

Etude de paramètres physiologiques par calorimétrie indirecte chez le hamster sibérien en conditions hivernales par rapport aux estivales



I. Introduction

En milieu naturel, les animaux sont constamment confrontés aux modifications des conditions environnementales, notamment lors de la succession des saisons. En effet, lors du passage de l'été à l'hiver, la température ambiante chute, la photopériode diminue et les ressources alimentaires se font plus rares. Pour résister à ces changements climatiques, les animaux mettent souvent en oeuvre des adaptations (physiologiques, morphologiques, comportementales) plus ou moins nombreuses qui leur permettent de passer la mauvaise saison et, par exemple, se reproduire dès le retour du printemps. Certaines espèces, telles que le spermophile de Richardson ou le hérisson, sont adaptées à l'hiver en hibernant. D'autres, telles que les oies sauvages ou cigognes blanches, migrent vers des régions plus chaudes à l'arrivée de l'hiver. Toutes ces adaptations ont cependant un coût, important ou non, sur le métabolisme général des animaux.

Dans cette étude, nous allons tenté, pour le hamster sibérien, espèce qui n'hiberne pas, ni migre, de savoir quelles sont les adaptations mises en oeuvre pour passer l'hiver et quelles en sont les conséquences sur son métabolisme, en mesurant sa masse corporelle, ses testicules, sa consommation de nourriture, son métabolisme respiratoire et en analysant son tissu adipeux brun, en fonction des conditions environnementales.

Mots-clés: *Phodopus sungorus*, « hiver », « été », calorimétrie, adaptations physiologiques

II. Matériel et méthodes

1. Espèce étudiée

Dans cette étude, nous avons travaillé avec des individus de l'espèce *Phodopus sungorus*, appelé hamster sibérien. Elle est originaire des déserts de sable et steppes semi-désertiques de Sibérie et du Kazakhstan. Cette espèce est caractérisée par ses modifications morphologiques (mue du pelage...) et physiologiques (décroissance gonadique en hiver) au cours des saisons. Ainsi, lorsqu'il y a une baisse de luminosité à l'approche de l'hiver, le pelage de ces hamsters devient de plus en plus blanc et seule une ligne gris pâle reste parfois sur le dos. De plus, c'est une espèce principalement nocturne, donc active la nuit et dormant le jour, faisant même parfois des torpeurs journalières en conditions extrêmes de température et luminosité.

2. Animaux étudiés et enregistrement de leur température corporelle

Nous avons donc utilisé 8 hamsters mâles différents, divisés en deux groupes : « conditions hiver » et « conditions été » (SP1->4 et LP1->4). Ils ont été opérés, sous anesthésie générale gazeuse à l'isoflurane et locale à la lidocaïne, le jeudi 18 octobre 2007 afin de leur implanter à chacun un ibutton® (**Fig.1**) (capteur de température) dans la cavité abdominale. Chaque appareil était enrobé dans de la paraffine pour éviter les altérations dues au liquide physiologique de l'animal. Les paramètres de programmation étaient un enregistrement toutes les 30 min, à partir du 18-10-07 à 23h00, avec une résolution de 0,0625°C. En plus des ibutton® placés dans les animaux, chaque groupe était accompagné constamment d'un capteur qui enregistrerait la température du milieu ambiant.



www.schnup.de

Fig.1: Ibutton®

3. Protocole expérimental de la calorimétrie indirecte

Après avoir passé 1 semaine en conditions constantes pour récupérer de l'intervention chirurgicale (Tambiente = 20°C et humidité normale), les animaux ont été transférés dans leurs conditions d'étude respectives: 21°C et LD 16:8 pour les animaux « été » (LP) et 6°C et LD 8:16 pour les animaux « hiver » (SP). Enfin, le 8-11-07 pour le groupe « hiver » et le 15-11-07 pour le groupe « été », les hamsters ont été placés dans la chaîne calorimétrique.

La chaîne est installée dans une pièce où les conditions sont contrôlées et constantes. Les température et lumière sont définies comme plus haut, et l'air ne contient que N₂ et O₂. Chaque animal est placé dans une cage individuelle, avec de l'eau et nourriture en quantité contrôlée et connue, reliée chacune à la chaîne calorimétrique (**Fig.2**).

