

Par

Sophie BOURGEON

**IMMUNOCOMPÉTENCE CHEZ LES OISEAUX LONGÉVIFS :
ÉTUDE DU COÛT DE LA REPRODUCTION LORS DU JEÛNE D'INCUBATION
CHEZ L'EIDER À DUVET (*SOMATERIA MOLLISSIMA*)**



Soutenue publiquement le 08 Juin 2006 devant la commission d'examen :

Yvon LE MAHO

Directeur de recherche, CNRS, Strasbourg

Thierry RACLOT

Chargé de recherche, CNRS, Strasbourg

Jean-Louis GENDRAULT

Professeur, Université Louis Pasteur, Strasbourg

Gabriele SORCI

Directeur de recherche, CNRS, Dijon

Juan MORENO

PhD, Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid

Geir Wing GABRIELSEN

PhD, Norwegian Polar Institute, Tromsø

Directeur de thèse

Co-encadrant de thèse

Rapporteur interne

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Examineur

*À mon grand-père Louis Bourgeon,
à mon ami Jean-Yves Mansuy*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Gabrielsen, M. Gendrault, M. Moreno et M. Sorci d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mes remerciements s'adressent ensuite à messieurs Yvon Le Maho et Thierry Raclot pour m'avoir sympathiquement accueillie au sein de leur équipe et pour avoir conjointement encadré ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier François Criscuolo et Sylvie Massemin pour leur gentillesse, leur disponibilité, leur patience et leur aide indispensables au cours de ces années.

Un grand merci à Fabrice Bertile et Caroline Gilbert pour leur amitié très précieuse, leur soutien et leur aide infaillible, notamment durant la rédaction de ce mémoire.

Merci à Sandrine Zafin d'avoir partagé le bureau avec moi dans la joie et la bonne humeur. Merci aussi à Luc Guillaume qui m'a aidée au cours d'une campagne de terrain qui fut mémorable.

Merci à Jean-Yves Georges, Stéphane Blanc, David Grémillet et Hélène Gachot de m'avoir conseillée, aidée sans jamais hésiter à prendre sur leur temps.

Merci à René Groscolas, Jean-Patrice Robin et Javier Martínez pour leur collaboration qui fut très agréable. Merci à Christine Legrand-Frossi, Juan Moreno et Elena Arriero pour leurs conseils avisés en matière d'immunologie.

Merci à l'institut polaire Paul-Emile Victor (IPEV) pour son soutien logistique lors des campagnes de terrain. Merci à Geir Wing Gabrielsen et Wojtek Moskał pour leur aide précieuse.

Merci à tous les chercheurs du DEPE pour leur bonne humeur et les pauses café partagées. Une mention spéciale sera accordée à André Ancel pour l'ensemble de son œuvre.

Merci aux étudiantes et étudiants du DEPE pour leur amitié. J'adresse un clin d'œil tout particulier à mes amis Céline Le Bohec et Sébastien Durand.

Merci à l'ensemble du personnel du DEPE et tout particulièrement à Martine et Jacqueline pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Merci à tous mes amis qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de cette thèse. Je remercie tout particulièrement Sabrina G., Estelle T., Cécile D., Vivien C. et Jérôme G.

Merci à Manuel pour son amour, sa patience, son soutien et ses encouragements.

Merci à l'ensemble de ma famille pour son soutien indispensable. Je tiens plus particulièrement à remercier ma grande sœur Céline, mon beau-frère Jérôme, mes nièces Mathilde et Constance.

Enfin, j'adresse à mes parents toute ma reconnaissance. Rien n'aurait été possible sans leur aide et leurs encouragements, ce travail leur est dédié.

IMMUNOCOMPÉTENCE CHEZ LES OISEAUX LONGÉVIFS : ÉTUDE DU COÛT DE LA REPRODUCTION LORS DU JEÛNE D'INCUBATION CHEZ L'EIDER À DUVET (*SOMATERIA MOLLISSIMA*)

Ce travail est basé sur les articles suivants, indexés à la fin de ce manuscrit :

I. Bourgeon, S., Criscuolo, F., Le Maho, Y., Raclot, T. Phytohemagglutinin response and immunoglobulin index decrease during incubation fasting in female Common Eiders. *Physiological and Biochemical Zoology*, sous presse.

II. Bourgeon, S., Raclot, T., Le Maho, Y., Ricquier, D., Criscuolo, F. Innate immunity, assessed by plasma NO measurements, is not suppressed during the incubation fast in eiders. Soumis.

III. Bourgeon, S., Martínez, J., Criscuolo, F., Le Maho, Y., Raclot, T. Fasting-induced changes of immunological and stress indicators in breeding female eiders. *General and Comparative Endocrinology*, 147 (3) : 336-342.

IV. Bourgeon, S., Raclot, T. Triiodothyronine suppresses humoral immunity but not T-cell-mediated immune response in incubating female eiders (*Somateria mollissima*). Soumis.

V. Bourgeon, S., Raclot, T. Corticosterone selectively modifies components of the acquired immunity in female eiders during incubation. Soumis.

VI. Bourgeon, S., Viera, V.M., Raclot, T., Groscolas, R. Hormones and humoral immunity in king penguins during moulting and breeding fasts. Soumis.

Article non présenté dans la thèse :

VII. Bourgeon, S., Criscuolo, F., Bertile, F., Raclot, T., Gabrielsen, G.W., Massemin, S. 2006. Effects of clutch sizes and incubation stage on nest desertion in the female Common Eider *Somateria mollissima* nesting in the high Arctic. *Polar Biology*, 29: 358-363.

Communications affichées dans le cadre de la thèse :

I. Bourgeon, S., Criscuolo, F., Moreno, J., Le Maho, Y., Raclot, T. Immunocompetence of female common eiders in relation to clutch size and the unfolding of incubation. Second European Conference on Behavioural Biology (ECBB), Gröningen, The Netherlands (2004).

II. Bourgeon, S., Criscuolo, F., Le Maho, Y., Raclot, T. Immunocompetence of female common eiders incubating in the High Arctic in relation to clutch size. 5th Conference of the European Ornithologists' Union (EOU), Strasbourg, France (2005). Paru dans *Alauda* (2005), 73(3), 286.

III. Bourgeon, S., Criscuolo, F., Le Maho, Y., Raclot, T. Immunocompetence of female Common Eiders incubating in the high Arctic in relation to clutch size. Deuxièmes Rencontres «Ecologie et Comportement», Strasbourg, France (2006).

IV. Bourgeon, S., Kauffmann, M., Groscolas, R., Raclot, T., Robin, J-P. Effects of fasting/refeeding schedules on humoral immune function in female mallards. 24th International Ornithological Congress (IOC), Hamburg, Allemagne (2006).

Communication orale effectuée dans le cadre de la thèse :

I. Bourgeon, S. Immunocompetence of female Common Eiders during incubation in relation to clutch size. Premières Rencontres «Ecologie et Comportement», Chizé, France (2005).

SOMMAIRE

A- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	11
1- Coût de la reproduction	12
2- Emergence de l'immuno-écologie	13
3- Système immunitaire des oiseaux	13
3.1. L'immunité innée	14
3.1.1. Les cellules de la lignée myéloïde	14
3.1.2. Le système du complément	14
3.2. L'immunité acquise	15
3.2.1. L'immunité à médiation humorale	15
3.2.2. L'immunité à médiation cellulaire	15
3.3. Les messagers chimiques de l'immunité : les cytokines	16
3.4. Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)	16
3.5. Formule sanguine	17
4- Relations entre l'effort reproducteur et l'immunocompétence	17
4.1. Hypothèse d'une immunosuppression au cours de l'effort reproducteur	17
4.1.1. Effet d'une manipulation de l'effort reproducteur sur l'immunocompétence	18
4.1.2. Effet d'une manipulation de l'immunocompétence sur l'effort reproducteur	18
4.2. Immunosuppression: causes ultimes	19
4.2.1. Hypothèse d'évitement de pathologies auto-immunes	20
4.2.2. Hypothèse d'allocation optimale des ressources	21
4.3. Immunosuppression: causes proximales	22
4.3.1. Hypothèse métabolique du stress oxydatif	22
4.3.2. Rôle de la testostérone	23
4.3.3. Rôle de la corticostérone	24
4.3.4. Rôle des hormones thyroïdiennes	26
4.3.5. Autres hormones	26
5- Évaluation de l'immunocompétence	27
5.1. Outils méthodologiques	27
5.2. Limites des outils	28
5.3. Évaluation de l'immunité innée	29
5.4. Facteurs confondants	30
5.4.1. L'hypothèse d'augmentation de la prise alimentaire	30
5.4.2. Manipulation de l'effort parental	31
5.4.3. Effet de l'âge	31
5.4.4. Chevauchement mue/reproduction	31
5.4.5. Effets à long-terme	33
B- CONTEXTE DE L'ETUDE	35
1- Cycle de vie annuel de l'eider à duvet (<i>Somateria mollissima</i>)	36
1.1. Hivernage et retour sur les zones de nidification	36
1.2. La période de reproduction	37
1.3. Mue et migration hivernale	39

2- Cycle de vie annuel du manchot royal (<i>Aptenodytes patagonicus</i>)	39
3- Adaptations physiologiques au jeûne	40
3.1. Mobilisation des réserves énergétiques	41
3.1.1. Phase I du jeûne	41
3.1.2. Phase II du jeûne	41
3.1.3. Phase III du jeûne	42
3.2. Modifications hormonales	42
4- Jeûne spontané	43
4.1. Jeûne de reproduction	43
4.2. Jeûne de mue	44
5- Problématique et questions posées	44
C- MATÉRIEL & MÉTHODES	47
1- Sites d'étude	48
2- Collecte des données sur les femelles d'eider à duvet	48
2.1. Suivi des femelles sauvages	48
2.2. Manipulation des femelles sauvages	49
2.3. Capture de femelles sauvages et conditions de captivité	49
3- Protocoles expérimentaux	50
3.1. Test PHA	50
3.2. Injection de LPS	50
3.3. Implants hormonaux	51
4- Exploitation des échantillons au laboratoire	51
4.1. Evaluation de la condition corporelle	51
4.2. Dosage des immunoglobulines	52
4.3. Dosages hormonaux (RIA)	52
4.4. Dosage de l'acide urique	52
4.5. Dosage des HSP	53
D- RÉSULTATS	54
1- Le jeûne d'incubation chez la femelle d'eider à duvet	55
1.1. L'immunité acquise	55
1.2. L'immunité innée	56
2- Immunosuppression: causes ultimes	57
2.1. Hypothèse d'évitement de pathologies auto-immunes	57
2.2. Hypothèse d'allocation optimale des ressources	58
3- Immunosuppression: causes proximales	59
3.1. Rôle de la testostérone chez le mâle de manchot royal	59

