant observé une

absence de variation pour chacune de ces composantes (Sgueo et al., 2012; Salin et al., 2010; Peña-Villalobos et al., 2014; Zhang et al., 2015; Swanson et al. 2017). Dans notre cas, nous n'avons pas observé d'effet clair, marqué du traitement thermique sur la respiration due à la fuite de protons et à la phosphorylation oxydative. Évidemment, certaines différences entre les études sont potentiellement explicables par des différences méthodologiques, certaines techniques étant plus sensibles que d'autres. Par exemple, dans le cas de notre étude, nous avons travaillé avec des fibres et des hépatocytes perméabilisés alors que la grande majorité des études que nous avons citées ont effectué leurs mesures sur des mitochondries isolées. Or, ces deux méthodes peuvent engendrer des différences de résultats non-négligeables (Kuznetsov et al., 2008; Picard et al., 2011; Korzeniewski, 2015). Il est également possible, tel qu'énoncé récemment par Swanson et al. (2014) que la réponse métabolique au froid ne soit pas uniforme entre les espèces mais au contraire diversifiée. Vraisemblablement, chez la mésange à tête noire, l'acquisition d'une meilleure endurance au froid n'implique ni un gain de masse musculaire, ni un gain de thermogénèse résultant de variations au niveau de la fuite de protons mitochondriale et de la phosphorylation oxydative

Nous avons pu constater que le M_{sum} est corrélé à un paramètre mesuré dans le muscle (la fuite de protons) et que le BMR est corrélé à un paramètre mesuré dans le foie (OXPHOS_{CI}). Bien que nous n'ayons pas observé l'influence attendue de la masse du foie sur le BMR, cette différence entre BMR et M_{sum} vient souligner l'idée que le muscle est le principal organe impliqué dans la thermogénèse et le foie un des principaux organes influençant le BMR (Williams et Tieleman, 2000; Zheng et al., 2008a; Swanson, 2010; Swanson et Vézina, 2013 ; Barcelò et al., 2017). Le découplage de la relation entre le BMR et la masse observée dans le chapitre 1 semble même trouver écho dans les corrélations obtenues entre BMR et OXPHOS_{CI} dans le chapitre 2. En effet, le BMR ne présentait pas de corrélation significative avec la masse corporelle chez les individus acclimatés à -10°C , contrairement à ceux acclimatés à 27°C . Cependant, le BMR était positivement corrélé à OXPHOS_{CI} du foie dans le groupe à -10°C alors qu'aucune corrélation n'était visible dans le groupe à 27°C .

C.4. Critiques de l'étude

C.4.1 Originalité et pertinence

Une des forces de cette étude réside dans son approche intégrative. Nous avons en effet associé aux mesures « systémiques » des mesures effectuées à l'échelle du compartiment anatomique et cellulaire, afin d'avoir une meilleure compréhension du mécanisme de thermorégulation tel qu'il est opéré *in vivo*. Ensuite, certaines incohérences, comme nous avons pu le voir, sont présentes entre les études portant sur l'implication de la variation de masse musculaire dans l'acclimatation au froid des petits passereaux. Swanson et al. (2014b) argumentent à ce sujet en mettant en parallèle les cas où pour une même espèce, il a été trouvé que dans une étude le M_{sum} et la masse des muscles augmentaient mais dans une autre qu'elle ne variait pas. Cependant, malgré ces découvertes fortuites observées dans certains cas, notre étude sur la mésange à tête noire est la première démonstration expérimentale de la non nécessité de développer de plus gros muscles pour augmenter l'endurance au froid. Bien que des mesures de respiration mitochondriale aient déjà été corrélées avec le BMR (Peña-Villalobos et al., 2014; Zheng et al., 2014; Zhou et al., 2016), notre étude est encore une fois la première à notre connaissance qui ait fait le lien avec le M_{sum} , indice d'endurance au froid couramment utilisé dans les études d'acclimatation au froid chez des oiseaux adultes. Nous n'avons certes pas mis le doigt sur un mécanisme exact à l'origine de l'augmentation de la capacité thermogénique observée dans le *chapitre 1*. Cependant, nous avons remis en question les deux idées principales soutenues dans la littérature et expliquant l'acquisition d'une meilleure endurance au froid, c'est à dire le gain de masse musculaire et la thermogenèse sans frissonnement par la fuite de protons. Ainsi, les résultats de notre étude suggèrent qu'il faut envisager d'autres pistes d'étude pour améliorer notre compréhension de la thermogenèse adaptative. Nous allons présenter certaines d'entre elles à la fin de cette partie conclusive.

Au niveau méthodologique, la majorité des études (mais voir aussi Scott et al., 2009; Kuzmiak et al. 2012; Fongy et al., 2013) ont travaillé en respiration non-phosphorylante (stade 4) et phosphorylante (stade 3) de CII seul (Roussel et al., 1998;

Zheng et al., 2008a; Teulier et al., 2010; Salin et al., 2010; Montgomery et al., 2011; Stier et al., 2013; Zheng et al., 2013; Zheng et al., 2014; Zhou et al., 2016). Afin d'avoir une meilleure représentation du système de transport d'électrons dans son ensemble, nous avons choisi de considérer les deux complexes permettant l'entrée d'électrons dans l'ETS, à savoir CI et CII, et nous avons mesuré la respiration non phosphorylante de CI afin de se rapprocher d'avantage des conditions *in vivo*. CI comme CII sont des sites d'oxydation des substrats issu du cycle de Krebs (Nicholls et Ferguson, 1992; Divakaruni et Brand, 2010), permettant l'entrée d'électrons dans l'ETS, mais seul CI (et aussi CIII et IV) est impliqué dans le transfert de protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire (Nicholls et Ferguson, 1992; Divakaruni et Brand, 2010). Ainsi, le rôle de CI dans la respiration mitochondriale est également à considérer car il se pourrait qu'il y ait des modulations d'activité au niveau de ce point d'entrée des électrons dans l'ETS. De plus, il semble que CI soit le site majeur de production de H₂O₂, une des espèces réactives de l'oxygène, dans le système de transport des électrons (Servais et al., 2003).

Afin toujours de nous rapprocher des conditions *in vivo*, nous avons aussi travaillé avec des fibres musculaires et des hépatocytes perméabilisés. La plupart des études mesurant la respiration mitochondriale chez les oiseaux ont utilisé des mitochondries isolées (Zheng et al., 2008a; Teulier et al., 2010; Salin et al., 2010; Montgomery et al., 2011; Kuzmiak et al. 2012; Stier et al., 2013; Zheng et al., 2014; Zhou et al., 2016). Or, il a été démontré que plusieurs des propriétés fonctionnelles clés mesurées dans des mitochondries isolées présentent des différences majeures avec celles mesurées dans des fibres ou des cellules perméabilisées. Une des raisons serait par exemple le fait que les mitochondries ne peuvent plus fonctionner en réseaux comme elles le font normalement (Korzeniewski, 2015). L'utilisation de fibres perméabilisées serait par conséquent pour le moment la méthode la plus représentative des conditions *in vivo* (Kuznetsov et al., 2008; Picard et al., 2011; Korzeniewski, 2015).

C.4.2 Limites du projet

Travailler sur du tissu vivant s'accompagne de plusieurs contraintes. La qualité de la préparation des tissus perméabilisés se dégrade tout d'abord assez rapidement avec le temps, la préservation des tissus dans la solution tampon étant limitée à quelques heures (~6h pour les souris; Pesta et Gnaiger, 2011). Ainsi, nous avons dû limiter les mesures à deux organes, le foie et les muscles, afin d'optimiser les journées de prise de données et de s'assurer que les tissus étaient le plus rapidement possible disséqués, perméabilisés et soumis à la mesure de respirométrie. Ces contraintes ne nous ont pas permise de mesurer l'effet du traitement thermique sur l'activité enzymatique du tissu cardiaque, ce qui serait recommandé de faire dans de futures recherches faisant suite à cette étude, étant donné son implication dans le métabolisme (Petit et al., 2013, Swanson et al., 2014a; Vézina et al., 2017; Barceló et al., 2017).

D'autre part, la manipulation des fibres durant la préparation est également déterminante et peut affecter les mesures de respiration, selon que les mitochondries dans le tissu soient relativement intactes ou que les membranes aient été brisées (Konarsiewski; 2015). Plusieurs enregistrements de respiration mitochondriale ont pu être affecté par la façon dont nous avons manipulé les tissus et les bris que cela a pu engendrer au niveau des mitochondries. D'ailleurs, l'ajout de cytochrome C durant les enregistrements, utilisé pour tester l'intégrité des membranes mitochondriales (Gnaiger, 2014), a indiqué à plusieurs reprises la présence potentielle d'une perte d'intégrité des membranes mitochondriales. Certains enregistrements n'ont pu être utilisés car nous n'avons pas réussi pour certains individus à obtenir une stabilisation satisfaisante du signal de consommation d'oxygène, possiblement à cause de cette perte d'intégrité ou pour une autre raison liée à la manipulation. Nous avons cependant exclu tous les enregistrements en question, conservant pour les analyses ceux avec des signaux relativement stables.

Nous n'avons aussi pas pu utiliser des substrats lipidiques pour les mesures de respiration mitochondriale, ce qui était envisagé étant donné que les oiseaux utilisent essentiellement les lipides comme substrat énergétique (Vaillancourt et al., 2005;

Guglielmo, 2010). Aucun des substrats lipidiques testés (acetyl, octanoyl, palmitoyl carnitines) n'a entraîné un signal de respiration satisfaisant. Ainsi, dans une future recherche chez la mésange à tête noire faisant continuité à cette étude, il serait pertinent d'effectuer de nouvelles mise au point afin de rendre le protocole plus optimal pour les mesures de respiration mitochondriale et de réussir à utiliser des substrats lipidiques pour se rapprocher des conditions *in vivo*.

Nous avons par ailleurs utilisé la respiration non-phosphorylante (sans ADP dans le milieu) due à l'activité de CI comme une mesure indicatrice du niveau de fuite de protons. Il a en effet été démontré qu'en l'absence de phosphorylation oxydative, c'est essentiellement la fuite de protons qui détermine le taux de respiration dans la mitochondrie (Brand et al 1988; Lowell et Spiegelman 2000). Nous avons donc utilisé une mesure indirecte de la fuite de protons en utilisant ce taux de respiration non-phosphorylante. Afin de confirmer l'absence d'effet de la température d'acclimatation observé sur cette mesure, nous pourrions compléter cette étude par des mesures de conductance protonique (perméabilité au H⁺ de la membrane mitochondriale) effectuées tel que présenté dans Salin et al. (2010) et Teulier et al. (2010). Ensuite, la mesure du taux de respiration OXPHOS_{CI} et OXPHOS_{CI+CII} nous a donné une information sur la capacité de l'ETS à faire circuler les électrons et ainsi à créer le gradient de protons. Nous n'avons donc pas dans ce cas-ci aussi une mesure directe de la production d'ATP ou de l'efficacité de l'ATP-synthase. Il serait pertinent de vérifier nos résultats et les compléter avec une telle mesure, comme déjà réalisé dans d'autres études chez les canetons (Salin et al., 2010; Teulier et al., 2010). Cela permettrait de confirmer ou non l'absence d'effet de l'acclimatation thermique sur la production d'ATP mitochondriale.