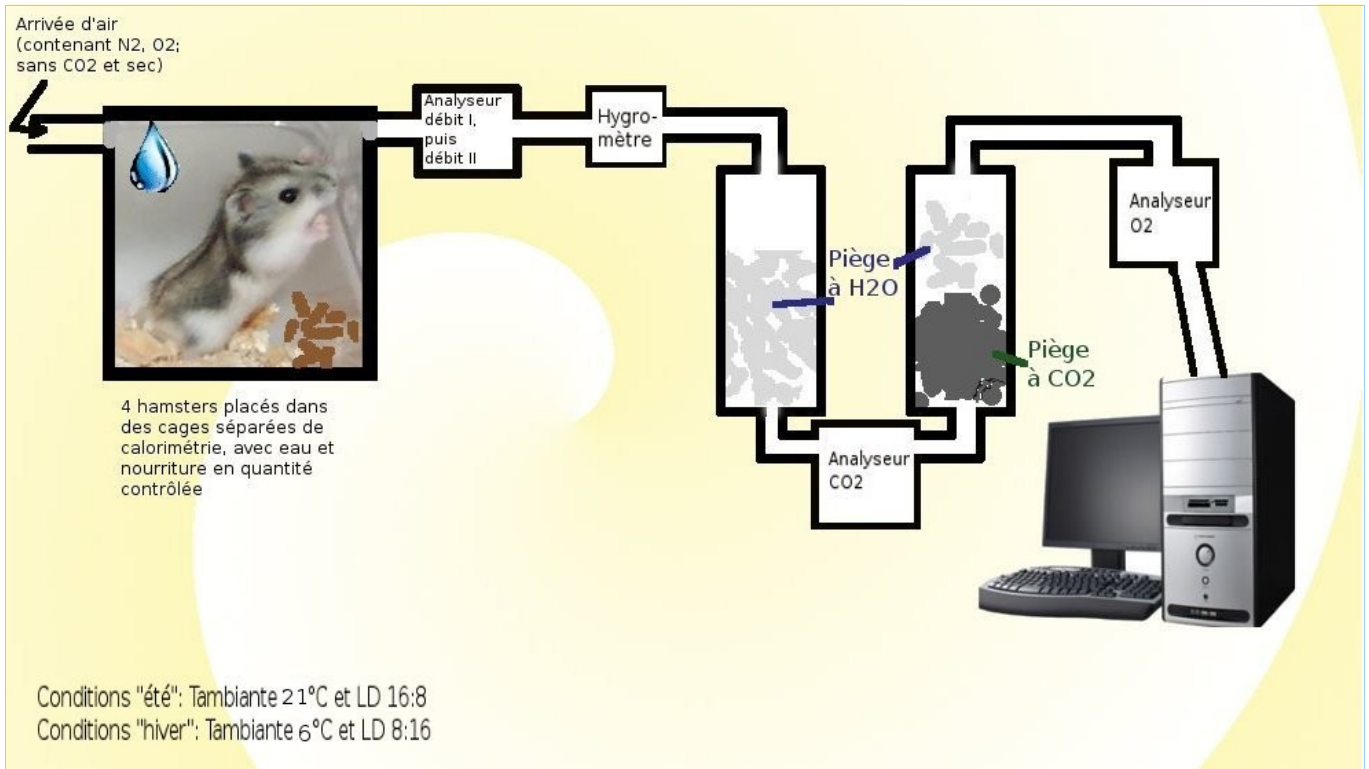


Fig.2: Montage de la chaîne calorimétrique

Une fois arrivées à l'ordinateur, les données sont analysées et retranscrites à l'aide d'un logiciel spécifique qui donne l'évolution constante dans chaque cage et dans la pièce de VO₂, VCO₂, taux d'humidité, température, Pression atmosphérique, débit d'air analysé.

4. Analyses biochimiques

Après une semaine d'acquisition dans la chaîne calorimétrique, les animaux sont sacrifiés (le 15-11-07 pour les « hiver » et le 22-11-07 pour les « été »). Il a alors été prélevé le tissu adipeux brun et les testicules de chaque animal et les ibutton® ont été récupérés.

Le tissu adipeux brun permet une régulation chimique, métabolique de la thermogenèse. L'activité des protéines découplantes UCP1 qui se trouvent dans la chaîne respiratoire des mitochondries des cellules du tissu permet de générer de la chaleur, sans contraction des muscles (**Fig.3**).