3.2. Rôle de la corticostérone	60
3.2.1. Manipulation de la corticostéronémie chez la femelle d'eider à duvet	60
3.2.2. Induction de la phase III chez le mâle de manchot royal	61
4- Jeûne de mue chez le manchot royal	62
E- DISCUSSION	63
1- Diminution de l'immunité acquise au cours du jeûne d'incubation chez la femelle d'eider à duvet	64
2- Maintien de l'immunité innée au cours du jeûne d'incubation chez la femelle d'eider à duvet	65
3- Causes ultimes de l'immunosuppression au cours du jeûne d'incubation chez la femelle d'eider à duvet	67
3.1. Hypothèse d'évitement de pathologies auto-immunes	67
3.2. Hypothèse d'allocation optimale des ressources	69
4- Causes proximales de l'immunosuppression au cours du jeûne d'incubation	70
4.1. Rôle immunosuppresseur de la testostérone chez le mâle de manchot royal	71
4.2. Evaluation du rôle de la corticostérone sur l'immunocompétence de la femelle d'eider à duvet	71
4.3. Manipulations de la corticostéronémie et effets sur l'immunocompétence	73
4.3.1. Implants de corticostérone chez la femelle d'eider à duvet	73
4.3.2. Induction de la phase III du jeûne chez le mâle de manchot royal	74
5- Augmentation de l'immunocompétence cours du jeûne de mue chez le manchot royal	75
6- CONCLUSION	76
7- PERSPECTIVES	77
F- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	80
G- ARTICLES	95
Article I : Phytohemagglutinin response and immunoglobulin index decrease during incubation fasting in female Common Eiders	96
Article II : Innate immunity, assessed by plasma NO measurements, is not suppressed during the incubation fast in eiders	105
Article III : Fasting-induced changes of immunological and stress indicators in breeding female eiders	136
Article IV : Triiodothyronine suppresses humoral immunity but not T-cell-mediated immune response in incubating female eiders (<i>Somateria mollissima</i>)	145
Article V : Corticosterone selectively modifies components of the acquired immunity in female eiders during incubation	172
Article VI : Hormones and humoral immunity in king penguins during moulting and breeding fasts	205
Annexe- Article VII : Effects of clutch sizes and incubation stage on nest desertion in the female Common Eider <i>Somateria mollissima</i> nesting in the high Arctic	236

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Processus physiologiques et écologiques en compétition pour les mêmes ressources.	12
Figure 2. Interrelations entre l'effort reproducteur, l'immunocompétence, la charge parasitaire et le taux de survie.	13
Figure 3. Organes immunitaires des oiseaux : exemple chez le poulet.	14
Figure 4. Cycle annuel de l'Eider à duvet (<i>Somateria mollissima</i>) nichant au Spitsberg.	36
Figure 5. Cycle reproducteur du manchot royal (<i>Aptenodytes patagonicus</i>) se reproduisant dans l'Archipel des Crozet.	39
Figure 6. Masse corporelle, perte de masse journalière et vitesse d'amaigrissement spécifique au cours des phases I, II et III du jeûne prolongé spontané chez le poussin de manchot royal.	41
Figure 7. Compromis entre l'effort reproducteur (jeûne d'incubation) et les trois composantes (composantes cellulaire et humorale de l'immunité acquise et composante innée) du système immunitaire chez les femelles d'eider à duvet (<i>Somateria mollissima</i>).	45
Figure 8. Effets respectifs des jeûnes de reproduction et de mue sur l'immunocompétence de mâles de manchot royal (<i>Aptenodytes patagonicus</i>).	46
Figure 9. Situation géographique du site d'étude.	48
Figure 10. Protocoles expérimentaux et dosages plasmatiques réalisés chez des femelles d'eider à duvet au cours de leur jeûne d'incubation.	50
Figure 11. Protocoles expérimentaux et dosages plasmatiques réalisés chez des mâles de manchot royal au cours de leurs jeûnes de mue et de reproduction et au cours d'un jeûne expérimental en captivité.	51
Figure 12. Concentration d'immunoglobulines plasmatiques : courbe d'étalonnage en ELISA.	52
Figure 13. Gonflement alaire en réponse au test PHA 1) au cours de l'incubation et 2) en fonction de la taille de couvée initiale de femelles d'eider à duvet sauvages.	55
Figure 14. Taux plasmatique d'immunoglobulines 1) au cours de l'incubation et 2) en fonction de la taille de couvée initiale de femelles d'eider à duvet sauvages.	55
Figure 15. Relation entre le gonflement alaire et le taux plasmatique d'immunoglobulines en fonction de la taille de couvée initiale de femelles d'eider à duvet sauvages.	55
Figure 16. Relation entre les taux plasmatiques d'oxyde nitrique avant l'injection de lipopolysaccharides et la réponse immunitaire innée chez des femelles d'eider à duvet au cours de leur jeûne d'incubation, selon leur condition corporelle : bonne ou mauvaise.	56

- Figure 17.** Relation entre l'indice de condition corporelle et les taux plasmatiques d'oxyde nitrique après l'injection de lipopolysaccharides chez des femelles d'eider à duvet au cours de leur jeûne d'incubation, selon leur condition corporelle : bonne ou mauvaise. _____ **56**
- Figure 18.** Relation entre l'expression (western blot) de HSP60 et de HSP70 chez des femelles d'eider à duvet au cours de leur jeûne d'incubation. _____ **57**
- Figure 19.** Relation entre l'expression (western blot) de HSP60 et le taux plasmatique d'immunoglobulines chez des femelles d'eider à duvet au cours de leur jeûne d'incubation. _____ **57**
- Figure 20.** Effets de l'administration de triiodothyronine sur les taux plasmatiques d'immunoglobulines chez des femelles d'eider à duvet sauvages au cours de leur jeûne d'incubation. _____ **58**
- Figure 21.** Relation entre les taux plasmatiques de testostérone et d'immunoglobulines chez des mâles de manchot royal au cours de leur jeûne de reproduction. _____ **59**
- Figure 22.** Effets de l'administration de corticostérone sur le gonflement alaire chez des femelles d'eider à duvet captives. _____ **60**
- Figure 23.** Effets de l'administration de corticostérone sur les taux plasmatiques d'immunoglobulines chez des femelles d'eider à duvet captives. _____ **61**
- Figure 24.** Relation entre les taux plasmatiques de triiodothyronine et d'immunoglobulines chez des manchots royaux en pré-mue et en mue. _____ **62**
- Figure 25.** Effets respectifs des jeûnes de reproduction et de mue sur l'immunocompétence de mâles de manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) : résultats obtenus. _____ **75**
- Figure 26.** Compromis entre l'effort reproducteur (jeûne d'incubation) et les trois composantes (composantes cellulaire et humorale de l'immunité acquise et composante innée) du système immunitaire chez les femelles d'eider à duvet (*Somateria mollissima*) : résultats obtenus. _____ **76**

A- Revue bibliographique



© Sophie Bourgeon

A- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La nature abrite une grande biodiversité, chaque organisme étant caractérisé par une durée de vie et un taux de reproduction limités. C'est l'observation d'une telle évidence qui a amené les scientifiques à se demander pourquoi aucune forme de vie ne pouvait s'apparenter au mythique démon de Darwin. Ce super être immortel, capable de se reproduire sans fin et de transmettre indéfiniment ses gènes aux générations futures représente une perfection de l'évolution. Cependant, pour rester en vie et se reproduire, les être vivants doivent remplir une myriade de fonctions au moyen de divers processus physiologiques qui partagent une quantité de ressources limitées. Nous allons exposer ici certaines des contraintes écologiques et physiologiques auxquelles sont confrontés les organismes et qui les empêchent de devenir immortels et super féconds.

1- Coût de la reproduction

La théorie des traits d'histoire de vie postule que la sélection naturelle favorise les organismes qui maximisent leur valeur sélective ou fitness (contribution à la génération suivante) (Stearns 1992). Ceci peut être atteint via des adaptations écologiques, anatomiques, comportementales ou encore physiologiques qui permettent aux organismes longévifs de faire face à des compromis entre l'énergie allouée à la survie, la croissance et la reproduction (Maynard Smith 1978). Chez les organismes adultes, pour lesquels la croissance est en général terminée pour l'essentiel, **le compromis** majeur s'opère **entre la reproduction et la survie** (figure 1). L'**effort reproducteur** est estimé par le temps et l'énergie utilisés par un animal pour se reproduire (Trivers 1972). Il distingue deux aspects : l'**investissement sexuel** (l'énergie consacrée à rechercher et conquérir un partenaire ou à se battre pour éloigner des rivaux) et l'**investissement parental** (coût de l'élevage des jeunes). L'investissement parental inclut tout ce qui concerne les soins aux jeunes (Siegel *et al.* 1999). Le **coût de la reproduction** est ainsi défini comme l'impact négatif de l'investissement parental en cours sur les chances de survie adulte et de succès reproducteur à venir (Williams 1966).



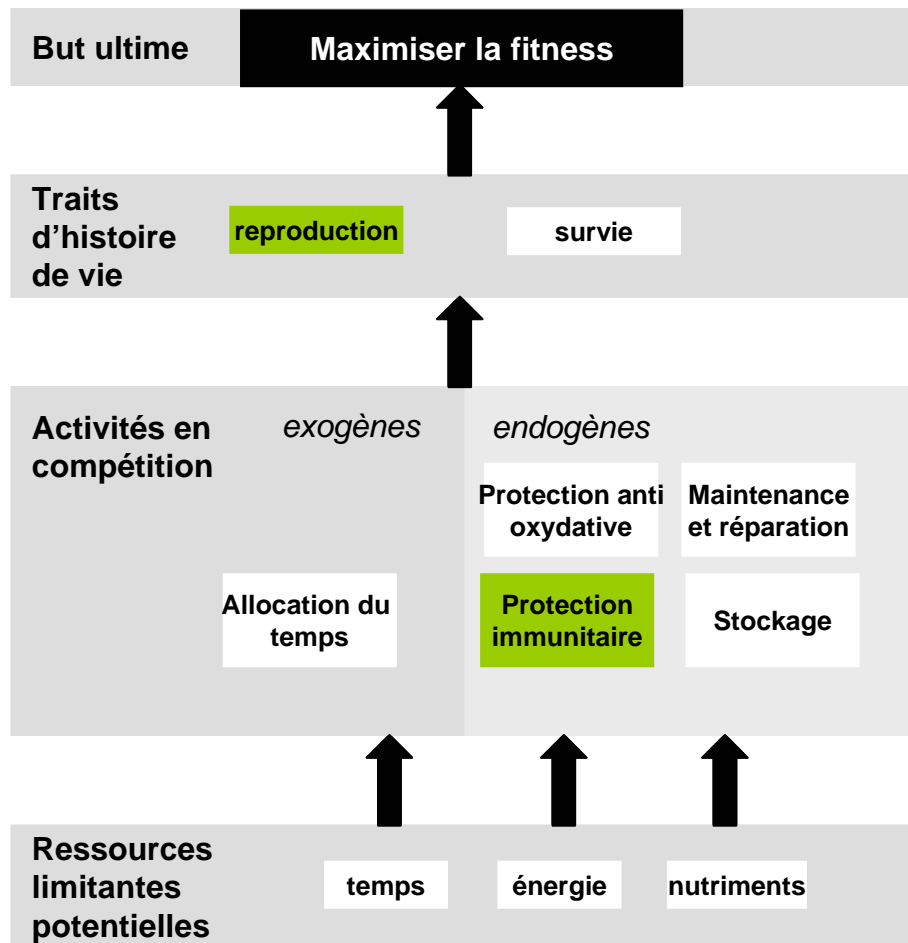


Figure 1. Processus physiologiques et écologiques en compétition pour les mêmes ressources. La limitation des ressources impose des compromis entre les différents processus et activités qui sont essentiels à la survie et la reproduction. Le stress oxydatif est causé par les radicaux libres (ROS) qui sont des sous-produits du métabolisme et qui sont aussi issus des processus de détoxification du système immunitaire. La maintenance et la réparation englobent la réparation ou la néo-formation de cellules endommagées, la régulation de la température corporelle, la production d'hormones et de neurotransmetteurs, Le stockage correspond à la capacité d'accumuler des réserves d'énergie pour une éventuelle mobilisation ultérieure. De façon ultime, les compromis seront effectués de façon à maximiser la fitness (valeur sélective). Notre travail s'est intéressé plus spécifiquement aux compromis effectués par les organismes entre la reproduction et le système immunitaire.