Un autre élément que nous n'avons pas considéré dans cette étude est le type de population mitochondrie du tissu musculaire. Le muscle squelettique contient deux types distincts de population mitochondriale, les mitochondries sarcolemmales (SS) et les mitochondries intermyofibrillaires (IMF) (Ferreira et al., 2010). Plusieurs différences entre ces deux populations de mitochondrie ont été démontrées à travers les études. Ferreira et al. (2010) ont observé après analyse protéomique de ces deux populations

que les mitochondries IMF seraient plus impliquées dans la phosphorylation oxydative fournissant l'énergie nécessaire à la contraction musculaire. La respiration mitochondriale en « stade 3 » est 2 à 3 fois supérieure pour les mitochondries IMF comparativement aux SS (Cogswell et al., 1993). L'activité de la CCO est de 20% supérieure dans les mitochondries IMF et l'activité de la succinate-déshydrogénase (CII) est de 40% supérieure dans les mitochondries SS, pour lesquelles il y a également une plus faible densité en mitochondries (Cogswell et al., 1993). Roussel et al. (2000) ont aussi démontré que la densité en ANT (Adénine Nucléotide Transférase), une enzyme assurant le transport de l'ADP à travers la membrane mitochondriale, est supérieure dans les mitochondries IMF comparativement aux mitochondries SS. Enfin, l'effet d'une acclimatation au froid ou d'un entraînement à un exercice physique n'entraîne pas les mêmes variations entre les deux types de mitochondries (Bizeau et al., 1998; Roussel et al., 2000). Par conséquent, étant donné ces différences de propriétés des mitochondries du tissu, il serait judicieux de réitérer notre expérience en prenant en compte cet élément.

C.5 Perspectives

L'étude ici présente nous a permis de répondre à nos questions initiales mais elle a également soulevé de nouvelles questions. Une des plus intéressante d'entre elles est la corrélation à -10°C entre l'endurance au froid et la fuite de protons mitochondriale du muscle pectoral. Comme il a été suggéré que la fuite de protons pourrait intervenir dans la gestion du stress oxydatif, des recherches pourraient être menées pour tester s'il existe une corrélation entre l'acquisition d'une plus grande capacité thermogénique et le niveau de dommages cellulaires dus aux espèces réactives de l'oxygène (ROS). Nous pourrions ainsi mener une recherche où seraient par exemple étudiés en parallèle la conductance membranaire aux protons, la peroxydation des lipides et le M_{sum} . Nous pourrions ainsi détecter si les individus ayant une plus grande conductance seraient ceux présentant moins de dommages causés par le stress oxydatif et une capacité thermogénique supérieure. Ce

type d'étude à d'ailleurs déjà été réalisé sur des juvéniles de truite (*Salmo trutta*) et a démontré que les individus ayant le métabolisme basal le plus élevé étaient ceux présentant le plus faible taux de ROS en conditions *in vivo* (Salin et al., 2015).

Nous nous sommes intéressés dans cette étude à deux mécanismes susceptibles d'être rendu plus performants dans un but de thermogénèse, le frissonnement et la respiration mitochondriale à travers le système de transport d'électrons. Le cycle futile de la pompe Ca^{2+} est un autre mécanisme étudié dans certaines études portant sur la thermorégulation aviaire et qui pourrait être investiguée dans le cas de la mésange à tête noire. Abondante dans le muscle squelettique, la pompe Ca^{2+} -ATPase située sur la membrane du réticulum sarcoplasmique (RES) est responsable du transport de Ca^{2+} du cytosol vers la lumière du réticulum, durant la relaxation musculaire. Ce mécanisme utilise l'hydrolyse de l'ATP dont une partie de l'énergie libérée sert au transport de ces molécules, l'autre partie étant dissipée sous forme de chaleur (Fig. C.1). Il semble par ailleurs que l'activité de cette pompe puisse être découplée: des récepteurs à ryanodine (RyR) localisée sur la membrane du RES assurent la libération de Ca^{2+} du lumen du RES vers le cytosol alors que la pompe effectue le mouvement inverse (Dumonteil et al., 1994; De Meis, 2000, 2001; De Meis et al, 2005). En stimulant l'activité de la pompe, la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol diminue et cela va stimuler l'activité des RyR pour rétablir le gradient. La pompe va par conséquent fonctionner à perte puisque ce mécanisme permet normalement une contraction musculaire or, dans ce cas-ci, il n'y a pas de travail généré et l'énergie est ainsi perdue sous forme de chaleur (De Meis, 2001; Hochachka et Somero, 2002). Dumonteil et al. (1993 et 1995) ont observé chez des canetons de canards musqués une hausse de l'expression et de la synthèse des protéines Ca^{2+} -ATPase en réponse à une exposition au froid prolongée. Celle-ci semblerait ne pas être en lien avec une hausse de l'activité musculaire de frissonnement mais plutôt avec une thermogénèse dissociée de celui-ci. Les pompes Ca^{2+} sont fortement impliquées dans le métabolisme cellulaire basal et sont davantage exprimées en réponse au froid (Dumonteil et al., 1993 et 1995 chez des canards musqués). En revanche, si ce cycle futile était impliqué chez nos mésanges, étant donné qu'une consommation futile d'ATP implique une augmentation de la phosphorylation

oxydative pour réalimenter le stock en ATP, nous aurions dû normalement observer une augmentation de $\text{OXPHOS}_{\text{CI}}$ et $\text{OXPHOS}_{\text{CI+CII}}$. Ce mécanisme n'est peut-être pas impliqué dans la thermogénèse adaptative chez la mésange à tête noire mais il serait nécessaire de confirmer cela à travers une autre étude chez cette même espèce.

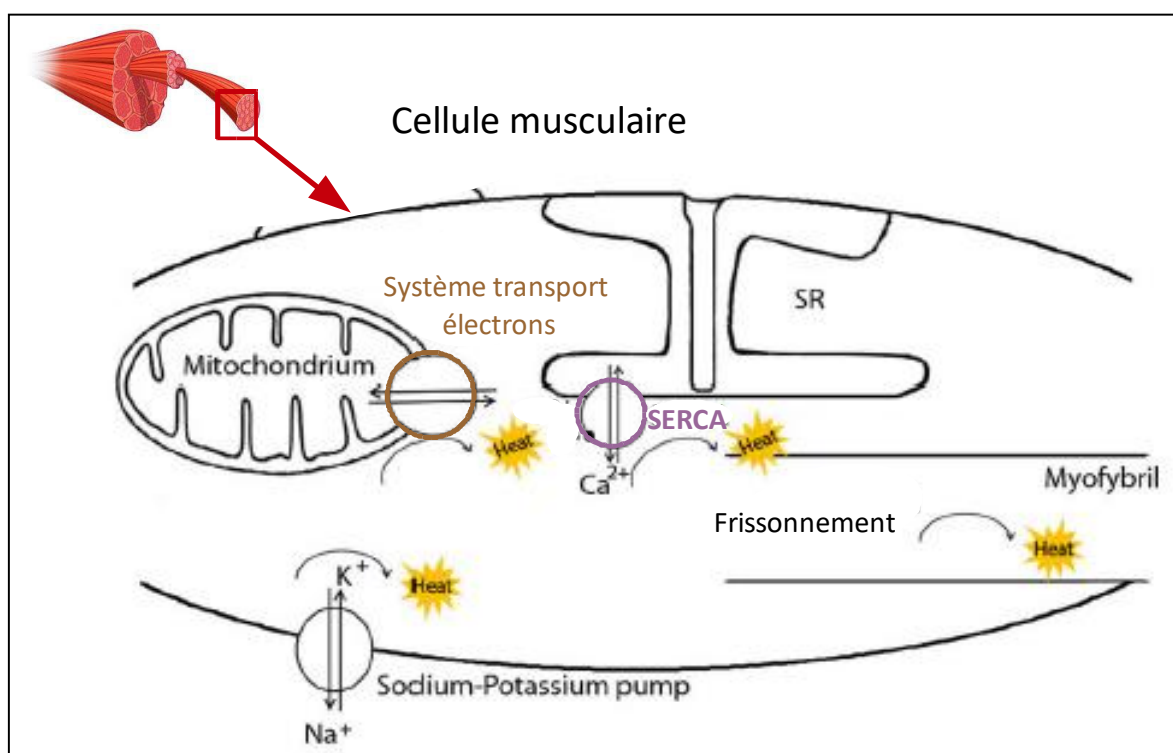


Figure C.1: Représentation schématique des trois mécanismes opérant dans les fibres musculaires et étant potentiellement à l'origine d'une thermogénèse (modifié, d'après Nowack et al., 2017).

Enfin, le rôle de la composition lipidique des membranes est également à envisager dans de futures recherches. La quantité de membranes lipidiques et leur composition agirait comme un « pace maker » sur le métabolisme (Hulbert et Else, 2000). Les membranes lipidiques des tissus métaboliquement actifs présentent plus d'acides gras polyinsaturés et moins de monoinsaturés que dans celles des tissus moins actifs. Cette polyinsaturation favoriserait l'augmentation de l'activité des

protéines membranaires environnantes, ce qui assurerait ainsi une plus grande performance métabolique (Hulbert et Else, 2000; Pierce et al, 2005; Hulbert et al, 2002). Dans l'évolution de l'endothermie, il est suggéré que des changements au niveau du système enzymatique régulant le niveau de saturation des acides gras aurait eu pour conséquence une augmentation de la polyinsaturation des membranes chez les premiers mammifères et ainsi à une augmentation du taux métabolique (Hulbert et Else, 2000). Chez les rats et les humains, un niveau élevé d'acides gras polyinsaturés n-6 dans la membrane phospholipidique du muscle a été associée avec une meilleure capacité d'endurance (Pierce et al., 2005). Par ailleurs, la polyinsaturation des acides gras des membranes est corrélée positivement et la monoinsaturation négativement avec la conductance protonique. Donc, la composition lipidique des membranes va également déterminer le niveau de fuite de protons. Il est donc clair que cette piste de recherche est à envisager fortement étant donné le rôle de la composition lipidique des membranes cellulaires dans le métabolisme.

En conclusion, notre étude a contribué à améliorer notre compréhension de l'endothermie chez les oiseaux. Elle a permis d'exclure (1) la variation de masse musculaire, (2) la thermogénèse sans frissonnement à travers la fuite de protons et (3) l'acquisition d'une plus grande capacité à produire de l'ATP pour le frissonnement comme mécanismes expliquant l'augmentation de l'endurance au froid. Les pistes de recherche proposées permettront certainement de préciser encore davantage la compréhension de comment cette caractéristique a évolué chez les Vertébrés.