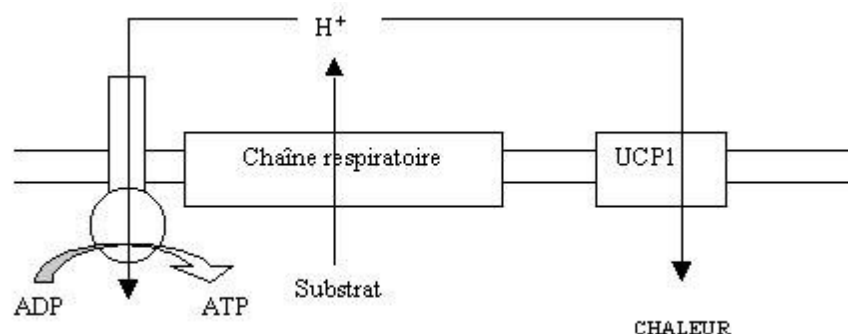


Fig.3: Production de chaleur par UCP1

L'objectif est de mesurer le niveau d'expression génique de la protéine découplante UCP1, reflet direct de son activité découplante et donc de la consommation du tissu adipeux brun.

Pour cela, le tissu adipeux brun, situé entre les deux omoplates, de chaque animal a été prélevé, pesé et congelé dans de l'azote liquide (-196°C). Le but de cette étape était d'avoir au final l'expression génique le la protéine. Donc, pour cela, les échantillons ont subi chacun et séparément plusieurs phases:

- extraction des ARN par broyage des tissus dans une solution contenant du trizol puis centrifugations répétées
- dosage des ARN par spectrophotométrie
- transcription inverse, afin d'obtenir les ADNc correspondants aux ARNm extraits précédemment
- PCR pour amplifier les ADN obtenus et avoir plus d'échantillon analysable
- électrophorèse afin d'obtenir l'ADN amplifié et quantifier l'expression génique de UCP1: les bandes présentes pour les pistes correspondants aux ADN amplifiés signifient que toutes les étapes d'extraction et transformation ont fonctionnées, et la taille de ces bandes reflète directement le niveau d'expression du gène étudié.

5. Analyses statistiques

Le but étant de déterminer l'effet des conditions environnementales sur chaque facteur étudié, plusieurs calculs ont été utilisés, via les logiciels de statistiques Minitab 15 et R, tels que l'analyse de la variance, les test de Fisher, de Wilcoxon, de Student, comparaisons multiples de Tukey, test de Kruskal-Wallis...

III. Résultats

1. Données corporelles

Avant tous résultats, il est nécessaire de préciser que 2 animaux du groupe « hiver » n'ont pas survécu après avoir été opérés pour l'insertion du ibutton®, ce faisant qu'il ne restait plus que 2 individus dans ce groupe: SP2 et SP4. De même, la détermination de la consommation de la nourriture est indéterminée pour deux individus (SP2 et LP3) car le biberon d'eau avait fuit, donc la nourriture était très imprégnée d'eau.

Individus	Masse avant chirurgie (g)	Masse avant passage dans chaîne (g)	Masse après mesures calorimétriques (g)	Masse testicules (mg)	Masse tissu adipeux brun (mg)	Consommation de nourriture (g)
SP2	33,5	31,67	32,37	45,4	15,2	Ind
SP4	48,5	31,73	28,33	31	9,6	36,9
LP1	45,5	43,51	43,81	693	242	31,3
LP2	45,6	39,11	38,71	591,7	161,4	31
LP3	41,7	41,97	42,77	757,3	178,8	Ind
LP4	47	42,92	42,72	634,7	168,6	28,5

Fig.4: Données corporelles

rq: masse SP1= 37,3g et SP3= 46,9g avant chirurgie

Tout d'abord, pour vérifier qu'il n'y ait pas de biais dans les résultats suivants, on a vérifié s'il n'existait pas de différences dans le poids des animaux avant le début de l'expérience, à l'aide d'un test de Wilcoxon (test non paramétrique utilisé car il n'y a pas normalité des résidus ($p < 0,05$), et seulement égalité des variances ($p > 0,05$) et données indépendantes). Ainsi, le test de Wilcoxon, sur les groupes « hiver » et « été », au seuil $\alpha = 5\%$, nous indique que les masses corporelles des animaux des deux groupes sont significativement similaires ($p\text{-value} = 0,007$) avant le début des manipulations. Donc toute différence survenant par la suite sera bien due à des adaptations suite au passage dans les conditions expérimentales spécifiques à chaque groupe.

Le hamster sibérien est connu pour adapter plusieurs de ses fonctions physiologiques aux modifications environnementales de son milieu de vie, telles que la température ou la luminosité. Nous avons donc vérifié, à l'aide d'un test de Student (test paramétrique utilisé car les données sont indépendantes, il y a normalité des résidus ($p > 0,05$) et égalité des variances ($p > 0,05$) pour chaque paramètre testé), s'il y a un effet des conditions extérieures sur la masse des individus, leur consommation de nourriture, la masse de leurs testicules et de leur tissu adipeux brun.