2- Emergence de l'immuno-écologie

En 1982, la publication d'un papier de Hamilton et Zuk a généré un intérêt considérable quant au rôle joué par les parasites dans l'évolution des stratégies reproductives de leurs hôtes. Le constat qu'une forte charge parasitaire pendant la reproduction est associée à une réponse immunitaire réduite (Nordling *et al.* 1998) ainsi qu'à une diminution du taux de survie adulte (Gustafsson *et al.* 1994 ; Ricklefs 2000) a conduit à l'hypothèse centrale que **le système immunitaire doit partager des ressources limitées avec d'autres fonctions physiologiques** (Norris et Evans 2000 ; Martin *et al.* 2001) (figure 2). Ce domaine d'investigation a abouti à l'émergence de l'immuno-écologie qui s'intéresse en partie à l'impact de la fonction immunitaire sur la valeur sélective des hôtes **en milieu naturel** (Sheldon et Verhulst 1996). Nous allons dans un premier temps nous attacher à décrire le système immunitaire des oiseaux avant de s'intéresser aux relations entre l'effort reproducteur et l'état de ce système immunitaire.

3- Système immunitaire des oiseaux

Les virus, les bactéries, les champignons et les parasites ayant pénétré dans l'organisme des vertébrés peuvent être reconnus par le système immunitaire afin de maximiser la fitness des individus. La **moelle osseuse hématopoïétique** et le **thymus** en constituent les organes lymphoïdes primaires. Les **ganglions lymphatiques** et la **rate** sont quant à eux des organes lymphoïdes secondaires. Le système immunitaire des oiseaux se distingue de celui des mammifères par la présence d'une **bourse de Fabricius** (organe lymphoïde primaire où a lieu la maturation des lymphocytes B), qui est localisée dans la partie dorsale du cloaque, et par l'absence de ganglions lymphatiques anatomiquement individualisés (on retrouve seulement des nodules lymphatiques) (figure 3). Hormis ces particularités anatomiques, il est fort semblable à celui des mammifères. Le système immunitaire met en jeu deux processus qui sont étroitement intriqués chez les vertébrés : l'**immunité innée** et l'**immunité acquise** (Roitt *et al.* 1998). L'**immunocompétence** reflète la capacité d'un organisme à produire une réponse immunitaire.



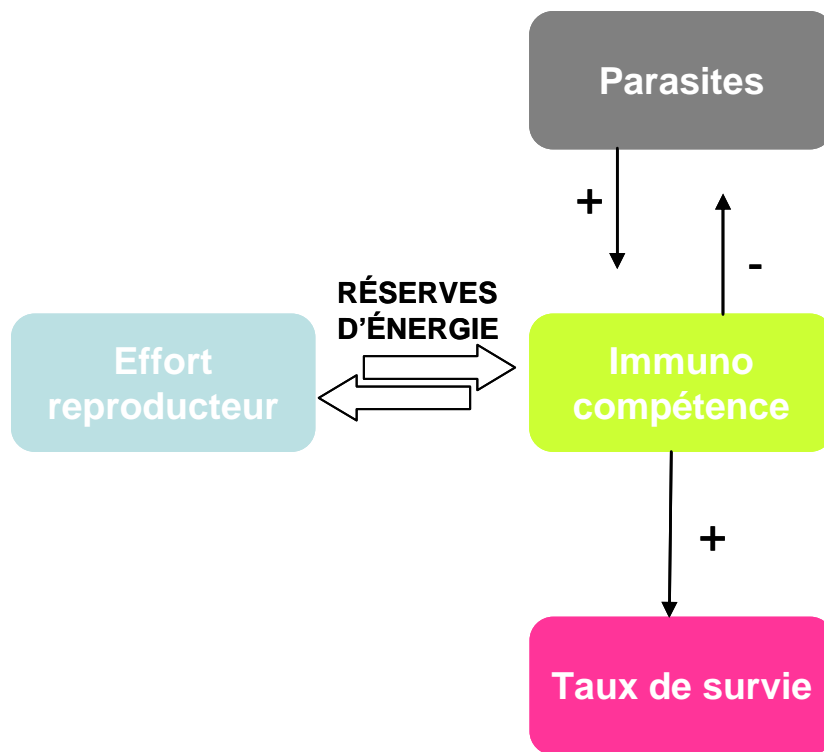


Figure 2. Interrelations entre l'effort reproducteur, l'immunocompétence, la charge parasitaire et le taux de survie. Les réserves d'énergie sont partagées entre l'effort reproducteur et l'immunocompétence qui sont ainsi négativement interreliés, l'augmentation d'une des deux composantes affectant négativement l'autre. Une forte charge parasitaire stimule l'activation du système immunitaire qui limite en retour l'infestation par les parasites. Le taux de survie est augmenté par une immunocompétence efficace.

3.1. L'immunité innée

3.1.1. Les cellules de la lignée myéloïde

L'immunité innée ou non spécifique, d'action immédiate, fait intervenir différents types de cellules issues de cellules souches myéloïdes. On distingue tout d'abord les **macrophages** dans les tissus ou monocytes dans le sang qui détruisent, digèrent et éliminent microbes et autres corps étrangers à l'organisme. De plus, les **granulocytes** se subdivisent, comme chez les mammifères, en trois groupes : les hétérophiles, les éosinophiles et les basophiles. Les **hétérophiles**, également appelés pseudo-éosinophiles, sont les équivalents des polynucléaires neutrophiles des mammifères. Ils manifestent une activité phagocytaire importante, surtout lors de la réaction inflammatoire. Les **éosinophiles** ont des fonctions encore mal connues chez les oiseaux (antiparasitaires chez les mammifères). Les **basophiles** jouent un rôle dans l'inflammation et l'hypersensibilité. Par ailleurs, les **thrombocytes**, cellules nucléées, en plus de leur rôle dans la coagulation sanguine (équivalent des plaquettes des mammifères), manifestent également une activité phagocytaire très importante. Les **mastocytes**, équivalent des basophiles dans les tissus, participent à la réponse immune antiparasitaire mais aussi à l'hypersensibilité. L'activité des **cellules Natural Killer** (NK ; plus proches du phénotype lymphocytaire T) varie en fonction de l'âge chez les oiseaux : elle est faible pendant les premières semaines de la vie et augmente ensuite progressivement. Ces cellules sont surtout retrouvées dans la rate et ne sont ni phagocytaires, ni autoadhérentes (rôle dans l'immunité antivirale et antitumorale chez les mammifères). Enfin, les **cellules Killer** (K ; dérivent des NK à la suite de leur activation par des cytokines) sont présentes dans la rate et la circulation périphérique. Leur cytotoxicité est médiée par les anticorps (=ADCC). Les cellules NK et K sont des cellules cytotoxiques.

3.1.2. Le système du complément

Chez les oiseaux, le complément constitue un élément également essentiel de la **défense anti-infectieuse** agissant par cascade protéolytique. Comme chez les mammifères, le composant **C3** joue un rôle immunologique important : il représente la molécule clé de l'activation du complément, ce qui permet entre autres d'opsoniser les bactéries, et facilite ainsi la fixation des cellules phagocytaires comme les macrophages à leur surface.



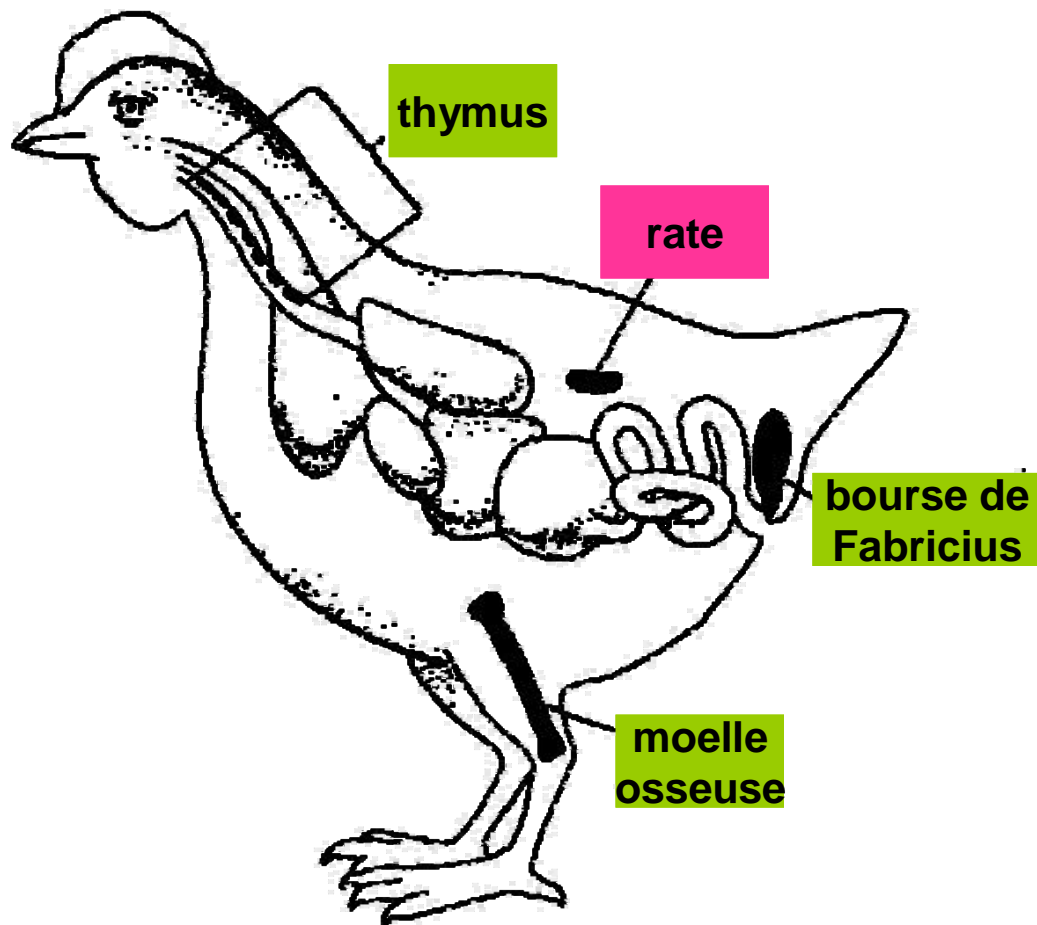


Figure 3. Organes immunitaires des oiseaux : exemple chez le poulet. La moelle osseuse, le thymus et la bourse de Fabricius constituent les organes lymphoïdes primaires (en vert). La rate (en rouge) et les nodules lymphatiques (non représentés) représentent les organes lymphoïdes secondaires. Le système immunitaire des oiseaux se distingue ainsi de celui des mammifères par la présence de la bourse de Fabricius (lieu de maturation des lymphocytes B), localisée dans la partie dorsale du cloaque.

3.2. L'immunité acquise

L'immunité acquise ou spécifique prend le relais de l'immunité innée lorsque celle-ci n'est pas suffisamment efficace. Elle se développe en quelques jours et dépend de la reconnaissance spécifique de la substance étrangère. En effet les **lymphocytes**, qui sont issus des cellules souches lymphoïdes, sont capables de reconnaître spécifiquement un antigène grâce à leur récepteur membranaire et d'adapter la réponse en conséquence. Celle-ci peut être à médiation humorale, relayée par les **lymphocytes B** et la production d'anticorps, ou à médiation cellulaire, actionnée par les **lymphocytes T cytotoxiques**. De plus cette immunité se caractérise par la mise en place d'une mémoire immunologique qui permet de protéger l'organisme contre les antigènes déjà rencontrés.