RÉFÉRENCES

Introduction et conclusion générale

- Alexander, C. M., Kasza, I., Yen, C.-L. E., Reeder, S. B., Hernando, D., Gallo, R. L., Jahoda, C. A. B., Horsley, V. and MacDougald, O. A.** (2015). Dermal white adipose tissue: a new component of the thermogenic response (review). *J. Lipid Res.* **56**, 2061–2069.
- Angilletta, M. J., Cooper, B. S., Schuler, M. S. and Boyles, J. G.** (2010). The evolution of thermal physiology in endotherms. *Front. Biosci.* **2**, 861–881.
- Arens, J. R. and Cooper, S. J.** (2005). Metabolic and ventilatory acclimatization to cold stress in house sparrows (*Passer domesticus*). *Physiol. Biochem. Zool.* **78**, 579–589.
- Barraclough, T.G., Harvey, P.H., Nee, S.** (1995). Sexual selection and taxonomic diversity in passerine birds. *Proceedings of The Royal Society B* **259**, 211–215.
- Barceló, G., Love, O. P. and Vézina, F.** (2017). Uncoupling basal and summit metabolic rates in white-throated sparrows: digestive demand drives maintenance costs, but changes in muscle mass are not needed to improve thermogenic capacity. *Physiol. Biochem. Zool.* **90**, 000–000.
- Bennett, A. F.** (1991). The Evolution of activity capacity. *J. Exp. Biol.* **160**, 1–23.
- Bennett, A. F. and Ruben, J. A.** (1979). Endothermy and activity in vertebrates. *Science* **206**, 649–654.
- Bouâouda, H., Achâaban, M. R., Ouassat, M., Oukassou, M., Piro, M., Challet, E., El Allali, K. and Pévet, P.** (2014). Daily regulation of body temperature rhythm in the camel (*Camelus dromedarius*) exposed to experimental desert conditions. *Physiol. Rep.* **2**, 1–16.
- Brand, M. D., Hafner, R. P. and Brown, G. C.** (1988). Control of respiration in non-phosphorylating mitochondria is shared between the proton leak and the respiratory chain. *Biochem. J.* **255**, 535–539.
- Brand, M. D., Turner, N., Ocloo, A., Else, P. L. and Hulbert, A. J.** (2003). Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem. J.* **376**, 741–748.

- Brodin, A.** (2007). Theoretical models of adaptive energy management in small wintering birds. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **362**, 1857–71.
- Broggi, J., Hohtola, E., Orell, M. and Nilsson, J.-A.** (2005). Local adaptation to winter conditions in a passerine spreading north: a common-garden approach. *Evolution (N. Y.)* **59**, 1600–3.
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M. and West, G. B.** (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* **85**, 1771–1789.
- Cannon, B. and Nedergaard, J.** (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359.
- Carey, C., Dawson, W. R., Maxwell, L. C. and Faulkner, J. A.** (1978). Seasonal acclimatization to temperature in cardueline finches - II. Changes in body composition and mass in relation to season and acute cold stress. *J. Comp. Physiol. B* **125**, 101–113.
- Chappell, M. A., Bech, C. and Buttemer, W. A.** (1999). The relationship of central and peripheral organ masses to aerobic performance variation in house sparrows. *J. Exp. Biol.* **202**, 2269–2279.
- Clavijo-Baquet, S. and Bozinovic, F.** (2012). Testing the fitness consequences of the thermoregulatory and parental care models for the origin of endothermy. *PLoS One* **7**.
- Collin, A., Buyse, J., Van As, P., Darras, V. M., Malheiros, R. D., Moraes, V. M. B., Reyns, G. E., Taouis, M. and Decuyper, E.** (2003). Cold-induced enhancement of avian uncoupling protein expression, heat production, and triiodothyronine concentrations in broiler chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* **130**, 70–77.
- Cooper, S. J.** (2000). Seasonal energetics of mountain chickadees and juniper titmice. *Condor* **102**, 635–644.
- Cooper, S. J.** (2002). Seasonal metabolic acclimatization in mountain chickadees and juniper titmice. *Physiol. Biochem. Zool.* **75**, 386–395.
- Cooper, S. J. and Swanson, D. L.** (1994). Seasonal acclimatization of thermoregulation in the black-capped chickadee. *Condor* **96**, 638–646.
- Cooper, S.J., Gessaman, J. A.** (2005). Nocturnal hypothermia in seasonally acclimatized mountain chickadees and juniper titmice. *Condor* **107**, 151–155.

- Cooper, S.J., Sonsthagen, S.** (2007). Heat production from foraging activity contributes to thermoregulation in black-capped chickadees. *Condor* **109**, 446–451.
- Criscuolo, F., Gonzalez-Barroso, M. d. M., Maho, Y. L., Ricquier, D. and Bouillaud, F.** (2005). Avian uncoupling protein expressed in yeast mitochondria prevents endogenous free radical damage. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **272**, 803–810.
- Dawson, W. R. and Carey, C.** (1976). Seasonal acclimation to temperature in Cardueline finches-I. Insulative and metabolic adjustments. *J. Comp. Physiol.* **112**, 317–333.
- Dawson, W. R., Carey, C., Van't Hof, T. J.** (1992). Metabolic aspects of shivering thermogenesis in passerines during winter. *Ornis Scand.* **23**, 381–387.
- Desrochers, A.** (1990). Sex determination of black-capped chickadees with a discriminant analysis. *Journal of field ornithology* **61**, 79–84.
- Divakaruni, A. S. and Brand, M. D.** (2011). The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology* **26**, 192–205.
- Dridi, S., Onagbesan, O., Swennen, Q., Buyse, J., Decuypere, E. and Taouis, M.** (2004). Gene expression, tissue distribution and potential physiological role of uncoupling protein in avian species. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **139**, 273–283.
- Dubois, K., Hallot, F., Vézina, F.** (2016). Basal and maximal metabolic rates differ in their response to rapid temperature change among avian species. *Journal of comparative physiology B* **186**, 919–935.
- Duchamp, C., Marmonier, F., Denjean, F., Lachuer, J., Eldershaw, T. P. D., Rouanet, J. L., Morales, A., Meister, R., Bénistant, C., Roussel, D., et al.** (1999). Regulatory, cellular and molecular aspects of avian muscle nonshivering thermogenesis. *Ornis Fenn.* **76**, 151–165.
- Dumonteil, E., Barré, H., Meissner, G.** (1993). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor in cold-acclimated ducklings and thermogenesis. *Am. J. Physiol.* **265**, 507–513.
- Dumonteil, E., Barré, H. and Meissner, G.** (1994). Effects of palmitoyl carnitine and related metabolites on the avian Ca²⁺ ATPase and Ca²⁺ release channel. *J. Physiol.* **479**, 29–39.

- Dumonteil, E., Barré, H., Meissner, G.** (1995). Expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport proteins in cold-acclimating ducklings. *Am. J. Physiol.* **269**, 955-960.
- Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A., Pickering, S., et al.** (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**, 96–99.
- Enstipp, M. R., Gremillet, D. and Jones, D. R.** (2008). Heat increment of feeding in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) and its potential for thermal substitution. *J. Exp. Biol.* **211**, 49–57.
- Fair, J., Whitaker, S. and Pearson, B.** (2007). Sources of variation in haematocrit in birds. *Ibis (Lond. 1859)*. **149**, 535–552.
- Fell, D.** (1997). Understanding the control of metabolism. *Frontiers in Metabolism* (Book 2), Portland press, 1st edition, 1-300.
- Fongy, A., Romestaing, C., Blanc, C., Lacoste-Garanger, N., Rouanet, J.-L., Raccurt, M. and Duchamp, C.** (2013). Ontogeny of muscle bioenergetics in Adelie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **305**, 1065–1075.
- 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.
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M. and Charnov, E. L.** (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* **293**, 2248–2251.
- Golozoubova, V., Hohtola, E., Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B., Nedergaard, J.** (2001). Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *Faseb J.* **15**, 2048–2050.
- Grigg, G. C., Beard, L. A. and Augee, M. L.** (2004). The evolution of endothermy and its diversity in Mammals and Birds. *Physiol. Biochem. Zool.* **77**, 982–997.
- Guglielmo, C. G.** (2010). Move that fatty acid: Fuel selection and transport in migratory birds and bats. *Integr. Comp. Biol.* **50**, 336–345.
- Hammond, K. A., Chappell, M. A., Cardullo, R. A., Lin, R. and Johnsen, T. S.** (2000). The mechanistic basis of aerobic performance variation in red junglefowl. *J. Exp. Biol.* **203**, 2053–2064.

- Hart, J. S.** (1956). Seasonal change in insulation of the fur. *Can. J. Zool.* **34**, 53–57.
- Hart, J.S.** (1962). Seasonal acclimatization in four species of small wild birds. *Physiol. Zool.* **35**, 224–236.
- Heldmaier, G.** (1989). Seasonal acclimatization of energy requirements in mammals : functional significance of body weight control, hypothermia, torpor and hibernation. In *Proceedings of the 10th conference of the European society for comparative physiology and biochemistry*, 130–139.
- Heldmaier, G. and Ruf, T.** (1992). Body temperature and metabolic rate during natural hypothermia in endotherms. *J. Comp. Physiol. B* **162**, 696–706.
- Heldmaier, G., Ortman, S. and Elvert, R.** (2004). Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **141**, 317–329.
- Hill, R. W., Wyse, G. A., Anderson, M.** (2004). *Animal physiology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hochachka, P. W., Somero, G.N.** (2002) *Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution*. Oxford university press, New York.
- Hohtola, E.** (2004). Shivering thermogenesis in birds and mammals. In *Life in the cold: evolution, mechanisms, adaptation, and application. Twelfth International Hibernation Symposium. Barnes, B.M., and Carey H.V., eds.*, 241–252.
- Hohtola, E. and Stevens, E. D.** (1986). The relationship of muscle electrical activity, tremor and heat production to shivering thermogenesis in Japanese quail. *J. Exp. Biol.* **125**, 119–135.
- Hohtola, E., Henderson, R. P. and Rashotte, M. E.** (1998). Shivering thermogenesis in the pigeon: the effects of activity, diurnal factors, and feeding state. *Am. J. Physiol.* **275**, 1553–1562.
- Huey, R. B. and Berrigan, D.** (2001). Temperature, demography, and ectotherm fitness. *Am. Nat.* **158**, 204–210.
- Hulbert, A. J. and Else, P. L.** (2000). Mechanisms underlying the cost of living in animals. *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 207–235.
- Hulbert, A. J., Faulks, S., Buttemer, W. A., Else, P. L.** (2002). Acyl composition of muscle membranes varies with body size in birds. *J Exp Biol* **205**, 3561–3569.

- Hulbert, A. J., Turner, N., Hinde, J., Else, P. and Guderley, H.** (2006). How might you compare mitochondria from different tissues and different species? *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **176**, 93–105.
- Ivanov, K. P.** (2006). The development of the concepts of homeothermy and thermoregulation. *J. Therm. Biol.* **31**, 24–29.
- Kayser, C.H.** (1929). Régulation thermique après section médulaire dorsale chez le pigeon. Comptes rendus des séances et mémoires de la société de biologie, Paris.
- Korzeniewski, B.** (2015). “Idealized” state 4 and state 3 in mitochondria vs. rest and work in skeletal muscle. *PLoS One* **10**, 1–18.
- Koteja, P.** (2004). The Evolution of concepts on the evolution of endothermy in birds and mammals. *Physiol. Biochem. Zool.* **77**, 1043–1050.
- Kruuk, H., Balharry, E., Taylor, P. T.** (1994). Oxygen consumption of the Eurasian otter *Lutra lutra* in relation to water temperature. *Physiol. Zool.* **67**, 1174–1185.
- Kuzmiak, S., Glancy, B., Sweazea, K. L. and Willis, W. T.** (2012). Mitochondrial function in sparrow pectoralis muscle. *J. Exp. Biol.* **215**, 2039–2050.
- Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A. and Goglia, F.** (2003). Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett.* **543**, 5–10.
- Lasiewski, R. C. and Dawson, W. R.** (1967). A re-examination of the relation between standard metabolic rate and body weight in birds. *Condor* **69**, 13–23.
- Lee, Y.-P. and Lardy, H. A.** (1965). Influence of thyroid hormones on l- α - glycerophosphate dehydrogenases and other dehydrogenases in various organs of the rat. *J. Biol. Chem.* **240**, 1427–1436.
- Lehikoinen, E.** (1987) Seasonality of the daily weight cycle in wintering passerines and its consequences. *Ornis Scandinavica* **18**, No.3.
- Lemieux, H., Blier, P. U. and Gnaiger, E.** (2017). Remodeling pathway control of mitochondrial respiratory capacity by temperature in mouse heart: Electron flow through the Q-junction in permeabilized fibers. *Sci. Rep.* **7**, 1–13.
- Lewden, A., Petit, M., Milbergue, M., Orio, S. and Vézina, F.** (2014). Evidence of facultative daytime hypothermia in a small passerine wintering at northern latitudes. *Ibis (Lond. 1859)*. **156**, 321–329.