La première chose que l'on observe, sans avoir besoin de le tester statistiquement, c'est la différence au niveau de la couleur du pelage. En effet, chez les animaux placés dans les conditions « hiver », on peut voir très nettement un changement de la couleur du pelage, qui est devenu blanc, en gardant toujours une bande sombre au milieu du dos, par rapport à l'autre groupe qui a gardé un pelage sombre (**Fig.5**).



Fig.5: Modification de la couleur du pelage

Deuxièmement, concernant les masses corporelles, le test de Student, sur les groupes « hiver » et « été » au seuil $\alpha = 5\%$, nous indique qu'il y a bien une différence significative entre les groupes pour les masses avant passage dans la chaîne calorimétrique (p -value= 0,000) et après les mesures calorimétriques (p -value= 0,000). De plus, les comparaisons multiples nous indiquent que les masses des animaux LP sont supérieures aux masses des animaux SP (p -value= 0,0051 et 0,0023) (**Fig.6**). Donc les animaux en conditions « été » ont une masse corporelle plus importante que les animaux « hiver ».

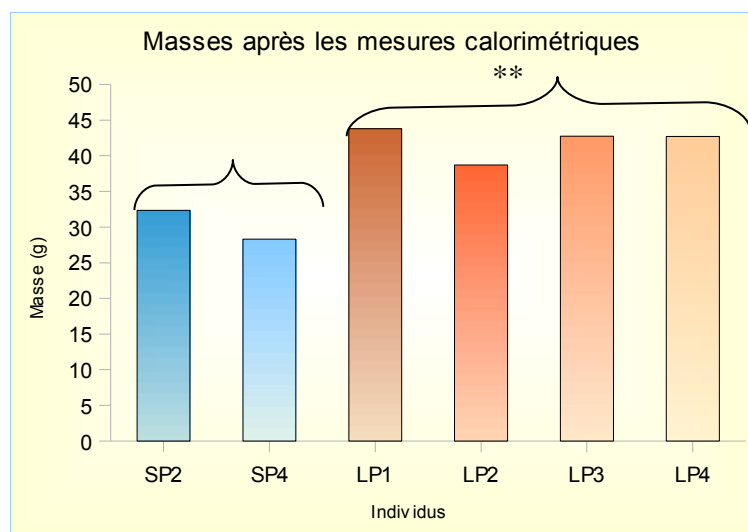


Fig.6: Masses des individus après une semaine en chambre calorimétrique

Puis pour les masses des testicules et du tissu adipeux brun, le test de Student, sur les groupes SP et LP au seuil $\alpha = 5\%$, nous indique également une différence significative pour les masses de ces deux tissus en fonction des groupes (p -value= 0,019 pour les testicules et p -value= 0,021 pour le tissu adipeux brun). De même, le test de Tukey nous indique que ce sont les masses des animaux « été » qui sont les plus importantes (p -value= 0,0003 pour les testicules et p -value= 0,0032 pour le tissu brun) (**Fig.7**). Donc les animaux « hiver » ont des testicules plus petites et une masse de tissu adipeux brun plus faible que les animaux « été ».

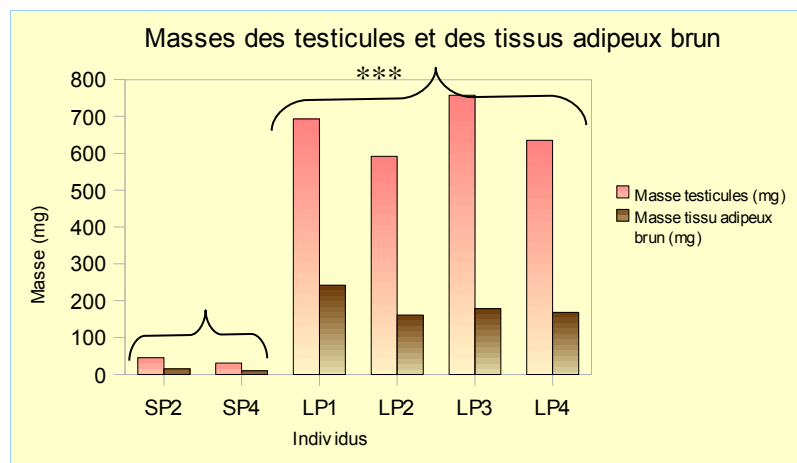


Fig.7: Masses des testicules et du tissu adipeux brun en fin d'expérience

Enfin, en ce qui concerne la consommation de nourriture, l'Anova, sur les groupes « été » et « hiver » au seuil $\alpha = 5\%$, ne nous indique pas de différence significative ($p\text{-value} = 0,065$) entre les groupes d'animaux en fonction des conditions environnementales.