3.2.1. L'immunité à médiation humorale

Les lymphocytes B, originaires de la **bourse de Fabricius** chez les oiseaux, sont les cellules de l'immunité humorale ; ils produisent les **anticorps** appartenant à la catégorie moléculaire des **immunoglobulines** (Ig). Ces glycoprotéines (Ig), constituées au moins de quatre chaînes polypeptidiques (deux chaînes lourdes et deux chaînes légères), qui sont assemblées de façon à former au moins deux sites de reconnaissance par molécule, servent au départ de récepteur d'antigène à la surface des cellules B. Selon leurs caractères physicochimiques, leur masse moléculaire, leur coefficient de sédimentation et leur structure chimique, on distingue chez les oiseaux trois classes d'immunoglobulines : les **IgY, IgM et IgA**. Bien que les IgY aviaires aient les mêmes propriétés fonctionnelles que les IgG des mammifères, elles sont à défaut souvent appelées IgG dont elles ne présentent pas la même structure. En plus de ces trois classes d'anticorps, les canards possèdent une forme plus petite d'IgY appelée IgY(Δ Fc) (Lundqvist *et al.* 2006). Les IgM, IgY et IgY(Δ Fc) sont présentes dans le sérum alors que les IgA sont exprimées dans une variété de sécrétions.

3.2.2. L'immunité à médiation cellulaire

Dans la circulation sanguine, les cellules T représentent 60 à 70 % des lymphocytes. Les précurseurs des cellules T migrent de la moelle osseuse vers le **thymus** où ils prolifèrent et se



différencient avant de gagner la périphérie. Leur différenciation conduit à la formation d'une population hétérogène de lymphocytes dotés de rôles variés. On distingue les lymphocytes T helper, et les T cytotoxiques. Les premiers sont chargés d'orienter la réponse spécifique vers un type plutôt humoral en stimulant les lymphocytes B, ou vers un type plutôt cellulaire en stimulant les cellules cytotoxiques (NK, macrophages, lymphocytes T cytotoxiques). Les seconds sont chargés de reconnaître et de détruire les cellules de l'organisme devenues dangereuses (contaminées par un virus par exemple). Leur activité est déclenchée par l'interaction de l'antigène, présenté par des cellules de l'organisme, avec le récepteur qu'ils expriment à leur surface.

3.3. Les messagers chimiques de l'immunité : les cytokines

Les **cytokines** sont des composants glycoprotéiques solubles sécrétés principalement par les cellules immunitaires qui sont responsables d'une part de la production des cellules hématopoïétiques par l'organisme et d'autre part de la régulation de la réponse immunitaire. Ces molécules jouent donc un rôle fondamental dans la communication des cellules du système immunitaire entre elles, mais aussi avec d'autres cellules comme celles du système endocrinien ou celles du système nerveux central. On distingue plusieurs groupes tels que les facteurs stimulants les colonies, les interleukines ou encore les chimiokines.

3.4. Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Toutes les espèces de vertébrés possèdent un **complexe majeur d'histocompatibilité** (CMH) comparable à celui de l'homme et de la souris. L'organisation génétique des mammifères, des oiseaux et des amphibiens est en effet la même. Le CMH est une région du génome dont les gènes codent pour les molécules d'histocompatibilité qui ont pour fonction de présenter les antigènes aux lymphocytes T, lesquels doivent ensuite différencier les antigènes de l'organisme (soi) des antigènes étrangers (non-soi) pour éliminer ces derniers. Les gènes du CMH forment un groupe multigénique (supérieur à 30 gènes), multiallélique (1 à 200 allèles par gène) et d'expression codominante. On distingue 3 classes d'antigènes du CMH:

- **les antigènes de classe I** sont responsables des rejets aigus de greffes, car ils sont exprimés sur la quasi-totalité des cellules de l'organisme. La classe I regroupe plusieurs molécules dont



certaines sont fortement polymorphes au sein de l'espèce (nombreux allèles). Ce polymorphisme explique la plus ou moins grande réactivité individuelle.

- **les antigènes de classe II** sont exprimés par des cellules spécialisées dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T helper. La classe II présente un fort polymorphisme, à la fois en raison du grand nombre d'allèles et en raison de mécanismes d'association de chaînes protéiques.

- **les antigènes de classe III** regroupent un ensemble hétérogène de protéines impliquées dans la réponse immunitaire (complément, cytokines...), sujet à un faible polymorphisme au sein de l'espèce.

3.5. Formule sanguine

A titre d'exemple chez les oiseaux, le sang de poulet contient environ 3 à 4 millions d'érythrocytes par mm^3 , alors que le nombre de leucocytes (ou globules blancs) dépasse rarement 30 000 par mm^3 de sang. Chez le poulet adulte, les leucocytes comprennent 59 % de lymphocytes, 10,2 % de monocytes, 27,2 % d'hétérophiles, 2 % d'éosinophiles et 1,7 % de basophiles.

4- Relations entre l'effort reproducteur et l'immunocompétence

4.1. Hypothèse d'une immunosuppression au cours de l'effort reproducteur

Ces dernières années, l'identification des mécanismes potentiels sous-tendant le compromis précédemment évoqué entre la survie parentale et l'investissement dans la reproduction a en effet impliqué, entre autres fonctions, le système immunitaire (Moreno 1993 ; Gustafsson *et al.* 1994 ; Råberg *et al.* 1998 ; Sheldon et Verhulst 1996). Moreno *et al.* (1999) ont notamment invoqué qu'**un effort parental devrait induire une dépression immunitaire chez les oiseaux**. Le fait que la reproduction et l'immunocompétence sont étroitement et réciproquement liées a ensuite été largement confirmé par la littérature.



4.1.1. Effet d'une manipulation de l'effort reproducteur sur l'immunocompétence

Les premières études se sont employées à déterminer **l'impact d'une augmentation de l'investissement dans la reproduction sur l'immunocompétence des oiseaux en manipulant l'effort parental**. Chez des diamants mandarins captifs (*Taeniopygia guttata*) et chez des hirondelles bicolores (*Tachycineta bicolor*), Deerenberg *et al.* (1997) et Ardia *et al.* (2003) ont ainsi respectivement mis en évidence que la production d'anticorps vis-à-vis de globules rouges de moutons (GRM) est diminuée suite à une augmentation expérimentale de l'effort reproducteur. Le compromis entre la reproduction et l'immunité est particulièrement attendu chez les femelles qui, chez la plupart des espèces, montrent un investissement reproducteur plus grand et surtout moins flexible que celui des mâles. Avec des nichées artificiellement augmentées, les femelles de gobemouche noir (*Ficedula hypoleuca*) montrent une diminution de la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Moreno *et al.* 1999) ; de même, les femelles de gobemouche à collier (*Ficedula albicollis*) présentent une baisse de la production d'anticorps vis-à-vis des GRM (Cichon *et al.* 2001) et du virus de la maladie de Newcastle (Nordling *et al.* 1998). Hanssen *et al.* (2005) ont par ailleurs manipulé la taille de couvée de femelles d'eider à duvet (*Somateria mollissima*). L'augmentation de la taille de couvée résulte à court-terme en une perte de masse corporelle supérieure pour les femelles ainsi qu'à une réduction de leur immunité, celle-ci étant évaluée par le taux de lymphocytes et la production d'anticorps vis-à-vis de deux antigènes non pathogéniques : les toxoïdes diphtérique et tétanique. A plus long-terme, c'est-à-dire l'année suivante, cette manipulation a pour effet de retarder la date de ponte et de diminuer la taille de couvée. Chez la mésange bleue (*Parus caeruleus*), une augmentation de l'investissement parental contribue à diminuer leur résistance aux parasites, ce qui à long-terme compromet leurs chances de survie (Stjernman *et al.* 2004).

4.1.2. Effet d'une manipulation de l'immunocompétence sur l'effort reproducteur

L'impact négatif d'une augmentation de l'effort reproducteur sur le système immunitaire étant mis en évidence, une deuxième étape consistait à tester la relation inverse en **manipulant le système immunitaire afin d'en étudier les conséquences sur l'investissement parental** qui conditionne le succès reproducteur. L'activation du système immunitaire de mésanges bleues par l'injection du vaccin diphtérie-tétanos (antigène non pathogénique) aboutit à une



réduction de l'effort parental via une diminution du taux de nourrissage des oisillons (Råberg *et al.* 2000). Des femelles de gobemouche noir vaccinées de la même façon ont un succès reproducteur plus faible que les femelles contrôles (Ilmonen *et al.* 2000). De même, l'injection de lipopolysaccharides d'*Escherichia coli* (antigène non répliquatif) chez le moineau domestique (*Passer domesticus*) entraîne une diminution de la fréquence de nourrissage par les femelles, ce qui à terme réduit leur succès reproducteur (Bonneaud *et al.* 2003). Le taux de retour ainsi que la survie à long-terme de femelles d'eider à duvet, injectées avec un cocktail de deux antigènes non pathogéniques : GRM et toxoïde diphtérique, sont sévèrement altérés (Hanssen *et al.* 2004). Cependant, chez des femelles d'étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*), Williams *et al.* (1999) ont montré que l'augmentation de la production primaire d'anticorps vis-à-vis de GRM pendant la formation des œufs ne modifie pas les rendements reproducteurs primaires et secondaires. En fait, les femelles privées de leur première couvée sont poussées à en produire une seconde. Or, les femelles injectées pondent à même intervalle une couvée de remplacement de taille similaire à celle des femelles contrôles. De plus, le succès de cette deuxième couvée est identique entre les deux groupes expérimentaux. Néanmoins, les jeunes de pie bavarde (*Pica pica*) issus de couvées de remplacement ou de premières couvées tardives présentent une réponse à médiation cellulaire vis-à-vis de la phytohémagglutinine (PHA) significativement plus faible que les jeunes d'une première couvée produits plus tôt dans la saison (Sorci *et al.* 1997). Bien que les organismes puissent compenser à court-terme les effets de mauvaises conditions à la naissance, celles-ci semblent avoir des conséquences négatives sur l'histoire de vie d'un organisme à l'âge adulte (Metcalfé et Monaghan 2001).

4.2. Immunosuppression: causes ultimes

Malgré quelques résultats peu probants, il est à présent généralement admis que l'effort reproducteur et le système immunitaire sont négativement interreliés, l'augmentation d'une composante ayant des effets négatifs sur l'autre composante et réciproquement. Cependant, les causes ultimes et proximales de ce compromis ne sont pas encore élucidées. Dans un premier temps, nous allons nous intéresser aux causes ultimes. A ce jour, deux grandes hypothèses fonctionnelles non mutuellement exclusives sont invoquées pour tenter d'expliquer ce phénomène d'immunosuppression observé au cours de l'effort reproducteur.



4.2.1. Hypothèse d'évitement de pathologies auto-immunes

L'hypothèse d'évitement de pathologies auto-immunes postule en premier lieu que les «**protéines de stress**» (**heat shock proteins**, HSP), qui facilitent l'assemblage des protéines (Sørensen *et al.* 2003), sont surexprimées pendant la reproduction (Lamb *et al.* 1989 ; Locke et Noble 1995 ; Råberg *et al.* 1998). Les HSP ont donc été proposées comme des marqueurs idéaux d'exposition des organismes à des stress chroniques ou à long-terme (Tomás *et al.* 2004 ; Martínez-Padilla *et al.* 2004). Le stress est défini comme une condition qui perturbe le fonctionnement normal du système biologique ou encore une condition qui diminue la fitness (Hoffman et Parsons 1991 ; Sørensen *et al.* 2003). Le stress est plus généralement considéré comme un facteur extrinsèque (environnemental) bien qu'il puisse également être d'origine intrinsèque (stress génétique, sénescence ...). Plusieurs familles de HSP ont été identifiées et nommées en relation avec leur poids moléculaire en kDa. Les familles principales sont : HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 et les petites HSP (de taille inférieure à 30 kDa). Ces HSP ont des fonctions diverses (voir Feder et Hofmann 1999). Chez de nombreux organismes, HSP70 est considérée comme la protéine principale de la famille des HSP (Sørensen *et al.* 2003).