- Lewden, A., Enstipp, M. R., Picard, B., van Walsum, T. and Handrich, Y.** (2017). High peripheral temperatures in king penguins while resting at sea: thermoregulation versus fat deposition. *J. Exp. Biol.* **220**.
- Liknes, E. T. and Swanson, D. L.** (1996). Seasonal variation in cold tolerance, basal metabolic rate, and maximal capacity for thermogenesis in white-breasted nuthatches *sitta carolinensis* and downy woodpeckers *picoides pubescens*, two unrelated arboreal temperate resident. *J. Avian Biol.* **27**, 279–288.
- Liknes, E. T. and Swanson, D. L.** (2011a). Phenotypic flexibility in passerine birds: Seasonal variation of aerobic enzyme activities in skeletal muscle. *J. Therm. Biol.* **36**, 430–436.
- Liknes, E. T. and Swanson, D. L.** (2011b). Phenotypic flexibility of body composition associated with seasonal acclimatization in passerine birds. *J. Therm. Biol.* **36**, 363–370.
- Liknes, Eric T, Scott, Sarah M, Swanson, David, L.** (2002). Seasonal acclimatization in the American Goldfinch revisited: to what extent do metabolic rates vary seasonally. *Condor* **104**, 548–557.
- Liu, J.-S., Chen, Y.-Q. and Li, M.** (2006). Thyroid hormones increase liver and muscle thermogenic capacity in the little buntings (*Emberiza pusilla*). *J. Therm. Biol.* **31**, 386–393.
- Liwanag, H. E. M.** (2010). Energetic costs and thermoregulation in northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) pups: the importance of behavioral strategies for thermal balance in furred marine mammals. *Physiol. Biochem. Zool.* **83**, 898–910.
- Liwanag, H. E. M., Williams, T. M., Costa, D. P., Kanatous, S. B., Davis, R. W. and Boyd, I. L.** (2009). The effects of water temperature on the energetic costs of juvenile and adult California sea lions (*Zalophus californianus*): the importance of skeletal muscle thermogenesis for thermal balance. *J. Exp. Biol.* **212**, 3977–3984.
- Lovvorn, J.** (2007). Thermal substitution and aerobic efficiency: measuring and predicting effects of heat balance on endotherm diving energetics. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **362**, 2079–2093.
- Lowell, B. B. and Spiegelman, B. M.** (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* **404**, 652–60.
- Marjoniemi, K. and Hohtola, E.** (1999). Shivering thermogenesis in leg and breast muscles of galliform chicks and nestlings of the domestic pigeon. *Physiol. Biochem. Zool.* **72**, 484–492.

- Marmonier, F., Duchamp, C., Cohen-Adad, F., Eldershaw, T. P. D. and Barré, H.** (1997). Hormonal control of thermogenesis in perfused muscle of Muscovy ducklings. *Am. J. Physiol.* **273**, 1638–1648.
- Mathieu-Costello, O., Agey, P. J., Quintana, E. S., Rousey, K., Wu, L. and Bernstein, M. H.** (1998). Fiber capillarization and ultrastructure of pigeon pectoralis muscle after cold acclimation. *J. Exp. Biol.* **201**, 3211–3220.
- McCue, M. D.** (2006). Specific dynamic action: A century of investigation. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **144**, 381–394.
- McKechnie, A. E., Noakes, M. J. and Smit, B.** (2015). Global patterns of seasonal acclimatization in avian resting metabolic rates (review). *J. Ornithol.* **156**, 367–376.
- McKechnie, A. E.** (2008). Phenotypic flexibility in basal metabolic rate and the changing view of avian physiological diversity: a review. *J. Comp. Physiol. B.* **178**, 235–47.
- McKechnie, A. E. and Swanson, D. L.** (2010). Sources and significance of variation in basal, summit and maximal metabolic rates in birds. *Curr. Zool.* **56**, 1–31.
- McKechnie, A. E., Freckleton, R. P. and Jetz, W.** (2006). Phenotypic plasticity in the scaling of avian basal metabolic rate. *Proc. Biol. Sci.* **273**, 931–7.
- McNab, B. K.** (1997). On the utility of uniformity in the definition of basal rate of metabolism. *Physiol. Zool.* **70**, 718–720.
- McNab, B.K.** (2002). The physiological ecology of vertebrates: A view from energetics. Cornell university press, New York.
- de Meis, L.** (2000). ATP synthesis and heat production during Ca^{2+} efflux by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 35–39.
- de Meis, L.** (2001). Role of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase on heat production and thermogenesis. *Biosci. Rep.* **21**, 113–37.
- de Meis, L., Arruda, A. P. and Carvalho, D. P.** (2005). Role of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in thermogenesis. *Biosci. Rep.* **25**, 181–190.
- Montgomery, M. K., Hulbert, A. J. and Buttemer, W. A.** (2011). The long life of birds: The rat-pigeon comparison revisited. *PLoS One* **6**.

- Mueller, P. and Diamond, J.** (2001). Metabolic rate and environmental productivity: Well-provisioned animals evolved to run and idle fast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 12550–12554.
- Mujahid, A., Ueda, M., Akiba, Y. and Toyomizu, M.** (2005). Expression of avian UCP and ANT in skeletal muscle of cold-exposed laying and meat-type chickens. *J. Poult. Sci.* **42**, 230–237.
- Nagy, K. A., Girard, I. A. and Brown, T. K.** (1999). Energetics of free-ranging mammals, reptiles, and birds. *Annu. Rev. Nutr.* **19**, 247–277.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J.** (1992). Bioenergetics 2. Academic press, San Diego.
- Nowack, J., Giroud, S., Arnold, W., Ruf, T.** (2017). Muscle non-shivering thermogenesis and its role in the evolution of endothermy. *Front. Physiol.* **8**, 1–13.
- O'Connor, T. P.** (1995). Metabolic characteristics and body composition in house finches: effects of seasonal acclimatization. *J. Comp. Physiol. B* **165**, 298–305.
- O'Connor, T. P.** (1996). Geographic variation in metabolic seasonal acclimatization in house finches. *Condor* **98**, 371–381.
- Olson, J. R., Cooper, S. J., Swanson, D. L., Braun, M. J. and Williams, J. B.** (2010). The Relationship of metabolic performance and distribution in black-capped and Carolina chickadees. *Physiol. Biochem. Zool.* **83**, 263–275.
- Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., Lane, J. T. and Thompson, M. P.** (1991). Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J. Clin. Invest.* **87**, 125–132.
- Ostrowski, S., Williams, J.B., Ismael, K.** (2003). Heterothermy and the water economy of free-living Arabian oryx (*Oryx leucoryx*). *J. Exp. Biol.* **206**, 1471–1478.
- Peña-Villalobos, I., Nuñez-Villegas, M., Bozinovic, F. and Sabat, P.** (2014). Metabolic enzymes in seasonally acclimatized and cold acclimated rufous-collared sparrow inhabiting a Chilean Mediterranean environment. *Curr. Zool.* **60**, 338–350.
- Petit, M. and Vezina, F.** (2014). Phenotype manipulations confirm the role of pectoral muscles and haematocrit in avian maximal thermogenic capacity. *J. Exp. Biol.* **217**, 824–830.

- Petit, M., Lewden, A. and Vézina, F.** (2013). Intra-seasonal flexibility in avian metabolic performance highlights the uncoupling of basal metabolic rate and thermogenic capacity. *PLoS One* **8**, 1–11.
- Picard, M., Ritchie, D., Thomas, M. M., Wright, K. J. and Hepple, R. T.** (2011). Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. *Aging Cell* **10**, 1047–1055.
- Picard, M., Hepple, R. T. and Burelle, Y.** (2012). Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C629-41.
- Pierce, B. J.** (2005). Effect of dietary fatty acid composition on depot fat and exercise performance in a migrating songbird, the red-eyed vireo. *J. Exp. Biol.* **208**, 1277–1285.
- Piersma, T., Bruinzeel, L., Drent, R., Kersten, M., Vandermeer, J., Wiersma, P. and Meer, J. va. der** (1996). Variability in basal metabolic rate of a long-distance migrant shorebird (Red knot, *Calidris Canutus*) reflects shifts in organ sizes. *Physiol. Zool.* **69**, 191–217.
- Porter, R. K., Hulbert, A. J. and Brand, M. D.** (1996). Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **271**, 1550–1560.
- Prinzinger, R., Preßmar, A., Schleucher, E.** (1991). Body temperature in birds-mini review. *Comp. Biochem. Physiol. - Part A Mol. Integr. Physiol.* **99A**, 499–506.
- Raimbault, S., Dridi, S., Denjean, F., Lachuer, J., Couplan, E., Bouillaud, F., Bordas, A., Duchamp, C., Taouis, M. and Ricquier, D.** (2001). An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem. J.* **353**, 441–444.
- Randall, D., Burggren, W., French, K.** (2002). Animal physiology, mechanisms and adaptations. Eckert, 5th edition, New York.
- Rashotte, M. E., Saarela, S., Henderson, R. P. and Hohtola, E.** (1999). Shivering and digestion-related thermogenesis in pigeons during dark phase. *Am. J. Physiol.* **277**, 1579–1587.
- Rey, B., Spée, M., Belouze, M., Girard, A., Prost, J. and Roussel, D.** (2010). Oxygen recovery up-regulates avian UCP and ANT in newly hatched ducklings. *J. Comp. Physiol. B* **180**, 239–246.