2. Températures corporelles

Concernant les températures corporelles des individus, mesurées grâce aux ibutton®, il a été nécessaire de diviser les heures d'enregistrement en jour et nuit. On considérait donc la condition « jour » de 9h à 17h pour le groupe « hiver » et de 4h à 20h pour le groupe « été ». En fonction de ces données, des moyennes de température corporelle ont été faites pour chaque « jour » et « nuit » durant la semaine d'enregistrement calorimétrique pour les 6 individus testés, ce pour étudier l'effet des conditions environnementales (photopériode-température et heure de la journée) sur la température corporelle des animaux.

Ainsi, le test de Wicoxon (test non paramétrique utilisé car il n'y a pas normalité des résidus ($p < 0,05$), et seulement égalité des variances ($p > 0,05$) et données indépendantes) nous indique qu'au seuil $\alpha = 5\%$, il existe une différence significative pour les températures corporelles entre les groupes « hiver » et « été » ($p\text{-value} = 0,000002$), et qu'au sein de ces mêmes groupes, il existe une différence significative en fonction du « jour » ou de la « nuit » ($p\text{-value} = 0,0007247$ pour les groupes « été » et « hiver ») (**Fig.8**). Et les comparaisons multiples de Tukey nous indiquent en plus que c'est bien pour le groupe « été » que la température corporelle est la plus haute ($p\text{-value} = 0,0077$) et que la température corporelle des animaux est plus élevée la nuit ($p\text{-value} = 0,000$).

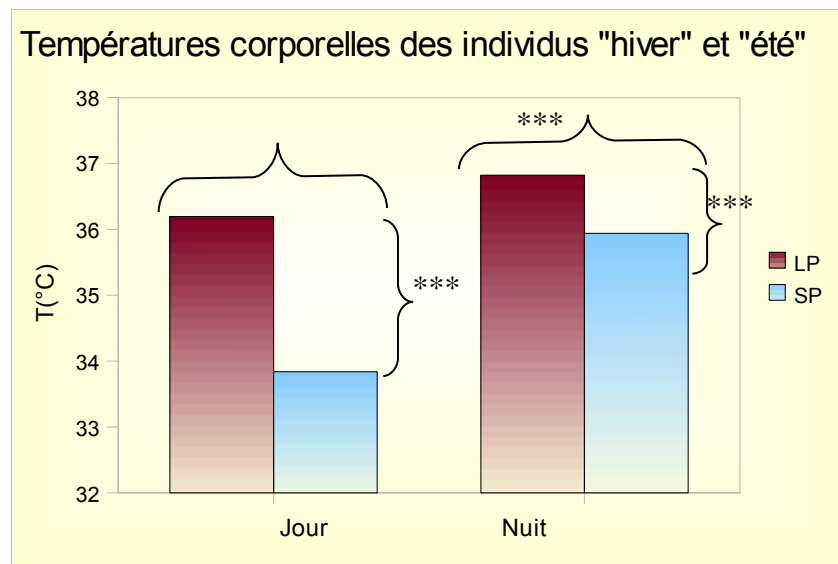


Fig.8 : Températures corporelles moyennes pendant la semaine de calorimétrie en fonction de l'heure du jour et des conditions photopériode-température

3. Données calorimétriques

Les données calorimétriques ont été traitées de la même façon que les températures corporelles, pour tester également l'effet des conditions environnementales (jour-nuit, été-hiver) sur les consommations de O₂ et production de CO₂ des animaux.

Ainsi, l'analyse de la variance (test paramétrique utilisé car les données sont indépendantes, il y a normalité des résidus ($p > 0,05$) et égalité des variances ($p > 0,05$) pour chaque paramètre testé) nous indique, au seuil $\alpha = 5\%$, qu'il y a un effet significatif des conditions « jour » et « nuit » sur la consommation de O₂ (**Fig. 9**) chez tous les individus testés ($p\text{-value} = 0,026$), et, de ce fait, sur la production de CO₂ ($p\text{-value} = 0,014$). Toutefois, l'Anova ne nous indique pas de différence significative pour VO₂, ni VCO₂, entre les groupes « été » et « hiver » ($p\text{-value} = 0,631$ et $0,220$). Enfin, les comparaisons multiples nous indiquent bien que c'est la nuit que la consommation de O₂ est significativement la plus élevée ($p\text{-value} = 0,0162$).