Ces protéines hautement conservées, présentes chez de nombreux organismes incluant les parasites, sont la cible du système immunitaire des hôtes (Lamb *et al.* 1989). Comme les protéines de stress de l'hôte et du pathogène sont très proches, il y a un risque croissant de réponses auto-immunes chez les hôtes infectés. L'immunité serait alors adaptivement rétro-réglée pendant un effort reproducteur donné afin de limiter les risques de réactions auto-immunes. Moreno *et al.* (2002) proposent notamment l'existence d'**un lien entre le système immunitaire et la synthèse des protéines de stress**. Chez les oiseaux, seules quelques études ont récemment tenté de mettre en évidence ce lien. Elles se sont principalement intéressées aux protéines HSP70 et HSP60. Chez des couples en reproduction d'hirondelle rustique (*Hirundo rustica*) infestés par des hémoparasites, les deux protéines sont positivement corrélées (Merino *et al.* 2002). Cependant, elles semblent jouer des rôles différents. En effet, le taux de HSP70 ne varie pas avec l'infection parasitaire alors que le taux de HSP60 est significativement plus élevé chez les hirondelles infectées par différents hématozoaires (Merino *et al.* 2002). De même, chez les jeunes d'hirondelle de fenêtre (*Delichon urbica*), Merino *et al.* (1998) ont mis en évidence une relation positive entre le taux de HSP60 et le taux d'infestation par des punaises d'hirondelles (*Oeciacus hirundinis*). Ces résultats



indiquent que l'augmentation du taux de cette protéine semble être un bon indicateur de la présence de parasites.

4.2.2. Hypothèse d'allocation optimale des ressources

Afin que soit assurée une allocation optimale des ressources limitées entre différentes activités en compétition, cette autre hypothèse propose que l'investissement dans des comportements coûteux tels que la reproduction se fait au détriment des ressources disponibles pour les autres systèmes tel que le système immunitaire (Råberg *et al.* 1998). Une telle hypothèse requiert un coût énergétique ou nutritionnel associé à la maintenance et à l'activation du système immunitaire (Råberg *et al.* 1998). Or, les éléments en faveur de **l'existence d'un tel coût sont équivoques**. Les études qui ont mesuré la dépense énergétique liée à la mise en place d'une réponse immunitaire ont en effet produit des **résultats contradictoires**. Chez les souris, l'activation d'une réponse immunitaire a provoqué une augmentation de 15 à 20 % de leur consommation en oxygène (Demas *et al.* 1997). Chez le moineau domestique, une augmentation de 29 % du métabolisme de repos, équivalente au coût de production d'un oeuf, a été documentée après l'activation d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire induite par injection de PHA (Martin II *et al.* 2003). De même, une augmentation significative du taux métabolique basal (BMR) a été rapportée chez des mâles de mésange charbonnière (*Parus major*) ayant reçu une injection de GRM (Ots *et al.* 2001). Cependant, le coût énergétique lié à l'activation de l'immunité à médiation humorale de mésanges bleues (*Parus caeruleus*) à qui on a injecté de nouveaux antigènes (protéines) est faible et représente au maximum 8 à 13 % du BMR (Svensson *et al.* 1998). De même, la réaction immunitaire déclenchée contre les GRM n'a pas d'impact physiologique significatif chez des mâles du verdier d'Europe (*Carduelis chloris*) maintenus en captivité avec une nourriture abondante (Hörak *et al.* 2003). Verhulst *et al.* (2005) ont également établi que les coûts métaboliques inhérents à l'activation d'une réponse humorale sont négligeables chez les diamants mandarins. Leur immunisation contre des GRM n'induit pas d'effets notoires sur leur métabolisme. Eraud *et al.* (2005) ont mesuré le BMR de Tourterelles turques (*Streptopelia decaocto*) captives après l'injection de GRM et les ont comparé à ceux d'individus contrôles à qui on a injecté du sérum physiologique. De plus, ils ont comparé le coût métabolique d'un tel challenge immunitaire à celui d'une activité physiologique : la thermorégulation. Ils ont rapporté dans un premier temps que la production d'anticorps vis-à-



vis des GRM augmente le BMR des oiseaux avec un pic à 8,5 % du BMR sept jours après le challenge. Ce résultat porte en premier lieu à croire qu'un compromis énergétique a lieu entre le système immunitaire et d'autres traits d'histoire de vie. Cependant, le fait que les coûts liés à une thermorégulation représentent 5 % du BMR. $^{\circ}\text{C}^{-1}$ laisse un doute sur cette interprétation.

4.3. Immunosuppression: causes proximales

Quelle que soit l'importance relative des hypothèses précédemment évoquées, les mécanismes proximaux sous-tendant la dépression immunitaire au cours de l'effort reproducteur restent à ce jour incompris. Outre une hypothèse métabolique non fonctionnelle et négligeable (Råberg *et al.* 1998), des **changements hormonaux** ont par ailleurs été invoqués (Zuk 1996 ; Deerenberg *et al.* 1997 ; Ricklefs et Wikelski 2002).

4.3.1. Hypothèse métabolique du stress oxydatif

On sait qu'un fort investissement reproducteur augmente le métabolisme (taux métabolique) et conduit à un **stress oxydatif** (Nilsson 2002 ; Wiersma *et al.* 2004) imputable à la production accrue de métabolites oxydatifs (von Schantz *et al.* 1999). Les processus physiologiques conduisent en effet inévitablement à la production de **radicaux libres** encore appelés **espèces oxygénées réactives** (ROS ; Alonso-Alvarez *et al.* 2004). Les effets toxiques des ROS sont naturellement limités par des antioxydants endogènes (enzymes) et exogènes (caroténoïdes, vitamine C) (Surai 2002). Les caroténoïdes sont notamment des pigments impliqués à la fois dans l'élaboration des réponses immunitaires (Lozano 1994 ; Owens et Wilson 1999) et aussi dans la coloration de caractères sexuels secondaires tels que la couleur du bec. Au carrefour entre l'immunité (activateurs) et la reproduction (signaux sexuels), ils ont fait l'objet de récentes investigations (Faivre *et al.* 2001 ; 2003). Cependant, ces antioxydants sont en quantité limitée et la production augmentée de ROS consécutive à un effort reproducteur pourrait ainsi engendrer un coût de la reproduction (Wiersma *et al.* 2004). Ainsi, des diamants mandarins captifs dont la taille de couvée a été expérimentalement augmentée montrent une activité enzymatique antioxydante inférieure à celle de congénères élevant de plus petites couvées (Wiersma *et al.* 2004) et sont également plus sensibles au stress oxydatif, en particulier les mâles (Alonso-Alvarez *et al.* 2004). L'explication la plus simple est que la dépression immunitaire au cours de la reproduction serait inhérente à la



production augmentée de ROS (Råberg *et al.* 1998 ; Alonso-Alvarez *et al.* 2004) qui exerceraient des effets non spécifiques et délétères sur tous les tissus y compris le système immunitaire (Bendich 1996). Ce phénomène constituerait ainsi un exemple d'une immunosuppression non fonctionnelle consécutive à une augmentation du taux métabolique. Bien que les radicaux libres puissent en partie contribuer à la dépression immunitaire, ils ne constitueraient donc pas à eux seuls le mécanisme physiologique sous-jacent.

4.3.2. Rôle de la testostérone

Principalement produite dans les testicules, la testostérone est une hormone stéroïde responsable du développement et du maintien des caractères sexuels secondaires. Les femelles de nombreuses espèces animales choisissent leur partenaire sexuel sur la base de ces caractères sexuels secondaires qui constituent ainsi des signaux honnêtes de la qualité des mâles (voir Andersson 1994). Mais, alors que de fortes concentrations en testostérone améliorent l'expression des caractères sexuels, elles contribueraient aussi à la dépression du système immunitaire. L'**hypothèse du handicap d'immunocompétence** ainsi développée par Folstad et Karter (1992) explique le maintien d'une corrélation entre l'expression du caractère et la qualité du mâle par le fait que seuls les mâles pourvus d'un système immunitaire particulièrement performant seraient capables de supporter le coût associé au développement des caractères sexuels secondaires dont l'expression dépend des concentrations en testostérone. En accord avec cette hypothèse, Zuk *et al.* (1995) ont trouvé chez le coq bankiva (*Gallus gallus*) une corrélation négative entre la taille d'un caractère sexuel secondaire (la crête) et une mesure de l'immunocompétence. Ce principe est ainsi basé sur l'hypothèse d'un **effet immunosuppresseur de la testostérone**. Cependant, **les preuves d'un tel rôle de cette hormone restent équivoques** (voir Roberts *et al.* 2004 pour une revue). Tout d'abord, Mougeot *et al.* (2006) ont montré que des mâles lagopède d'Ecosse (*Lagopus lagopus*) traités avec de la testostérone sont porteurs de plus de parasites intestinaux que les mâles non traités. Ensuite, Peters (2000) a mis en évidence chez le Mériion superbe (*Malurus cyaneus*) que les mâles ayant des implants de testostérone ont moins tendance que les mâles contrôles à développer une réponse immunitaire vis-à-vis des GRM. De même, Duffy *et al.* (2000) ont montré que des mâles et femelles étourneaux sansonnets avec des implants de testostérone présentent une diminution de leur production d'anticorps vis-à-vis d'un nouvel antigène et de leur réponse immunitaire à médiation cellulaire vis-à-vis du PHA



par rapport aux individus contrôles. Néanmoins, Greenman *et al.* (2005) ont montré que l'administration de testostérone à des mâles de moineau domestique non reproducteurs ne supprime pas la réponse immunitaire à médiation cellulaire vis-à-vis du PHA. Chez des mâles de carouge à épaulette (*Agelaius phoeniceus*) captifs avec des implants de testostérone, Hasselquist *et al.* (1999) ne mettent pas non plus en évidence de rôle immunosuppresseur de cette hormone envers la réponse humorale secondaire vis-à-vis de l'hémocyanine (KLH). Ils ne trouvent pas non plus de corrélation entre les réponses humorales primaires et la testostérone endogène chez des mâles sauvages.

4.3.3. Rôle de la corticostérone

La corticostérone, hormone stéroïde, est sécrétée par les glandes corticosurrénales en réponse à des situations de stress. La corticostérone plasmatique circule à la fois sous forme libre et sous forme liée à des globulines (Romero 2004). Les **glucocorticoïdes** sont aussi de **puissants immunorégulateurs endogènes** conduisant à une relation très étroite entre l'immunocompétence et la voie endocrine du stress (McEwen *et al.* 1997 ; Apanius 1998). Ainsi, quelles que soient les causes ultimes responsables de la dépression immunitaire au cours de l'effort reproducteur, la corticostérone a été invoquée comme le principal mécanisme proximal sous-jacent (Råberg *et al.* 1998 ; Sapolsky *et al.* 2000 ; Ilmonen *et al.* 2003 ; Saino *et al.* 2003). Braude *et al.* (1999) ont cependant nuancé ce postulat. En effet, ils ont proposé que les concentrations physiologiques de corticostérone dans le plasma contribueraient davantage à une **immunoredistribution**, c'est à dire la diminution d'une des composantes immunitaires en faveur d'autres, plutôt qu'à une immunosuppression *stricto sensu*. Ce phénomène implique des compromis au sein du système immunitaire (Buchanan *et al.* 2003). Afin d'étayer ces hypothèses, de nombreuses études ont cherché à mettre en relation les taux de corticostérone avec l'état immunitaire des individus lors d'un événement reproducteur. Dans un premier temps, certains auteurs ont tenté d'augmenter indirectement les taux de corticostérone en provoquant un stress via la manipulation de l'effort parental. Ilmonen *et al.* (2003) ont cherché à quantifier l'effet d'une manipulation de la taille de couvée sur les taux de corticostérone et les réponses immunitaires des oisillons et des parents mâles de gobemouche noir. Les taux de corticostérone ont augmenté chez les mâles et les oisillons des couvées de taille augmentée. Cependant, parmi les groupes à couvée augmentée, la production d'anticorps vis-à-vis du vaccin diphtérie-tétanos n'a pas varié chez les mâles alors que la



réponse à médiation cellulaire vis-à-vis du PHA a significativement diminué chez les oisillons. De même, Saino *et al.* (2002) ont manipulé les tailles de couvées d'hirondelles rustiques et en ont étudié les effets sur les taux de corticostérone et la réponse à médiation cellulaire vis-à-vis du PHA chez les mâles. Ils ont ainsi établi une relation négative entre l'effort parental et la réponse immunitaire, les mâles dont les tailles de couvées sont augmentées présentant une diminution de leur réponse immunitaire. Cependant, ils n'ont pas trouvé de covariation entre la réponse immunitaire et les taux de corticostérone. Chez les oisillons de la même espèce, une augmentation de la taille de couvée a pour effet d'augmenter leurs taux de corticostérone par rapport aux nichées contrôles et aussi de diminuer leur réponse immunitaire à médiation cellulaire (Saino *et al.* 2002). De plus, contrairement aux adultes, une corrélation négative entre la réponse immunitaire et la corticostéronémie a été mise en évidence chez les oisillons, de forts taux de corticostérone étant associés à de faibles réponses immunitaires (Saino *et al.* 2003).