- Ricklefs, D. B. M. and R. E.** (2016). The correlation between ecology and morphology in deciduous forest passerine birds. *65*, 1629–1640.
- Ricquier, D. and Bouillaud, F.** (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP (review). *Biochem. J.* **345**, 161–179.
- Rising, J. D. and Hudson, J. W.** (1974). Seasonal variation in the metabolism and thyroid activity of the black-capped chickadee (*Parus atricapillus*). *Condor* **76**, 198–203.
- Rolfe, D. F. and Brand, M. D.** (1996). Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *Am. J. Physiol.* **271**, 1380–1389.
- Rolfe, D. F. S. and Brown, G. C.** (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* **77**, 731–58.
- Rolfe, D. F., Newman, J. M., Buckingham, J. A., Clark, M. G. and Brand, M. D.** (1999). Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *Am. J. Physiol.* **276**, 692–699.
- Roussel, D., Rouanet, J. L., Duchamp, C. and Barre, H.** (1998). Effects of cold acclimation and palmitate on energy coupling in duckling skeletal muscle mitochondria. *FEBS Lett.* **439**, 258–262.
- Saarela, S. and Heldmaier, G.** (1987). Effect of photoperiod and melatonin on cold resistance, thermoregulation and shivering/nonshivering thermogenesis in Japanese quail. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **157**, 625–633.
- Saarela, S., Klapper, B. and Heldmaier, G.** (1995). Daily rhythm of oxygen consumption and thermoregulatory responses in some European winter- or summer-acclimatized finches at different ambient temperatures. *J. Comp. Physiol. B* **165**, 366–376.
- Salin, K., Teulier, L., Rey, B., Rouanet, J. L., Voituron, Y., Duchamp, C. and Roussel, D.** (2010). Tissue variation of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in cold-acclimated ducklings. *Acta Biochim. Pol.* **57**, 409–412.
- Schleucher, E. and Withers, P. C.** (2001). Re-evaluation of the allometry of wet thermal conductance for birds. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **129**, 821–827.
- Schmidt-Nielsen, K.** (1984) *Scaling: why animal size so important.* Cambridge university press.

- Schubert, K.A., Mennill, D.J., Ramsay, S.M., Otter, K.A., Ratcliffe, L.M., Kraus, C.** (2008). Between-year survival and ank transitions in male black-capped chickadees (*Poecile atricapillus*): a multistate modeling approach. *The Auk* **125**, 629-636.
- Secor, S. M.** (2009). Specific dynamic action: A review of the postprandial metabolic response (review). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **179**, 1–56.
- Sgueo, C., Wells, M. E., Russell, D. E. and Schaeffer, P. J.** (2012). Acclimatization of seasonal energetics in northern cardinals (*Cardinalis cardinalis*) through plasticity of metabolic rates and ceilings. *J. Exp. Biol.* **215**, 2418–2424.
- Sharbaugh, S. M.** (2001). Seasonal acclimatization to extreme climatic conditions by black capped chickadees (*Poecile atricapilla*) in interior Alaska (64°N). *Physiol. Biochem. Zool.* **74**, 568–575.
- Silva, J. E.** (1995). Hormone Control of Cancer. *Thyroid* **5**, 481–492.
- Silva, J. E.** (2003). The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications (review). *Physiol. Med.* **139**, 205–213.
- Silva, J. E.** (2006). Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol. Rev.* **86**, 435–464.
- Snyder, G. K., Coelho, J. R. and Jensen, D. R.** (1991). Body temperature regulation and oxygen consumption in young chicks fed thyroid hormone. *Can. J. Zool.* **69**, 1842–1947.
- Somero, G.N., Lockwood, Tomanek, L.** (2017) Biochemical adaptation: Response to environmental challenges from life's origins to the anthropocene. Sinauer associates, Inc. publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Stager, M., Swanson, D. L. and Cheviron, Z. A.** (2015). Regulatory mechanisms of metabolic flexibility in the dark-eyed junco (*Junco hyemalis*). *J. Exp. Biol.* **218**, 767–777.
- Stier, A., Bize, P., Schull, Q., Zoll, J., Singh, F., Geny, B., Gros, F., Royer, C., Massemin, S. and Criscuolo, F.** (2013). Avian erythrocytes have functional mitochondria, opening novel perspectives for birds as animal models in the study of ageing. *Front. Zool.* **10**, 1–9.
- Stuart, J. A., Cadenas, S., Jekabsons, M. B., Roussel, D. and Brand, M. D.** (2001). Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1504**, 144–158.

- Swanson, D. L.** (1990a). Seasonal variation in cold hardiness rates and peak rates of cold-induced thermogenesis in the dark-eyed junco (*Junco hyemalis*). *Auk* **107**, 561–566.
- Swanson, D. L.** (1990b). Seasonal variation of vascular oxygen transport in the dark-eyed junco. *Condor* **92**, 62–66.
- Swanson, D. L.** (1991). Substrate metabolism under cold stress in seasonally acclimatized dark-eyed juncos. *Physiol. Zool.* **64**, 1578–1592.
- Swanson, D. L.** (2001). Are summit metabolism and thermogenic endurance correlated in winter-acclimatized passerine birds? *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **171**, 475–481.
- Swanson, D. L.** (2010). Seasonal metabolic variation in birds: functional and mechanistic correlates. *Current Ornithology*, 75–129.
- Swanson, D. L. and Liknes, E. T.** (2006). A comparative analysis of thermogenic capacity and cold tolerance in small birds. *J. Exp. Biol.* **209**, 466–74.
- Swanson, D. L. and Merkord, C.** (2012). Seasonal phenotypic flexibility of flight muscle size in small birds: a comparison of ultrasonography and tissue mass measurements. *J. Ornithol.* **154**, 119–127.
- Swanson, D. L., King, M. O. and Harmon, E.** (2014). Seasonal variation in pectoralis muscle and heart myostatin and tolloid-like proteinases in small birds: A regulatory role for seasonal phenotypic flexibility? *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **184**, 249–258.
- Swanson, D. L. and Vézina, F.** (2015). Environmental, ecological and mechanistic drivers of avian seasonal metabolic flexibility in response to cold winters. *J. Ornithol.* **156**, 377–388.
- Swanson, D. L., Zhang, Y. and King, M. O.** (2013). Individual variation in thermogenic capacity is correlated with flight muscle size but not cellular metabolic capacity in American goldfinches (*Spinus tristis*). *Physiol. Biochem. Zool.* **86**, 421–431.
- Swanson, D., Zhang, Y. and King, M.** (2014a). Mechanistic drivers of flexibility in summit metabolic rates of small birds. *PLoS One* **9**.
- Swanson, D. L., Zhang, Y., Liu, J.-S., Merkord, C. L. and King, M. O.** (2014b). Relative roles of temperature and photoperiod as drivers of metabolic flexibility in dark-eyed juncos. *J. Exp. Biol.* **217**, 866–875.

- Swanson, D. L., McKechnie, A. E. and Vézina, F.** (2017). How low can you go? An adaptive energetic framework for interpreting basal metabolic rate variation in endotherms. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.*, 1–18.
- Swanson, D.L., Thomas, N. E.** (2007). The relationship of plasma indicators of lipid metabolism and muscle damage to overnight temperature in winter-acclimatized small birds. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **146**, 87–94.
- Talbot, D. a, Duchamp, C., Rey, B., Hanuise, N., Rouanet, J. L., Sibille, B. and Brand, M. D.** (2004). Uncoupling protein and ATP/ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins. *J. Physiol.* **558**, 123–35.
- Teulier, L., Rouanet, J.-L., Letexier, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rey, B., Duchamp, C. and Roussel, D.** (2010). Cold-acclimation-induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency. *J. Exp. Biol.* **213**, 2476–82.
- Teulier, L., Déglétagne, C., Rey, B., Tornos, J., Keime, C., de Dinechin, M., Raccurt, M., Rouanet, J. L., Roussel, D. and Duchamp, C.** (2012). Selective upregulation of lipid metabolism in skeletal muscle of foraging juvenile king penguins: An integrative study. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **279**, 2464–2472.
- Tieleman, B. I., Williams, J. B., Buschur, M. E. and Brown, C. R.** (2003). Phenotypic variation of larks along an aridity gradient: are desert birds more flexible? *Ecology* **84**, 1800–1815.
- Tieleman, B. I., Versteegh, M. a., Helm, B. and Dingemanse, N. J.** (2009). Quantitative genetics parameters show partial independent evolutionary potential for body mass and metabolism in stonechats from different populations. *J. Zool.* **279**, 129–136.
- Toyomizu, M., Ueda, M., Sato, S., Seki, Y., Sato, K. and Akiba, Y.** (2002). Cold-induced mitochondrial uncoupling and expression of chicken UCP and ANT mRNA in chicken skeletal muscle. *FEBS Lett.* **529**, 313–318.
- Vaillancourt, E., Prud'homme, S., Haman, F., Guglielmo, C. G. and Weber, J.-M.** (2005). Energetics of a long-distance migrant shorebird (*Philomachus pugnax*) during cold exposure and running. *J. Exp. Biol.* **208**, 317–325.
- Vézina, F., Thomas, D. W.** (2000). Social status does not affect resting metabolic rate in wintering dark-eyed Junco (*Junco hyemalis*). *Physiol. Biochem. Zool.* **73**, 231–236.

- Vézina, F. and Williams, T. D.** (2005). Interaction between organ mass and citrate synthase activity as an indicator of tissue maximal oxidative capacity in breeding European Starlings : implications for metabolic rate and organ mass relationships. *Funct. Ecol.* **19**, 119–128.
- Vézina, F., Jalvingh, K. M., Dekinga, A., Piersma, T., Vezina, F., Jalvingh, K. M., Dekinga, A. and Piersma, T.** (2006). Acclimation to different thermal conditions in a northerly wintering shorebird is driven by body mass-related changes in organ size. *J. Exp. Biol.* **209**, 3141–3154.
- Vézina, F., Dekinga, A. and Piersma, T.** (2011). Shorebirds' seasonal adjustments in thermogenic capacity are reflected by changes in body mass: How preprogrammed and instantaneous acclimation work together. *Integr. Comp. Biol.* **51**, 394–408.
- Vézina, F., Gerson, A. R., Guglielmo, C. G. and Piersma, T.** (2017). The performing animal: causes and consequences of body remodeling and metabolic adjustments in red knots facing contrasting thermal environments. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **313**, 120–131.
- Vézina, F., Thomas, D. W.** (2000). Social status does not affect resting metabolic rate in wintering dark-eyed Junco (*Junco hyemalis*). *Physiol. Biochem. Zool.* **73**, 231–236.
- Vianna, C. R., Hagen, T., Zhang, C., Bachman, E., Boss, O., Gereben, B., Moriscot, A. S., Lowell, B. B., Bicudo, J. E. P. W. and Antonio, C.** (2001). Cloning and functional characterization of an uncoupling protein homolog in hummingbirds. *Physiol Genomics* **5**, 137–145.
- Walter, I. and Seebacher, F.** (2009). Endothermy in birds: underlying molecular mechanisms. *J. Exp. Biol.* **212**, 2328–36.
- Weibel, E. R., Bacigalupe, L. D., Schmitt, B. and Hoppeler, H.** (2004). Allometric scaling of maximal metabolic rate in mammals: muscle aerobic capacity as determinant factor. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **140**, 115–132.
- West, G.C.** (1965). Shivering and heat production in wild birds. *Physiol. zool.* **38**, 111-120.
- Whittow, G.C.** (1998). Sturkie's avian physiology. London academic press, the 5th edition.
- Wiersma, P. and Chappell, M.A., Williams, J. B.** (2007). Cold-and exercise-induced peak metabolic rates in tropical birds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 20866–20871.