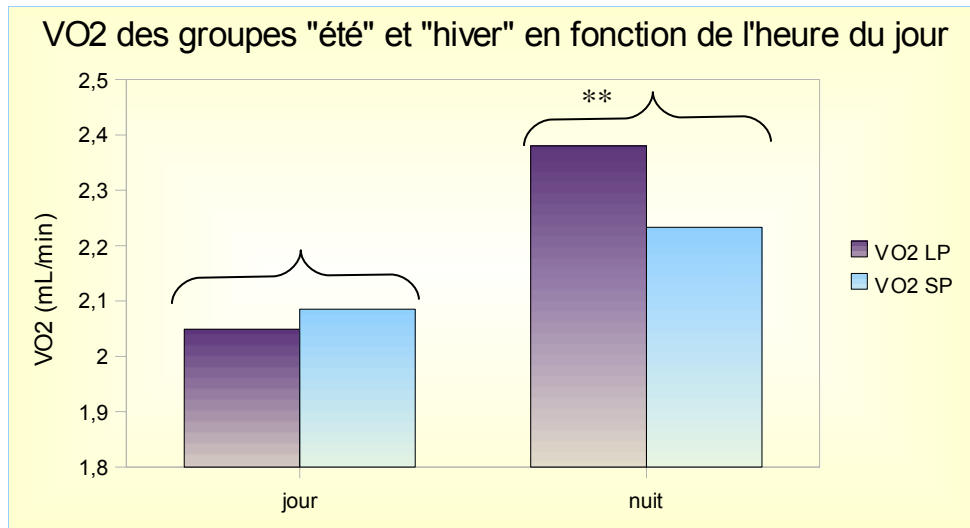


Fig.9: VO2 moyennes en fonction des conditions photopériode-température et de l'heure du jour

Puis, afin de tester l'effet des conditions environnementales sur l'intensité métabolique des individus, les données de consommation de O₂ ont été divisées par le poids allométrique des animaux. Ainsi, le test de Kruskal-Wallis (test non paramétrique), au seuil $\alpha = 5\%$, nous indique qu'il y a un effet significatif des conditions photopériode-température (p-value= 0,002) et heure du jour (p-value= 0,034) sur l'intensité métabolique moyenne des animaux (**Fig.10**). De plus, le test de Tukey nous renseigne sur la différence au niveau de l'effet de chaque facteur, et on observe que c'est pour le groupe « hiver » que l'intensité métabolique est la plus importante (p-value= 0,0003) et qu'au sein de chaque groupe, c'est la nuit qu'elle est la plus importante (p-value= 0,0272).