Dans un second temps, d'autres auteurs ont directement manipulé les taux de corticostérone par des apports exogènes. Par exemple, Rubolini *et al.* (2005) ont injecté de la corticostérone dans des œufs fraîchement pondus par des Goélands leucopnée (*Larus michahellis*). Les oisillons issus des œufs à forte concentration en corticostérone ont montré une réponse immunitaire à médiation cellulaire réduite par rapport aux oisillons contrôles issus d'œufs non manipulés alors que leur réponse humorale envers un nouvel antigène n'est pas affectée par le traitement. A l'inverse, Martin II *et al.* (2005) n'ont pas montré d'effet d'un apport exogène de corticostérone sur la réponse immunitaire cutanée induite par le PHA chez une population de moineaux domestiques reproducteurs vivant en zone tempérée ainsi que chez les individus d'une population tropicale, indépendamment de leur statut reproducteur. Seuls les moineaux non reproducteurs de la zone tempérée ont présenté une diminution significative de leur réponse immunitaire en réponse au traitement.

Quels que soient les protocoles utilisés, les résultats obtenus sont davantage concordants concernant les études menées sur les oisillons alors qu'ils sont nettement plus contrastés chez les adultes. De plus, la plupart des études menées sur les effets des glucocorticoïdes sur l'immunité utilisent des glucocorticoïdes de synthèse, ce qui néglige les effets complexes des stéroïdes *in vivo* (McEwen *et al.* 1997). En conséquence, **le rôle attribué à ces hormones semble être ainsi biaisé en faveur de leur action immunosuppressive**. Cependant, un examen plus poussé montre que les glucocorticoïdes endogènes sont des modulateurs plus fins et plus complexes du système immunitaire, qui peuvent donc stimuler ou inhiber et ainsi



influencer la susceptibilité aux infections ainsi que la progression des pathologies (McEwen *et al.* 1997).

4.3.4. Rôle des hormones thyroïdiennes

La thyroxine (T_4), qui est l'hormone précurseur de la triiodothyronine (T_3), est sécrétée par la glande thyroïde. C'est dans le foie que la plus grande partie de la T_4 est activée en T_3 . Le niveau du **métabolisme énergétique** est principalement régulé par la T_3 chez les mammifères et les oiseaux (McNabb 1995). Un compromis étant supposé entre d'une part la fonction immunitaire et d'autre part l'énergie, les nutriments et d'autres ressources importantes (Martin *et al.* 2001), plusieurs études se sont employées à examiner les relations entre les hormones thyroïdiennes et l'immunité. Or, **les résultats ainsi obtenus sont ambigus, voire contradictoires**. Il a été établi une relation positive entre les taux d'hormones thyroïdiennes, les taux d'hormone de croissance et la fonction immunitaire chez le poulet (Marsh *et al.* 1992). Bachman et Mashaly (1987) ont mesuré des taux plus importants de lymphocytes circulants chez des poussins hyperthyroïdiens, alors qu'une supplémentation en hormones thyroïdiennes a induit une diminution de leur réponse lymphocytaire (Erf et Marsh 1989). Williamson *et al.* (1990) ont également mis en évidence une augmentation de la réponse lymphocytaire périphérique chez des poussins hypothyroïdiens. A l'inverse, l'induction pharmacologique d'une hypothyroïdie entraîne une diminution de l'activité des cellules NK (immunité innée) alors que l'induction d'une hyperthyroïdie n'altère pas cette activité chez des mâles de canard colvert (*Anas platyrhynchos* ; Fowles *et al.* 1997). Les effets des hormones thyroïdiennes sur le système immunitaire restent donc incertains (Smits *et al.* 2002).

4.3.5. Autres hormones

De façon beaucoup plus anecdotique, d'autres hormones ont été impliquées dans la régulation du système immunitaire. Nous n'évoquerons ici que le cas de la prolactine et de la mélatonine. La **prolactine** est une hormone antéhypophysaire impliquée dans le comportement parental (Buntin 1996 ; Sharp *et al.* 1988). Elle induit notamment le comportement d'incubation chez les oiseaux (Youngren *et al.* 1991 ; Sockman *et al.* 2000). Les effets de la prolactine ne se limitent pas à des modifications comportementales. En effet,



celle-ci induit la formation de la plaque incubatrice en synergie avec les stéroïdes sexuels (perte des plumes, développement du réseau vasculaire sous-cutané ; Vleck *et al.* 1991), nécessaires aux échanges caloriques entre l'adulte et les œufs. Le rôle immunomodulateur de la prolactine n'a pas été clairement établi. En effet, Sotowska-Brochocka *et al.* (1984) ont montré chez le coq qu'une administration de prolactine augmente la production d'anticorps vis-à-vis des GRM et le nombre de lymphocytes. De même, Rodriguez *et al.* (1996) ont montré chez la tourterelle domestique (*Streptopelia risoria*) qu'une élévation de la concentration en prolactine au cours de l'incubation est associée à une augmentation de l'activité phagocytaire. Cependant, Skwarlo-Sonta *et al.* (1986) n'ont pas montré d'effet des taux de prolactine sur le niveau des anticorps naturels chez le coq.

La **mélatonine** est une hormone sécrétée par la glande pinéale ou épiphyse pendant la nuit chez les oiseaux et les mammifères. Chez les mammifères, la mélatonine est connue pour stimuler la fonction immunitaire en jours courts (Nelson et Demas 1996). La même tendance a été observée chez la tourterelle domestique qui présente une augmentation de l'immunité innée consécutive à un apport exogène de mélatonine (Rodriguez *et al.* 1997).

5- Évaluation de l'immunocompétence

L'hypothèse d'immunosuppression comme un mécanisme physiologique sous-tendant le compromis entre la survie et l'effort reproducteur chez les oiseaux a ainsi été largement évoquée ces dernières années. Or, la littérature a fourni des résultats ambigus et parfois contradictoires, ce qui nous invite à la plus grande prudence concernant leur interprétation. Il est donc important de définir les contraintes méthodologiques, expérimentales et biologiques imputables à l'ambivalence de ces résultats afin d'aller encore plus loin dans les investigations.

5.1. Outils méthodologiques

La littérature recense une pléthore d'outils méthodologiques utilisés pour évaluer l'immunocompétence des individus (voir Viney *et al.* 2005 pour une revue). Certaines études ont évalué l'immunocompétence des oiseaux par un simple **comptage de cellules immunitaires** (Ots et Horák 1996 ; Zuk et Johnsen 1998) ou encore en évaluant **la taille relative des organes de l'immunité**, tels que la rate ou la bourse de Fabricius (Møller *et al.*



1996). La fiabilité de ces méthodes qui emploient des mesures indirectes de l'immunocompétence a toutefois été largement remise en question (Lochmiller 1995 ; Owens et Wilson 1999 ; Norris et Evans 2000). Plus récemment, les chercheurs en écologie comportementale leur ont préféré des techniques qui imposent un **challenge immunitaire** c'est-à-dire l'exposition du système immunitaire à un nouvel antigène qui aboutit à une réponse immunitaire quantifiable (Deerenberg *et al.* 1997). Là encore, plusieurs types de challenge ont été mis en place, ce qui limite encore la confrontation des résultats. La réponse immunitaire à médiation cellulaire a principalement été mesurée vis-à-vis d'un antigène particulier : la phytohémagglutinine (PHA). Ce test cutané est devenu une technique standard (Merino *et al.* 1999 ; Smits *et al.* 1999 ; 2001 ; Moreno *et al.* 2001) qui ne semble pas induire de stress physiologique particulier (Merino *et al.* 1999). A l'inverse, la mesure de l'immunité humorale s'est nettement moins uniformisée à travers les différentes études. Elle a entre autres été évaluée par la mesure de taux d'anticorps totaux (Johnsen et Zuk 1999 ; Szép et Møller 1999 ; Martinez *et al.* 2003) ou d'anticorps spécifiques à un antigène non pathogénique tels que le vaccin diphtérie-tétanos (Illmonen *et al.* 2000 ; Raberg *et al.* 2000 ; Hanssen *et al.* 2005) ou encore les GRM (Deerenberg *et al.* 1997 ; Saino *et al.* 1997). De plus, les différents antigènes ont souvent été administrés à des doses extrêmement fortes relativement à la taille des espèces utilisées (Viney *et al.* 2005). En conséquence, la confrontation et l'interprétation des différents résultats restent sujettes à caution et invitent à une certaine prudence (Matson *et al.* 2006).

5.2. Limites des outils

De plus, en raison du degré de complexité du fonctionnement du système immunitaire, activer simultanément différentes composantes présente des problèmes pratiques. Ainsi, peu d'études ont jusqu'à présent évalué plus d'une composante immunitaire au cours d'un événement reproducteur (Hörak *et al.* 1998 ; Ots et Hörak 1998 ; Pap et Markus 2003). Or, il a été invoqué que la limitation en ressources pouvait affecter de façon différentielle les différentes composantes immunitaires (Norris et Evans 2000 ; Matson *et al.* 2006). Zuk et Johnsen (1998) ont illustré ce phénomène d'**immunoredistribution** chez le coq bankiva où les mâles en reproduction présentent une réponse humorale diminuée mais une réponse à médiation cellulaire augmentée. Plus récemment, afin de mettre en relation l'immunocompétence avec le degré d'expression d'un caractère sexuel secondaire (la couleur du bec), Faivre *et al.* (2003)



ont mesuré les deux composantes de l'immunité acquise chez le merle noir (*Turdus merula*). Bien que les deux composantes immunitaires aient été évaluées chez deux groupes d'individus distincts, les mâles au bec orange, préférés par les femelles (Faivre *et al.* 2001), ont montré une réponse humorale secondaire vis-à-vis des GRM plus faible que les mâles à bec jaune alors que la relation inverse a été observée pour la réponse cellulaire vis-à-vis du PHA. C'est donc ce qui a amené Adamo (2004) à insister sur la **nécessité d'évaluer simultanément les deux composantes immunitaires acquises** afin d'aboutir à une meilleure évaluation de l'immunocompétence globale.