- Williams, J. B. and Tieleman, B. I.** (2000). Flexibility in basal metabolic rate and evaporative water loss among hoopoe larks exposed to different environmental temperatures. *J. Exp. Biol.* **203**, 3153–3159.
- Zhang, Y., King, M. O., Harmon, E. and Swanson, D. L.** (2015). Summer-to-winter phenotypic flexibility of fatty acid transport and catabolism in skeletal muscle and heart of small birds. *Physiol. Biochem. Zool.* **88**, 535–549.
- Zhang, Y., Eyster, K. and Swanson, D. L.** (2017). Context-dependent regulation of pectoralis myostatin and lipid transporters by temperature and photoperiod in dark-eyed juncos. *Curr. Zool.* 1–9.
- Zheng, W.-H., Li, M., Liu, J.-S. and Shao, S.-L.** (2008a). Seasonal acclimatization of metabolism in Eurasian tree sparrows (*Passer montanus*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **151**, 519–525.
- Zheng, W.-H., Liu, J.-S., Jiang, X.-H., Fnag, Y.-Y., Zhang, G.-K.** (2008b). Seasonal variation on metabolism and thermoregulation in Chinese bulbul. *J. Therm. Biol.* **33**, 315–319.
- Zheng, W.-H., Lin, L., Liu, J.-S., Pan, H., Cao, M.-T. and Hu, Y.-L.** (2013). Physiological and biochemical thermoregulatory responses of Chinese bulbuls *Pycnonotus sinensis* to warm temperature: Phenotypic flexibility in a small passerine. *J. Therm. Biol.* **38**, 240–246.
- Zheng, W.-H., Liu, J.-S. and Swanson, D. L.** (2014). Seasonal phenotypic flexibility of body mass, organ masses, and tissue oxidative capacity and their relationship to resting metabolic rate in Chinese bulbuls. *Physiol. Biochem. Zool.* **87**, 432–444.
- Zhou, L.-M., Xia, S.-S., Chen, Q., Wang, R.-M., Zheng, W.-H. and Liu, J.-S.** (2016). Phenotypic flexibility of thermogenesis in the hwamei (*Garrulax canorus*): responses to cold acclimation. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **310**, 330–336.

Chapitre I

1. **Dawson, W.R, Carey C, Van't Hof TJ.** Metabolic aspects of shivering thermogenesis in passerines during winter. *Ornis Scand.* **23**, 381–387 (1992).
2. **Saarela, S., Klapper, B., Heldmaier, G.** Daily rhythm of oxygen consumption and thermoregulatory responses in some European winter- or summer-acclimatized finches at different ambient temperatures. *J. Comp. Physiol. B.* **165**, 366–376 (1995).
3. **O'Connor, T.P.** Geographic variation in metabolic seasonal acclimatization in house finches. *Condor.* **98**, 371–381 (1996).
4. **Liknes, E.T., Swanson, D.L.** Seasonal variation in cold tolerance, basal metabolic rate, and maximal capacity for thermogenesis in white-breasted nuthatches *Sitta carolinensis* and downy woodpeckers. *J. Avian Biol.* **27**, 279–288 (1996).
5. **Cooper, S.J.** Seasonal metabolic acclimatization in mountain chickadees and juniper titmice. *Physiol. Biochem. Zool.* **75**, 386–395 (2002).
6. **Swanson, D.L.** Seasonal variation in cold hardiness rates and peak rates of cold-induced thermogenesis in the dark-eyed junco (*Junco hyemalis*). *The Auk.* **107**, 561–566 (1990).
7. **Zheng, W.-H., Li, M., Liu, J.-S., Shao, S.-L.** Seasonal acclimatization of metabolism in Eurasian tree sparrows (*Passer montanus*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **151**, 519–525 (2008a).
8. **Petit, M., Lewden, A., Vézina, F.** Intra-seasonal flexibility in avian metabolic performance highlights the uncoupling of basal metabolic rate and thermogenic capacity. *PLoS One.* **8**, 1–11 (2013).
9. **McNab, B.K.** On the utility of uniformity in the definition of basal rate of metabolism. *Physiol. Zool.* **70**, 718–720 (1997).
10. **McKechnie, A.E.** Phenotypic flexibility in basal metabolic rate and the changing view of avian physiological diversity: a review. *J. Comp. Physiol. B.* **178**, 235–47 (2008).
11. **McKechnie, A.E., Swanson, D.L.** Sources and significance of variation in basal, summit and maximal metabolic rates in birds. *Curr. Zool.* **56**, 741–758 (2010).
12. **McKechnie, A.E., Noakes, M.J., Smit, B.** Global patterns of seasonal acclimatization in avian resting metabolic rates. *J. Ornithol.* **156**, 367–376 (2015).

13. **Swanson, D.L., McKechnie, A.E., Vézina, F.** How low can you go? An adaptive energetic framework for interpreting basal metabolic rate variation in endotherms. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* DOI 10.1007/s00360-017-1096-3 (2017a).
14. **Swanson, D.L.** Are summit metabolism and thermogenic endurance correlated in winter-acclimatized passerine birds? *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **171** 475–481 (2001).
15. **Swanson, D.L., Liknes, E.T.** A comparative analysis of thermogenic capacity and cold tolerance in small birds. *J. Exp. Biol.* **209**, 466–74 (2006).
16. **Swanson, D.L.** Seasonal adjustments in metabolism and insulation in the dark-eyed junco. *Condor.* **93**, 538–545 (1991a).
17. **Williams, J.B., Tieleman, B.I.** Flexibility in basal metabolic rate and evaporative water loss among hoopoe larks exposed to different environmental temperatures. *J. Exp. Biol.* **203**, 3153–3159 (2000).
18. **Zheng, W.-H., Lin, L., Liu, J.-S., Pan, H., Cao, M.-T., Hu, Y.-L.** Physiological and biochemical thermoregulatory responses of Chinese bulbuls *Pycnonotus sinensis* to warm temperature: Phenotypic flexibility in a small passerine. *J. Therm. Biol.* **38**, 240–246 (2013b).
19. **Barceló, G., Love, O.P., Vézina, F.** Uncoupling basal and summit metabolic rates in white-throated sparrows: digestive demand drives maintenance costs, but changes in muscle mass are not needed to improve thermogenic capacity. *Physiol. Biochem. Zool.* **90**, DOI: 10.1086/689290 (2017).
20. **Piersma, T.** Energetic bottlenecks and other design constraints in avian annual cycles. *Integr. Comp. Biol.* **42**, 51–67 (2002).
21. **Vézina, F., Gustowska, A., Jalvingh, K.M., Chastel, O., Piersma, T.** Hormonal correlates and thermoregulatory consequences of molting on metabolic rate in a northerly wintering shorebird. *Physiol. Biochem. Zool.* **82**, 129–142 (2009).
22. **Piersma, T., Gessaman, J., Dekinga, A., Visser, G.** Gizzard and other lean mass components increase, yet basal metabolic rate decrease, when red noddies *Calidris canutus* are shifted from soft to hard-shelled food. *J. Avian Biol.* **35**, 99–104 (2004).
23. **Vézina, F., Williams, T.D.** Interaction between organ mass and citrate synthase activity as an indicator of tissue maximal oxidative capacity in breeding European Starlings: implications for metabolic rate and organ mass relationships. *Funct. Ecol.* **19**, 119–128 (2005).
24. **Swanson, D.L.** Seasonal metabolic variation in birds: functional and mechanistic correlates. *In Current Ornithology.* **17**, 75–129 (2010).

25. **Vézina, F., Gerson, A.R., Guglielmo, C.G., Piersma, T.** The performing animal: causes and consequences of body remodeling and metabolic adjustments in red knots facing contrasting thermal environments. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **313**, 120–131 (2017).
26. **Petit, M., Lewden, A., Vezina, F.** How does flexibility in body composition relate to seasonal changes in metabolic performance in a small passerine wintering at northern latitude? *Physiol. Biochem. Zool.* **87**, 539–549 (2014).
27. **Hohtola, E., Stevens, E.D.** The relationship of muscle electrical activity, tremor and heat production to shivering thermogenesis in Japanese quail. *J. Exp. Biol.* **125**, 119–135 (1986).
28. **Saarela, S., Heldmaier, G.** Effect of photoperiod and melatonin on cold resistance, thermoregulation and shivering/non-shivering thermogenesis in Japanese quail. *J. Comp. Physiol. B.* **157**, 625–633 (1987).
29. **Swanson, D.L.** Substrate metabolism under cold stress in seasonally acclimatized dark-eyed juncos. *Physiol. Zool.* **64**, 1578–1592 (1991b).
30. **O'Connor, T.P.** Metabolic characteristics and body composition in house finches: effects of seasonal acclimatization. *J. Comp. Physiol. B.* **165**, 298–305 (1995).
31. **Liknes, E.T., Swanson, D.L.** Phenotypic flexibility of body composition associated with seasonal acclimatization in passerine birds. *J. Therm. Biol.* **36**, 363–370 (2011a).
32. **Swanson, D.L., Vézina, F.** Environmental, ecological and mechanistic drivers of avian seasonal metabolic flexibility in response to cold winters. *J. Ornithol.* **156**, 377–388 (2015).
33. **Swanson, D.L., King, M.O., Culver, W., Zhang, Y.** Within-winter flexibility in muscle masses, myostatin, and cellular aerobic metabolic intensity in passerine birds. *Physiol. Biochem. Zool.* **90**, 210–222 (2017b).
34. **Vézina, F., Jalvingh, K.M., Dekinga, A., Piersma, T.** Acclimation to different thermal conditions in a northerly wintering shorebird is driven by body mass-related changes in organ size. *J. Exp. Biol.* **209**, 3141–54 (2006).
35. **Vézina, F., Dekinga, A., Piersma, T.** Shorebirds' seasonal adjustments in thermogenic capacity are reflected by changes in body mass: How preprogrammed and instantaneous acclimation work together. *Integr. Comp. Biol.* **51**, 394–408 (2011).
36. **Swanson, D.L., Zhang, Y., King, M.O.** Individual variation in thermogenic capacity is correlated with flight muscle size but not cellular metabolic capacity in American goldfinches (*Spinus tristis*). *Physiol. Biochem. Zool.* **86**, 421–431 (2013).

37. Swanson, D., Zhang, Y., King, M. Mechanistic drivers of flexibility in summit metabolic rates of small birds. *PLoS One*. **9**, 1-9 (2014a).
38. Swanson, D.L., Zhang, Y., Liu, J.-S., Merkord, C.L., King, M.O. Relative roles of temperature and photoperiod as drivers of metabolic flexibility in dark-eyed juncos. *J. Exp. Biol.* **217**, 866–875 (2014b).
39. Stager, M., Swanson, D.L., Cheviron, Z.A. Regulatory mechanisms of metabolic flexibility in the dark-eyed junco (*Junco hyemalis*). *J. Exp. Biol.* **218**, 767–777 (2015).
40. Hohtola, E. Shivering thermogenesis in birds and mammals. In *Life in the cold: evolution, mechanisms, adaptation, and application. Twelfth International Hibernation Symposium* (ed Barnes BM, Carey HV), 241–252, Fairbanks: Institute of Arctic Biology, University of Alaska (2004).
41. Cooper, S.J., Swanson, D.L. Seasonal acclimatization of thermoregulation in the black-capped chickadee. *Condor*. **96**, 638–646 (1994).
42. Petit, M., Vezina, F. Phenotype manipulations confirm the role of pectoral muscles and haematocrit in avian maximal thermogenic capacity. *J. Exp. Biol.* **217**, 824–830 (2014).
43. Swanson, D.L., King, M.O., Harmon, E. Seasonal variation in pectoralis muscle and heart myostatin and toll-like proteinases in small birds: A regulatory role for seasonal phenotypic flexibility? *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **184**, 249–258 (2014c).
44. Rising, J.D., Hudson, J.W. Seasonal variation in the metabolism and thyroid activity of the black-capped chickadee (*Parus atricapillus*). *Condor*. **76**, 198–203 (1974).
45. Lewden, A., Petit, M., Vézina, F. Dominant black-capped chickadees pay no maintenance energy costs for their wintering status and are not better at enduring cold than subordinate individuals. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **182**, 381–392 (2012).
46. Swanson, D.L., Drymalski, M.W., Brown, J.R. Sliding vs static cold exposure and the measurement of summit metabolism in birds. *J. Therm. Biol.* **21**, 221–226 (1996).
47. Prinzinger, R., Preßmar, A., Schleucher, E. Body temperature in birds—mini review. *Comp. Biochem. Physiol.—Part. A Mol. Integr. Physiol.* **99A**, 499–506 (1991).
48. Cooper, S.J., Gessaman, J.A. Nocturnal hypothermia in seasonally acclimatized mountain chickadees and juniper titmice. *Condor*. **107**, 151–155 (2005).