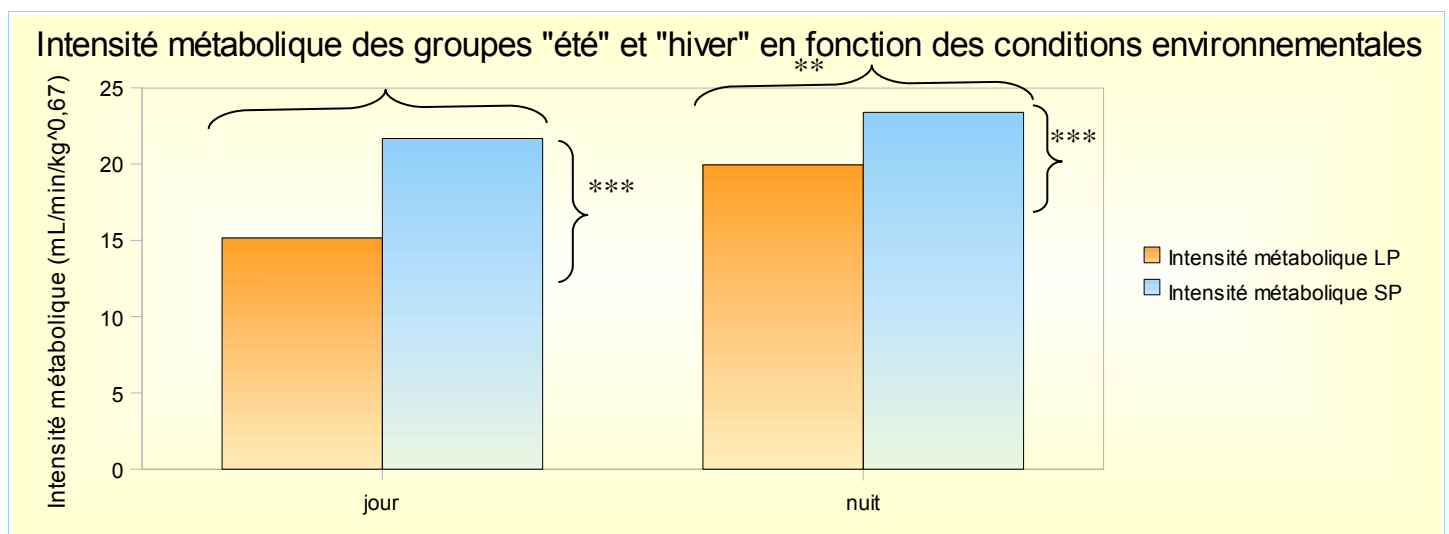


Fig.10: Intensités métaboliques moyennes en fonction des conditions photopériode-température et de l'heure du jour

De même, pour tester l'effet des conditions environnementales sur la dépense énergétique totale des animaux, on a transformé les données de consommation de O₂ de mL/min en kJ/j (en sachant que 1L O₂ consommé correspond à une dépense de 20,1kJ). Ainsi, le test de Kruskal-Wallis (test non paramétrique), au seuil $\alpha = 5\%$, nous indique qu'il n'y a pas d'effet significatif des conditions photopériode-température (p-value= 0,820) mais un effet significatif de l'heure du jour (p-value= 0,031) sur la dépense énergétique totale des animaux (**Fig.11**). De plus, le test de Tukey nous renseigne sur la différence au niveau de l'effet de chaque facteur, et on observe que c'est la nuit que la dépense énergétique est la plus importante (p-value= 0,0261).

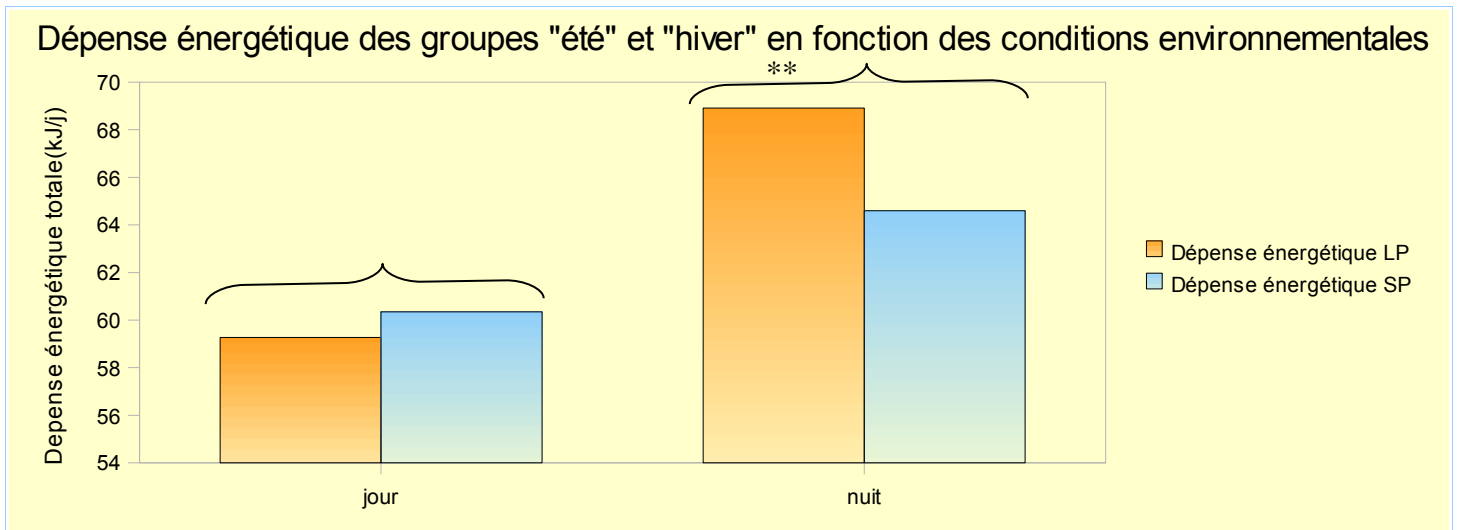


Fig.11: Dépenses énergétiques totales en fonction des conditions photopériode-température et de l'heure du jour

4. Analyse du tissu adipeux brun

Lors de l'analyse du tissu adipeux brun, nous avons rencontré quelques problèmes, jusqu'ici indéterminés, ce faisant qu'à la fin des étapes vu auparavant, aucune bande n'était visible sur le gel d'électrophorèse et rendant donc impossible la quantification de l'expression génique de UCP1.