5.3. Évaluation de l'immunité innée

L'évaluation des composantes acquises s'étant avérée insuffisante dans le cadre d'études immuno-écologiques (Gross *et al.* 1980 ; Keil *et al.* 2001), il est alors apparu indispensable de quantifier la réponse immunitaire innée. Or, l'immunité innée, classiquement considérée trop essentielle pour être diminuée en faveur de l'investissement reproducteur (Lochmiller et Deerenberg 2000), n'a que trop rarement été mesurée par manque de techniques applicables aux individus vivant dans leur milieu naturel. Nous assistons actuellement à **l'émergence de nouveaux travaux** qui proposent des techniques originales d'évaluation de l'immunité innée. Parmi ceux là, Tielman *et al.* (2005) proposent de mesurer l'immunité innée par la quantification de l'activité bactéricide *in vitro* du sang total. Matson *et al.* (2005) ont développé la quantification de l'immunité innée par la mesure des titres d'agglutination des anticorps naturels du complément contre des globules rouges de lapins. Mauck *et al.* (2005) ont appliqué cette technique chez des poussins d'Océanite culblanc (*Oceanodroma leucorhoa*). Leurs résultats montrent une relation inverse entre le taux de croissance des jeunes et le développement des composantes du système immunitaire aviaire. Ces mesures qui n'imposent pas l'exposition à un nouvel antigène présentent l'avantage de se limiter à une seule capture au cours de laquelle seulement 50 à 100 µL de sang sont prélevés. Elles sont ainsi idéalement indiquées pour des études comparatives inter-espèces du système immunitaire. Néanmoins, l'activation expérimentale d'une réponse immunitaire permet d'apporter une nouvelle dimension (Matson *et al.* 2006). Une autre technique consiste à injecter un antigène : des lipopolysaccharides (LPS) d'*Escherichia coli* en vue de stimuler le système immunitaire inné et de quantifier la réponse produite. En effet, les macrophages, cellules immunitaires innées, produisent de l'oxyde nitrique (NO) lorsqu'ils sont stimulés par



des LPS. La quantité de NO libérée par les macrophages consécutivement à une injection de LPS permettrait ainsi une mesure alternative de la réponse immunitaire innée (Lillehoj *et al.* 2004). Désormais mises au point, ces techniques immunologiques demandent à être validées et ouvrent la voie à de nouvelles investigations immuno-écologiques.

5.4. Facteurs confondants

5.4.1. L'hypothèse d'augmentation de la prise alimentaire

La théorie des traits d'histoire de vie est fondée sur le principe d'allocation postulant que l'augmentation de l'énergie allouée à un processus physiologique résulte en la diminution de l'énergie allouée à d'autres processus (Stearns 1992). Cependant, ce principe n'est valide que si le gain d'énergie est constant. L'hypothèse d'augmentation du taux d'ingestion ou « increased intake hypothesis » proposée par Nilsson (2002) postule qu'en réponse à une demande énergétique accrue, les organismes sont capables d'ingérer et de digérer davantage de nourriture suite à l'augmentation de la taille du tractus digestif (Piersma et Lindström 1997). Comme l'activité métabolique des organes du tractus alimentaire est forte et contribue significativement au BMR (Alexander 1999), l'augmentation du tractus résulterait alors en une augmentation générale du BMR (Lindström *et al.* 1999). Cette dernière hypothèse suggère que les organismes pourraient compenser une dépression immunitaire éventuelle par une augmentation de leur prise alimentaire. Or, la plupart des travaux menés à ce jour sur les compromis effectués entre la reproduction et l'immunocompétence ont été réalisés sur des passereaux sauvages dont la prise alimentaire n'est pas ou difficilement observable (Nordling *et al.* 1998) ou encore sur des oiseaux captifs nourris *ad libitum* (Deerenberg *et al.* 1997 ; Svensson *et al.* 1998). Bien que l'induction d'une réponse immunitaire soit classiquement associée à une réduction de la prise alimentaire (Klasing *et al.* 1987), Deerenberg *et al.* (1997) ont montré qu'un supplément protéique ne suffit pas à augmenter la réponse immunitaire vis-à-vis de GRM chez des diamants mandarins en reproduction. Pour tenter de s'affranchir des effets potentiels de la compensation alimentaire sur l'immunocompétence, Hanssen *et al.* (2005) ont proposé de mesurer l'effet d'un investissement parental sur l'immunocompétence de femelles d'eider à duvet. En effet, ces femelles jeûnent de façon totale pendant toute la durée de l'incubation qu'elles assurent seules.



5.4.2. Manipulation de l'effort parental

Une autre explication à l'ambivalence des résultats est que les parents dont les tailles de couvées ont été artificiellement augmentées pourraient être récalcitrants à augmenter leur investissement parental en compromettant ainsi la viabilité des œufs ou la survie des jeunes (Siikamäki 1995 ; Hanssen *et al.* 2003a). En résumé, les manipulations de taille de couvée n'aboutissent pas systématiquement à une augmentation de l'effort parental, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet de manipulation de la taille de couvée sur l'immunocompétence dans certaines études (Ilmonen *et al.* 2002).

5.4.3. Effet de l'âge

Aussi, Haussmann *et al.* (2005) ont mis en évidence l'impact négatif de l'âge des oiseaux sur leur immunocompétence, c'est-à-dire un phénomène d'**immunosénescence**. Ils ont mesuré la réponse immunitaire à médiation cellulaire vis-à-vis du PHA en fonction de l'âge des individus de trois espèces d'oiseaux qui diffèrent pour leur espérance de vie. Ils ont montré qu'après avoir atteint 80 % de leur espérance de vie maximale, les oiseaux montrent une diminution d'environ 57 % de leur réponse cellulaire. Les espèces longévives présentent ainsi une diminution annuelle moins importante que les espèces qui vivent moins longtemps. Ainsi, Haussmann *et al.* (2005) insistent sur l'importance de tenir compte de l'âge des individus afin d'évaluer l'impact d'une manipulation donnée sur l'immunocompétence. Or, peu de biologistes travaillant sur des espèces sauvages sont capables de déterminer l'âge des oiseaux et encore moins de travailler sur des individus d'âge similaire. Les espèces longévives apparaissent par conséquent comme un modèle d'étude privilégié chez lesquelles le facteur âge s'avère avoir un impact moindre sur l'immunocompétence.

5.4.4. Chevauchement mue/reproduction

Chez les oiseaux, l'investissement annuel dans le renouvellement du plumage est un processus fondamental nécessaire à la survie (Holmgren et Hedendtröm 1995). La **mue** a été décrite comme une activité grande consommatrice en énergie entre autres à cause du coût de la synthèse des plumes (Lindström *et al.* 1993 ; Klaassen 1995) et de la diminution d'isolation thermique occasionnée par la perte du plumage (Klaassen 1995). De plus, il existe un coût



supplémentaire lié à la mue des ailes en terme de diminution des performances de vol (Swaddle et Witter 1997), ce qui tend à augmenter à la fois les coûts énergétiques du vol (Chai 1997) et les risques de prédation (Slagsvold et Dale 1996). Pour preuve, Merilä (1997) a mis en évidence chez le Roitelet huppé (*Regulus regulus*) que le chevauchement de la mue et de la migration est coûteux et qu'il existe des compromis entre l'énergie allouée à la mue et la migration. De plus, Svensson et Nilsson (1997) ont montré que les oiseaux qui commencent à muer alors qu'ils continuent à élever des jeunes réduisent leur effort parental, probablement en réponse aux demandes énergétiques imposées par la mue. Le gobemouche noir est notamment une espèce qui présente un chevauchement de la reproduction et de la mue. Sanz *et al.* (2004) ont immunisé des mâles de cette espèce avec des GRM au cours de la première semaine post-ponte et ont comparé leur score de mue, leur investissement parental et leur succès reproducteur avant l'envol des jeunes avec ceux des mâles injectés avec une solution saline contrôle. Les mâles immunisés qui nourrissent les oisillons présentent un retard de l'initiation de leur mue post-nuptiale comparés aux mâles contrôles. L'activation expérimentale de leurs défenses immunitaires augmente leur stress et diminue leur succès reproducteur à court-terme. Ces résultats suggèrent que l'activation expérimentale du système immunitaire des mâles de gobemouche noir diminue les ressources nécessaires à l'initiation de la mue post-nuptiale. Donc, bien que **la mue** semble occasionner une dépense énergétique considérable, cette dernière est **associée à une réponse immunitaire augmentée**. Par exemple, chez les moineaux domestiques, la mue déclenche une augmentation des basophiles chez les juvéniles et les adultes (Nava *et al.* 2001). En accord avec ces observations, on a observé chez certaines espèces d'oiseaux une augmentation de la taille des organes de l'immunité tels que le thymus ou la rate au cours de la mue (Moreno *et al.* 2001). Ces hypertrophies pourraient tout d'abord être la conséquence d'une production lymphocytaire accrue nécessitée par l'expansion du système circulatoire. Elles pourraient aussi permettre d'éviter l'infection des blessures provoquées par l'altération de la peau au niveau des follicules des plumes en croissance (Moreno 2004). Ce compromis entre l'immunocompétence et la mue pourrait non seulement impliquer des coûts en terme de retard de la mue en cas d'infection mais pourrait surtout interagir avec l'immunosuppression observée lors de l'effort reproducteur chez les espèces qui présentent un chevauchement de la reproduction et de la mue (Sanz *et al.* 2004). Ainsi, un compromis éventuel entre l'immunité, la reproduction ou la mue est plus difficile à mettre en évidence chez des espèces qui initient la mue alors même que la reproduction n'est pas achevée (Moreno *et al.* 2001). Par exemple,



Moreno *et al.* (2001) ont mesuré simultanément la dépense énergétique journalière (DEJ) et la réponse à médiation cellulaire vis-à-vis du PHA chez des gobemouches noirs en période d'élevage. Une proportion significativement plus grande de mâles que de femelles initie la mue pendant la période d'élevage. Les fréquences de nourrissage sont fortement négativement corrélées avec la DEJ chez les femelles et seulement chez les mâles n'ayant pas entamé la mue, un fort taux de nourrissage entraînant une plus forte DEJ des parents. La DEJ et la réponse immunitaire sont négativement corrélées chez les femelles, une plus grande dépense étant associée à une réponse immunitaire plus faible. Chez les mâles en mue, une corrélation positive a été trouvée entre le score de mue et la réponse immunitaire, de forts scores étant associés à de fortes réponses immunitaires. En conclusion, Moreno *et al.* (2001) ont mis en évidence que le chevauchement de la reproduction et de la mue chez les mâles de gobemouche noir semble contribuer à l'augmentation de la réponse cellulaire.

Par conséquent, il apparaît important d'évaluer le compromis entre l'immunocompétence et la reproduction chez des espèces aviaires qui ne présentent pas de chevauchement entre l'événement reproducteur et la mue (Moreno *et al.* 2001).

5.4.5. Effets à long-terme

La plupart des études menées se sont contentées de documenter les effets à court-terme d'un effort reproducteur augmenté sur l'immunocompétence. Or, quand on se réfère à la définition d'un coût de la reproduction, se limiter à l'étude des effets à court-terme ne suffit évidemment pas à confirmer l'hypothèse que le coût de la reproduction serait médié par une immunosuppression. Pour ce faire, il faut mesurer les effets à long-terme tels que le taux de survie ou encore la fécondité les années suivantes. Pour des raisons pratiques, peu d'études ont quantifié de tels coûts à long-terme. Parmi celles-ci, Visser et Lessells (2001) ont mis en évidence l'impact d'une augmentation de l'effort parental en terme de réduction de la survie chez des mésanges charbonnières. De même, Hanssen *et al.* (2005) ont montré chez des femelles d'eider à duvet que l'augmentation de la taille de couvée aboutit à une diminution de la fécondité la saison suivante, potentiellement consécutive à la dépression immunitaire observée l'année précédente.