49. **Lighton, J.R.B.** *Measuring metabolic rate: a manual for scientists*. Oxford, UK: Oxford University Press (2008).
50. **Vaillancourt, E., Prud'homme, S., Haman, F., Guglielmo, C.G., Weber, J.-M.** Energetics of a long-distance migrant shorebird (*Philomachus pugnax*) during cold exposure and running. *J. Exp. Biol.* **208**, 317–325 (2005).
51. **Gessaman, A.J., Nagy, K.A.** Energy metabolism: errors in gas-exchange conversion factors. *Physiol. Zool.* **61**, 507–513 (1988).
52. **Scott, I., Evans, P.R.** The metabolic output of avian (*Sturnus vulgaris*, *Calidris alpina*) adipose tissue liver and skeletal muscle: Implications for BMR/body mass relationships. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* **103**, 329–332 (1992).
53. **Petit, M., Vézina, F., Piersma, T.** Ambient temperature does not affect fuelling rate in absence of digestive constraints in long-distance migrant shorebird fuelling up in captivity. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **180**, 847–856 (2010).
54. **Gosler, A.** Environmental and social determinants of winter fat storage in the great tit *Parus major*. *J. Anim. Ecol.* **65**, 1–17 (1996).
55. **Rising, J.D., Somers, K.M.** The measurement of overall body size in birds. *The Auk.* **106** 666–674 (1989).
56. **Piersma, T., Davidson, N.C.** Confusion of mass and size. *The Auk.* **108**, 441–443 (1991).
57. **Senar, J.C., Pascual, J.** Keel and tarsus may provide a good predictor of avian body size. *Ardea.* **85**, 269–274 (1997).
58. **Nespolo, R.F., Bacigalupe, L.D., Sabat, P., Bozinovic, F.** Interplay among energy metabolism, organ mass and digestive enzyme activity in the mouse-opossum *Thylamys elegans*: the role of thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* **205**, 2697–2703 (2002).
59. **Quinn G.P., Keough, M.J.** *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge, UK: Cambridge University Press (2002).
60. **Zheng, W.-H., Liu, J.-S., Swanson, D.L.** Seasonal phenotypic flexibility of body mass, organ masses, and tissue oxidative capacity and their relationship to resting metabolic rate in chinese bulbuls. *Physiol. Biochem. Zool.* **87**, 432–444 (2014).
61. **Maldonado, K.E., Cavieres, G., Veloso, C., Canals, M., Sabat, P.** Physiological responses in rufous-collared sparrows to thermal acclimation and seasonal acclimatization. *J. Comp. Physiol. B.* **179**, 335–43 (2009).
62. **Peña-Villalobos, I., Nuñez-Villegas, M., Bozinovic, F., Sabat, P.** Metabolic enzymes in seasonally acclimatized and cold acclimated rufous-collared sparrow

- inhabiting a Chilean Mediterranean environment. *Curr. Zool.* **60**, 338–350 (2014).
- 63. Karasov, W.H., Pinshow, B., Starck, J.M., Afik, D.** Anatomical and histological changes in the alimentary tract of migrating blackcaps (*Sylvia atricapilla*): a comparison among fed, fasted, food-restricted, and refed Birds. *Physiol. Biochem. Zool.* **77**, 149–160 (2004).
 - 64. Fassbinder-Orth, C.A., Karasov, W.H.** Effects of feed restriction and realimentation on digestive and immune function in the Leghorn chick. *Poult. Sci.* **85**, 1449–1456 (2006).
 - 65. Rolfe, D.F.S., Brown, G.C.** Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* **77**, 731–58 (1997).
 - 66. Liu, J.-S., Chen, Y.-Q., Li, M.** Thyroid hormones increase liver and muscle thermogenic capacity in the little buntings (*Emberiza pusilla*). *J. Therm. Biol.* **31**, 386–393 (2006).
 - 67. Zheng, W.-H., Lin, L., Liu, J.-S., Xu, X.-J., Li, M.** Geographic variation in basal thermogenesis in little buntings: Relationship to cellular thermogenesis and thyroid hormone concentrations. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **164**, 483–490 (2013a).
 - 68. Chappell, M.A., Bech, C., Buttemer, W.A.** The relationship of central and peripheral organ masses to aerobic performance variation in house sparrows. *J. Exp. Biol.* **202**, 2269–2279 (1999).
 - 69. Vézina, F., Williams, T.D.** Plasticity in body composition in breeding birds: what drives the metabolic costs of egg production? *Physiol. Biochem. Zool.* **76**, 716–730 (2003).
 - 70. Mathieu-Costello, O., Agey, P.J., Quintana, E.S., Rousey, K., Wu, L., Bernstein, M.H.** Fiber capillarization and ultrastructure of pigeon pectoralis muscle after cold acclimation. *J. Exp. Biol.* **201**, 3211–3220 (1998).
 - 71. Zhang, Y., Eyster, K., Liu, J.-S., Swanson, D.L.** Cross-training in birds: cold and exercise training produce similar changes in maximal metabolic output, muscle masses and myostatin expression in house sparrows, *Passer domesticus*. *J. Exp. Biol.* **218**, 2190–2200 (2015).
 - 72. Teulier, L., Rouanet, J.-L., Letexier, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rey, B. et al.** Cold-acclimation-induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency. *J. Exp. Biol.* **21**, 2476–82 (2010).
 - 73. Liknes, E.T., Swanson, D.L.** Phenotypic flexibility in passerine birds: Seasonal variation of aerobic enzyme activities in skeletal muscle. *J. Therm. Biol.* **36**, 430–436 (2011b).

- 74. Chaplin, S.B.** The physiology of hypothermia in the Black-capped chickadee, *Parus atricapillus*. *J. Comp. Physiol.* 112, 335-344 (1976).
- 75. Petit, M., Clavijo-Baquet, S., Vézina, F.** Increasing winter maximal metabolic rate improves intrawinter survival in small birds. *Physiol. Biochem. Zool.* 90: 166–177 (2017).

Chapitre II

- Barceló, G., Love, O. P. and Vézina, F.** (2017). Uncoupling basal and summit metabolic rates in white-throated sparrows: digestive demand drives maintenance costs, but changes in muscle mass are not needed to improve thermogenic capacity. *Physiol. Biochem. Zool.* **90**.
- Brand, M. D., Turner, N., Ocloo, A., Else, P. L. and Hulbert, A. J.** (2003). Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem. J.* **376**, 741–748.
- Brand, M. D., Pakay, J. L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D. C., Brookes, P. S. and Cornwall, E. J.** (2005). The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem. J.* **392**, 353–62.
- Chappell, M. A., Bech, C. and Buttemer, W. A.** (1999). The relationship of central and peripheral organ masses to aerobic performance variation in house sparrows. *J. Exp. Biol.* **202**, 2269–2279.
- Cheviron, Z.A., Swanson, D. L.** (2017). Comparative transcriptomics of seasonal phenotypic flexibility in two North American songbirds. *Integr. Comp. Biol.* **57**, 1040–1054.
- Cooper, S. J.** (2002). Seasonal metabolic acclimatization in mountain chickadees and juniper titmice. *Physiol. Biochem. Zool.* **75**, 386–395.
- Cooper, S.J. and Swanson, D. L.** (1994). Seasonal acclimatization of thermoregulation in the black-capped chickadee. *Condor* **96**, 638–646.
- Costantini, D.** (2008). Oxidative stress in ecology and evolution: Lessons from avian studies. *Ecol. Lett.* **11**, 1238–1251.
- Criscuolo, F., Gonzalez-Barroso, M. d. M., Maho, Y. L., Ricquier, D. and Bouillaud, F.** (2005). Avian uncoupling protein expressed in yeast mitochondria prevents endogenous free radical damage. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **272**, 803–810.
- Dawson, W.R., Olson, J. M.** (2003). Thermogenic Capacity and Enzymatic Activities in the Winter-Acclimatized Dark-Eyed Junco (*Junco hyemalis*). *J. Therm. Biol.* **28**, 497–508.
- Divakaruni, A. S. and Brand, M. D.** (2011). The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology* **26**, 192–205.

- Dridi, S., Onagbesan, O., Swennen, Q., Buyse, J., Decuypere, E. and Taouis, M.** (2004). Gene expression, tissue distribution and potential physiological role of uncoupling protein in avian species. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **139**, 273–283.
- Else, P. L., Brand, M.D., Turner, N., Hulbert, A. J.** (2004). Respiration rate of hepatocytes varies with body mass in birds. *J. Exp. Biol.* **207**, 2305–2311.
- Ferreira, R., Vitorino, R., Alves, R.M.P., Appell, H.J., Powers, S.K., Duarte, J.A., Amado, F.** (2010). Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle. *Proteomics* **10**, 3142–3154.
- Hill, R.W., Wyse, G.A., Anderson, M.** (2004). *Animal physiology*. Sinauer Associates, Inc. publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hohtola, E.** (2004). Shivering thermogenesis in birds and mammals. In *Life in the cold: evolution, mechanisms, adaptation, and application. Twelfth International Hibernation Symposium*. Barnes, B.M., and Carey H.V., eds., 241–252.
- Hohtola, E., Henderson, R. P. and Rashotte, M. E.** (1998). Shivering thermogenesis in the pigeon: the effects of activity, diurnal factors, and feeding state. *Am. J. Physiol.* **275**, 1553–1562.
- Hulbert, a J. and Else, P. L.** (1999). Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J. Theor. Biol.* **199**, 257–74.
- Hulbert, A. J., Faulks, S., Buttemer, W. A. and Else, P. L.** (2002). Acyl composition of muscle membranes varies with body size in birds. *J. Exp. Biol.* **205**, 3561–3569.
- Johnston, I., Calvo, J., Guderley, H., Fernandez, D. and Palmer, L.** (1998). Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes. *J. Exp. Biol.* **201 (Pt 1)**, 1–12.
- Korzeniewski, B.** (2015). “Idealized” state 4 and state 3 in mitochondria vs. rest and work in skeletal muscle. *PLoS One* **10**, 1–18.
- Krijgsveld, K. L., Ricklefs, R. E. and Visser, G. H.** (2012). Daily energy expenditure in precocial shorebird chicks: Smaller species perform at higher levels. *J. Ornithol.* **153**, 1203–1214.
- Kuznetsov, A. V., Strobl, D., Ruttman, E., Königsrainer, A., Margreiter, R. and Gnaiger, E.** (2002). Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Anal. Biochem.* **305**, 186–194.

- Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C. N., Nielsen, L. B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H. D., Boushel, R., Helge, J. W., Dela, F., et al.** (2012). Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J. Physiol.* **590**, 3349–3360.
- Liknes, E. T. and Swanson, D. L.** (2011). Phenotypic flexibility in passerine birds: Seasonal variation of aerobic enzyme activities in skeletal muscle. *J. Therm. Biol.* **36**, 430–436.
- Marjoniemi, K. and Hohtola, E.** (1999). Shivering thermogenesis in leg and breast muscles of galliform chicks and nestlings of the domestic pigeon. *Physiol. Biochem. Zool.* **72**, 484–492.
- Mathieu-Costello, O., Agey, P. J., Quintana, E. S., Rousey, K., Wu, L. and Bernstein, M. H.** (1998). Fiber capillarization and ultrastructure of pigeon pectoralis muscle after cold acclimation. *J. Exp. Biol.* **201**, 3211–3220.
- McKechnie, A. E., Noakes, M. J. and Smit, B.** (2015). Global patterns of seasonal acclimatization in avian resting metabolic rates (review). *J. Ornithol.* **156**, 367–376.
- McKechnie, A. E.** (2008). Phenotypic flexibility in basal metabolic rate and the changing view of avian physiological diversity: a review. *J. Comp. Physiol. B.* **178**, 235–47.
- McKechnie, A. E. and Swanson, D. L.** (2010). Sources and significance of variation in basal, summit and maximal metabolic rates in birds. *Curr. Zool.* **56**, 1–31.
- Monaghan, P., Metcalfe, N. B. and Torres, R.** (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol. Lett.* **12**, 75–92.
- Munro, D., Pichaud, N., Paquin, F., Kemeid, V. and Blier, P. U.** (2013). Low hydrogen peroxide production in mitochondria of the long-lived *Arctica islandica*: underlying mechanisms for slow aging. *Aging Cell* **12**, 584–592.
- Murrell, P.** (2005). R Graphics. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Florida.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J.** (1992). Bioenergetics 2. Academic press, San Diego.
- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, P., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S., et al.** (2003). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* **299**, 896–899.

- O'Connor, T. P.** (1995). Metabolic characteristics and body composition in house finches: effects of seasonal acclimatization. *J. Comp. Physiol. B* **165**, 298–305.
- Peña-Villalobos, I., Nuñez-Villegas, M., Bozinovic, F. and Sabat, P.** (2014). Metabolic enzymes in seasonally acclimatized and cold acclimated rufous-collared sparrow inhabiting a Chilean Mediterranean environment. *Curr. Zool.* **60**, 338–350.
- Pesta, D. and Gnaiger, E.** (2011). Preparation of Permeabilized Muscle Fibers for Diagnosis of Mitochondrial Respiratory Function. *Mitochondrial Physiol. Netw.* **14**, 1–4.
- Petit, M., Lewden, A. and Vezina, F.** (2014). How does flexibility in body composition relate to seasonal changes in metabolic performance in a small passerine wintering at northern latitude? *Physiol. Biochem. Zool.* **87**, 539–549.
- Picard, M., Ritchie, D., Wright, K. J., Romestaing, C., Thomas, M. M., Rowan, S. L., Taivassalo, T. and Hepple, R. T.** (2010). Mitochondrial functional impairment with aging is exaggerated in isolated mitochondria compared to permeabilized myofibers. *Aging Cell* **9**, 1032–1046.
- Picard, M., Ritchie, D., Thomas, M. M., Wright, K. J. and Hepple, R. T.** (2011). Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. *Aging Cell* **10**, 1047–1055.
- Picard, M., Hepple, R. T. and Burelle, Y.** (2012). Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C629-41.
- Porter, R. K., Hulbert, A. J. and Brand, M. D.** (1996). Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **271**, 1550–1560.
- Rey, B., Spée, M., Belouze, M., Girard, A., Prost, J. and Roussel, D.** (2010). Oxygen recovery up-regulates avian UCP and ANT in newly hatched ducklings. *J. Comp. Physiol. B* **180**, 239–246.
- Rising, J. D. and Hudson, J. W.** (1974). Seasonal variation in the metabolism and thyroid activity of the black-capped chickadee (*Parus atricapillus*). *Condor* **76**, 198–203.
- Rolfe, D. F. S. and Brand, M. D.** (1997). The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. *Biosci. Rep.* **17**, 9–16.

- Rolfe, D. F. S. and Brown, G. C.** (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* **77**, 731–58.
- Rolfe, D. F., Newman, J. M., Buckingham, J. A., Clark, M. G. and Brand, M. D.** (1999). Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *Am. J. Physiol.* **276**, 692–699.
- Roussel, D., Rouanet, J. L., Duchamp, C. and Barre, H.** (1998). Effects of cold acclimation and palmitate on energy coupling in duckling skeletal muscle mitochondria. *FEBS Lett.* **439**, 258–262.
- Saarela, S., Klapper, B. and Heldmaier, G.** (1995). Daily rhythm of oxygen consumption and thermoregulatory responses in some European winter- or summer-acclimatized finches at different ambient temperatures. *J. Comp. Physiol. B* **165**, 366–376.
- Salin, K., Auer, S. K., Rudolf, A. M., Anderson, G. J., Cairns, A. G., Mullen, W., Hartley, R. C., Selman, C. and Metcalfe, N. B.** (2015). Individuals with higher metabolic rates have lower levels of reactive oxygen species *in vivo*. *Biol. Lett.* **11**.
- Salin, K., Auer, S. K., Rudolf, A. M., Anderson, G. J., Selman, C. and Metcalfe, N. B.** (2016). Variation in metabolic rate among individuals is related to tissue-specific differences in mitochondrial leak respiration. *Physiol. Biochem. Zool.* **89**, 511–523.
- Scott, G. R., Richards, J. G. and Milsom, W. K.** (2009). Control of respiration in flight muscle from the high-altitude bar-headed goose and low-altitude birds. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **297**, 1066–1074.
- Servais, S., Couturier, K., Koubi, H., Rouanet, J.L., Desplanches, D., Sornay-Mayet, M.H, Sempore, B., Lavoie, J.M., Favier, R.** (2003). Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 24-32.
- Silva, J. E.** (2003). The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications (review). *Physiol. Med.* **139**, 205–213.
- Stager, M., Swanson, D. L. and Cheviron, Z. A.** (2015). Regulatory mechanisms of metabolic flexibility in the dark-eyed junco (*Junco hyemalis*). *J. Exp. Biol.* **218**, 767–777.
- Swanson, D. L.** (2010). Seasonal metabolic variation in birds: functional and mechanistic correlates. *Current Ornithol.*, 75–129.

- Swanson, D. L. and Liknes, E. T.** (2006). A comparative analysis of thermogenic capacity and cold tolerance in small birds. *J. Exp. Biol.* **209**, 466–74.
- Swanson, D. L. and Vézina, F.** (2015). Environmental, ecological and mechanistic drivers of avian seasonal metabolic flexibility in response to cold winters. *J. Ornithol.* **156**, 377–388.
- Swanson, D. L., Zhang, Y. and King, M. O.** (2013). Individual variation in thermogenic capacity is correlated with flight muscle size but not cellular metabolic capacity in American goldfinches (*Spinus tristis*). *Physiol. Biochem. Zool.* **86**, 421–431.
- Swanson, D., Zhang, Y. and King, M.** (2014a). Mechanistic drivers of flexibility in summit metabolic rates of small birds. *PLoS One* **9**.
- Swanson, D. L., Zhang, Y., Liu, J.-S., Merkord, C. L. and King, M. O.** (2014b). Relative roles of temperature and photoperiod as drivers of metabolic flexibility in dark-eyed juncos. *J. Exp. Biol.* **217**, 866–875.
- Swanson, D. L., King, M. O., Culver, W. and Zhang, Y.** (2017). Within-winter flexibility in muscle masses, myostatin, and cellular aerobic metabolic intensity in passerine birds. *Physiol. Biochem. Zool.* **90**, 210–222.
- Talbot, D. a, Duchamp, C., Rey, B., Hanuise, N., Rouanet, J. L., Sibille, B. and Brand, M. D.** (2004). Uncoupling protein and ATP/ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins. *J. Physiol.* **558**, 123–35.
- Teulier, L., Rouanet, J.-L., Letexier, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rey, B., Duchamp, C. and Roussel, D.** (2010). Cold-acclimation-induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency. *J. Exp. Biol.* **213**, 2476–82.
- Vézina, F. and Williams, T. D.** (2005). Interaction between organ mass and citrate synthase activity as an indicator of tissue maximal oxidative capacity in breeding European Starlings : implications for metabolic rate and organ mass relationships. *Funct. Ecol.* **19**, 119–128.
- Vézina, F., Dekinga, A. and Piersma, T.** (2011). Shorebirds' seasonal adjustments in thermogenic capacity are reflected by changes in body mass: How preprogrammed and instantaneous acclimation work together. *Integr. Comp. Biol.* **51**, 394–408.
- Vézina, F., Gerson, A. R., Guglielmo, C. G. and Piersma, T.** (2017). The performing animal: causes and consequences of body remodeling and metabolic adjustments in

red knots facing contrasting thermal environments. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **313**, 120–131.

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

West, G. B., Woodruff, W. H. and Brown, J. H. (2002). Allometric scaling of metabolic rate from molecules and mitochondria to cells and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 2473–2478.

Williams, J. B. and Tieleman, B. I. (2000). Flexibility in basal metabolic rate and evaporative water loss among hoopoe larks exposed to different environmental temperatures. *J. Exp. Biol.* **203**, 3153–3159.

Zhang, Y., Eyster, K. and Swanson, D. L. (2017). Context-dependent regulation of pectoralis myostatin and lipid transporters by temperature and photoperiod in dark-eyed juncos. *Curr. Zool.* **64**, 23–31.

Zheng, W.-H., Li, M., Liu, J.-S. and Shao, S.-L. (2008). Seasonal acclimatization of metabolism in Eurasian tree sparrows (*Passer montanus*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **151**, 519–525.

Zheng, W.-H., Lin, L., Liu, J.-S., Pan, H., Cao, M.-T. and Hu, Y.-L. (2013). Physiological and biochemical thermoregulatory responses of Chinese bulbuls *Pycnonotus sinensis* to warm temperature: Phenotypic flexibility in a small passerine. *J. Therm. Biol.* **38**, 240–246.

Zheng, W.-H., Liu, J.-S. and Swanson, D. L. (2014). Seasonal phenotypic flexibility of body mass, organ masses, and tissue oxidative capacity and their relationship to resting metabolic rate in Chinese bulbuls. *Physiol. Biochem. Zool.* **87**, 432–444.

Zhou, L.-M., Xia, S.-S., Chen, Q., Wang, R.-M., Zheng, W.-H. and Liu, J.-S. (2016). Phenotypic flexibility of thermogenesis in the hwamei (*Garrulax canorus*): responses to cold acclimation. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **310**, 330–336.