Toutefois, on peut faire quelques prédictions sur les résultats attendus. En effet, les animaux placés dans les conditions « hiver » sont confrontés à des températures extérieures plus froides que les « été », et doivent donc produire plus de chaleur pour survivre à ces conditions extrêmes. Et cette production de chaleur se faisant via la protéine UCP1, on peut donc penser que l'expression génique de cette dernière est plus importante (bandes de taille plus importante) pour les « hiver » par rapport aux « été », corroborant au final la masse de tissu adipeux brun après l'expérience qui est nettement plus faible chez les « hiver », puisque ceux-ci ont consommé ce tissu pour produire de la chaleur.

IV. Discussion, Conclusion

Le hamster sibérien étant un animal qui n'hiberne pas, ni migre à l'arrivée de l'hiver, le but de ce TP était de déterminer les adaptations mises en œuvre pour survivre aux conditions extrêmes de l'hiver et leurs conséquences sur le métabolisme de l'animal.

On a alors pu observer, tout d'abord, que les animaux placés dans les conditions « hiver » subissaient une mue du pelage avec un passage du brun au blanc, ce pour permettre un meilleur camouflage dans l'environnement naturel enneigé des steppes de Sibérie. Puis, les tests statistiques ont montré que les animaux hivernaux ont une masse corporelle moyenne plus faible que les estivaux, de même pour la masse de leurs testicules -décruescence gonadique car énergie allouée surtout pour la survie aux conditions extrêmes et non pour la reproduction- et de leur tissu adipeux brun (production de chaleur via UCP1, donc tissu métabolisé pour produire de la chaleur).

Concernant les températures corporelles, on a pu constater qu'elles sont plus faibles pour les animaux « hiver » et qu'en plus, elles sont plus faibles le jour. En effet, le hamster sibérien étant un animal nocturne, il est actif la nuit, donc a une température corporelle plus élevée que le jour. De plus, en hiver, il a été montré qu'il effectue des torpeurs, durant lesquelles il est en hypothermie afin d'économiser de l'énergie, d'où la température corporelle plus faible le jour.

En parallèle à ces températures, les tests nous ont indiqué que la consommation de O₂, la production de CO₂, l'intensité métabolique et la dépense énergétique totale sont plus importantes la nuit que le jour, et que l'intensité métabolique est plus importante pour les animaux « hiver ».

Toutefois, malgré des tests non significatifs, on a pu observer certaines tendances dans les données, telles qu'une consommation de nourriture plus importante et une dépense énergétique totale plus faible pour les animaux « hiver ». Ces non-significativités sont dues au peu d'individus testés (n=6 et n'=4 pour la nourriture).

et aux variations inter-individuelles importantes (notamment entre SP2 et SP4). En effet, on observe par exemple une différence significative au niveau de la dépense énergétique totale entre SP2 et SP4 (Student, p-value= 0,000), biaisant ainsi toute comparaison de nombreuses valeurs entre les groupes « hiver » et « été ».

Enfin, on pourrait se demander l'utilité de toutes ces adaptations (morphologiques et physiologiques) pour les animaux soumis aux conditions extrêmes de l'hiver. On a donc comparé les dépenses énergétiques moyennes entre les groupes « été » et « hiver » et entre les groupes « jour » et « nuit ».

	LP	SP		Economie de
Jour	59,2667 kJ/j	60,3443 kJ/j	59,8055 kJ/j	10,24% d'énergie la nuit par rapport au jour.
Nuit	68,9105 kJ/j	64,5962 kJ/j	66,75335 kJ/j	
	64,0886 kJ/j	62,47025 kJ/j		
Economie de 2,52% d'énergie pour les "hiver" par rapport aux "été".				

Dépense énergétique totale et Economie d'énergie

Ainsi, les hypothermies ou torpeurs journalières permettent aux animaux d'économiser plus de 10% d'énergie par rapport à l'état actif, et par toutes les adaptations -baisse de la masse corporelle, baisse de la température corporelle, décroissance gonadique, augmentation de la production de chaleur par le tissu adipeux brun, augmentation de l'intensité métabolique- mises en oeuvre par les animaux en conditions hivernales, presque 3% d'énergie sont économisés (résultats obtenus avec nos 6 hamsters testés: valeur beaucoup plus importante normalement (>20%)).