En conclusion, les divergences observées entre les différents résultats évoqués à travers cette revue bibliographique peuvent s'expliquer à la fois par la diversité des techniques utilisées et aussi par les contraintes biologiques et environnementales des différentes espèces biologiques



étudiées. En conséquence, la confrontation des résultats reste difficile et sujette à caution. Plusieurs questions restent ainsi en suspens et appellent à davantage d'uniformisation dans les méthodologies utilisées.



B- Contexte de l'étude



B- CONTEXTE DE L'ETUDE

Ce travail de thèse qui se propose d'étudier l'immunocompétence chez les oiseaux longévifs s'est porté plus particulièrement sur deux modèles biologiques : l'eider à duvet (*Somateria mollissima*) et le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*). Avant d'aborder les problématiques envisagées chez ces deux espèces, nous allons tout d'abord nous attacher à les décrire.

1- Cycle de vie annuel de l'eider à duvet (*Somateria mollissima*)

L'eider à duvet est un oiseau marin appartenant à l'ordre des **Ansériformes** et à la famille des **Anatidés** (cygnes, oies, canards). Les adultes atteignent la maturité sexuelle à trois ans (Korschgen 1977). Le plumage noir et blanc du mâle contraste avec celui plus discret de la femelle (brun tacheté de fauve et de noir). C'est le plus grand des canards de l'hémisphère nord (Bellrose 1980). Cet oiseau migrateur bénéficie d'une longue espérance de vie qui peut atteindre une vingtaine d'année (Korschgen 1977). L'eider est un excellent plongeur qui se nourrit principalement de mollusques bivalves (*Mytilus ssp.*), de crustacés et autres invertébrés marins qu'il peut aller chercher jusqu'à 20 mètres de profondeur.

Notre étude a porté sur la sous espèce *S. m. borealis*. Son aire de nidification englobe les îles de l'archipel canadien, le long du Groenland, de l'Islande, vers l'est des côtes scandinaves, au Spitsberg et à la Terre François-Joseph. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à une population qui nidifie dans l'archipel du Svalbard (78°55'N, 20°07' E).

1.1. Hivernage et retour sur les zones de nidification

Les zones d'hivernage de *S. m. borealis* sont mal définies et s'étendent entre les côtes scandinaves et l'Ecosse. Pendant cette période d'octobre à avril, les eiders se rassemblent en larges colonies. En avril, de petits groupes comprenant plusieurs couples se forment en vue de la préparation à la période de reproduction. A la mi-avril, les eiders sont de retour aux alentours du Spitsberg (figure 4). La femelle augmente alors sa prise alimentaire et accumule une grande quantité de lipides de réserve (Gorman et Milne 1971). La masse corporelle des femelles commence à augmenter. De 2,1 kg en avril, elle atteint son maximum (2,5-2,8 kg)



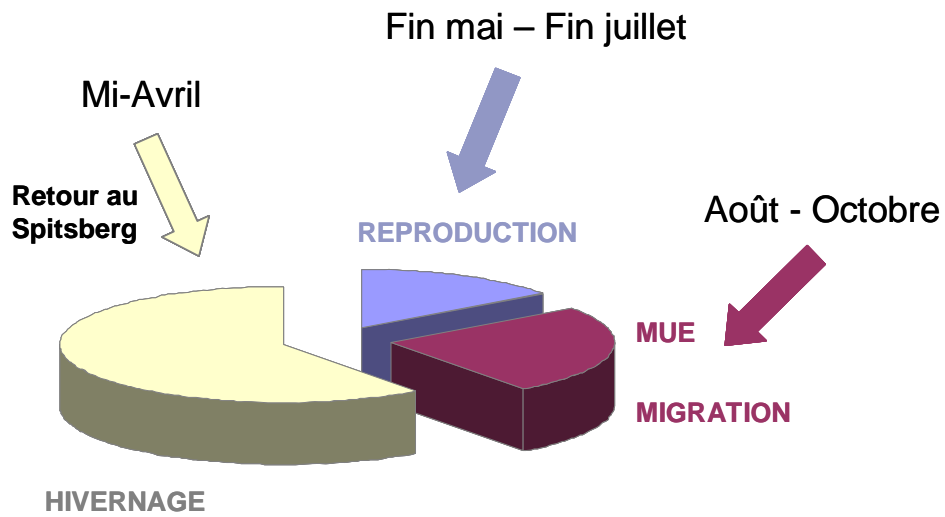


Figure 4. Cycle annuel de l'Eider à duvet (*Somateria mollissima*) nichant au Spitsberg.

fin mai début juin, c'est à dire juste avant la ponte (Korschgen 1977; Parker et Holm 1990). Cette prise de masse est favorisée par le comportement du mâle qui défend activement la zone de nourrissage de sa partenaire puis à l'intérieur de la colonie d'adultes jusqu'à son départ (Milne 1976). Les organes digestifs de la femelle subissent une hypertrophie, probablement liée à la période d'hyperphagie (Gorman et Milne 1971), qui aboutit à une hyperlipogénèse (King et Farmer 1965). La prise alimentaire des femelles atteint alors le double de celle des mâles (Gorman et Milne 1971). Pendant cette période, les femelles entreprennent des aller-retours journaliers jusqu'aux zones de nidifications (îles à l'intérieur des fjords) pour vérifier l'avancée de la fonte des glaces. De cette façon, leur condition corporelle peut être maintenue jusqu'à l'apparition des conditions environnementales optimales (libération des îles de la banquise) permettant l'initiation de la ponte (Parker et Holm 1990). En effet, la disparition de la banquise protège les sites des prédateurs terrestres tel que le renard arctique (*Alopex lagopus* ; Melhum 1991).

1.2. La période de reproduction

La période de reproduction s'étend de fin mai à fin juillet. Les eiders nichent à terre, à même la toundra en bordure de mer ou à proximité d'une étendue d'eau douce. Les lieux privilégiés pour la nidification sont de petites îles à l'intérieur des fjords, situation rencontrée sur notre lieu d'étude au Spitsberg.

Les femelles d'eider cessent de s'alimenter dès le début de la ponte (Korschgen 1977). Elles puisent alors directement dans leurs réserves corporelles pour pondre leurs œufs. La taille moyenne de la ponte est de 3,5 œufs (de 1 à 6 œufs) mais est susceptible de varier pour la population entière selon les années (observation personnelle). L'eider est un oiseau avec un nombre d'œufs prédéterminés égal au nombre de follicules développés. Ainsi, la femelle ne peut pas produire d'œufs supplémentaires en cas de destruction du nid. Elle a par contre la possibilité de résorber ses follicules (Erikstad et Bustnes 1994). Elle a enfin tendance à alterner cycliquement des tailles de couvée importantes puis plus faibles puis nulles (Yoccoz *et al.* 2002). En effet, il semble que les femelles s'abstiennent de se reproduire tous les trois ou quatre ans afin de reconstituer leurs réserves et d'améliorer leur condition corporelle (Yoccoz *et al.* 2002).



Au début de l'incubation, mâles et femelles restent ensemble, le rôle du mâle se limitant alors à la défense de sa partenaire contre les autres mâles mais aussi face à certains prédateurs (Ferens 1962). Après environ une semaine d'incubation, les mâles quittent la zone de reproduction pour se rassembler en mer et entamer leur mue post-nuptiale (Isaken et Baken 1995). La masse approximative des femelles au début de l'incubation est de 1,6 à 2,0 kg et diminue de 30 à 45 % durant les 24-26 jours d'incubation (Korschgen 1977 ; Gabrielsen *et al.* 1991) pour atteindre une masse limite de fin d'incubation de 1,1 kg en moyenne. La femelle s'absente peu pendant la durée de l'incubation, le taux de présence au nid pouvant atteindre 99,86 % (Mehlum 1991b ; Criscuolo *et al.* 2000). Un tel comportement ne semble pas devoir permettre l'alimentation de l'animal pendant ses courtes pauses (Swennen *et al.* 1993) qui semblent être dévolues à consommer de l'eau douce (Criscuolo *et al.* 2000).

Une perte de masse trop importante provoquée par une insuffisance des réserves corporelles ou due à une dépense énergétique trop élevée peut mener à l'abandon de la nichée ou à un affaiblissement critique de la femelle. L'abandon de la couvée est d'autant plus probable que la taille de couvée initiale est faible (Bourgeon *et al.* 2006). De plus, les femelles sont davantage susceptibles d'abandonner spontanément ou consécutivement à une prédation partielle leur couvée pendant le premier tiers de l'incubation que plus tard (Bourgeon *et al.* 2006). Le taux de mortalité des femelles adultes pendant les deux mois de la période de reproduction représente 50 % du taux annuel (Korschgen 1977).

L'élevage des poussins s'effectue selon un système original : la crèche. Les canetons de différentes nichées, capables de se nourrir et de se déplacer peu après l'éclosion, se retrouvent sous la garde d'un turn-over constant de femelles pendant 9 à 10 semaines (Gorman et Milne 1971 ; Bustnes et Erikstad 1991). La décision de confier ses canetons à la garde d'autres femelles semble dépendre de la masse de la femelle à l'éclosion ainsi que du nombre de jeunes produits (Bustnes et Erikstad 1991). Les zones de nourrissage des jeunes et des adultes étant souvent séparées, ce système fournit aux femelles en mauvaise condition corporelle l'opportunité de se soustraire aux contraintes énergétiques de l'élevage des jeunes, de se nourrir normalement pour retrouver la masse corporelle d'avant la reproduction (Milne 1976), mais aussi de limiter leur infestation par des parasites intestinaux qui semblent affecter négativement leur condition corporelle (Warelius 1993). En effet, les femelles qui élèvent les jeunes doivent alors se nourrir dans des zones d'eaux peu profondes où leur alimentation est biaisée en faveur de crustacés qui sont les hôtes intermédiaires d'acanthocéphales (parasites intestinaux) (Ost et Kilpi 1999).



1.3. Mue et migration hivernale

La période de mue fait suite à celle de la reproduction et s'étend d'août à octobre. A cette date, la plupart des oiseaux ont complété leur mue et déposé des lipides sous-cutanés en prévision de la migration. La mue provoque la perte simultanée des rémiges primaires ce qui rend les oiseaux incapables de voler jusqu'à l'apparition des nouvelles plumes. Plus tard dans la saison, les femelles accompagnées des jeunes de l'année se rassemblent le long des côtes pour effectuer leur mue pré-migratoire. A la fin de cette période, vers fin août début septembre, les eiders se préparent pour la migration vers le Sud (Isaken et Baken 1995). Bien que certains individus soient sédentaires et passent l'hiver sur le bord du Spitsberg (le long des zones ouvertes de la banquise), l'exode est plus ou moins général à la fin de l'automne. Les premiers migrants sont les mâles adultes, suivis des femelles et des jeunes (Bellrose 1980). Grandement philopatrics, les eiders sont de retour en grande majorité aux mêmes sites de nidification au début du printemps suivant, seules 2,5 % des femelles délocalisent leurs nids (Wakeley et Mendall 1976). Les mouvements d'individus d'une colonie à une autre concernent surtout les jeunes mâles (Swennen 1990).

2- Cycle de vie annuel du manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*)

Le manchot royal est un oiseau marin appartenant à la famille des **Sphéniscidés**. Cette espèce ne présente pas un dimorphisme sexuel très marqué, les mâles ne se différenciant des femelles que par leur plus grande taille (Barrat 1976). Le manchot royal ne se nourrit qu'en mer et plonge régulièrement à une profondeur de 150 à 300 m. Sa forme hydrodynamique lui assure une bonne pénétration dans l'eau tandis que la structure spécifique de son plumage lui assure imperméabilisation et isolation thermique.

Le manchot royal se reproduit sur les îles subantarctiques des océans Indien, Pacifique et Atlantique. Plus de la moitié de la population mondiale se reproduit dans l'Archipel des Crozet perdu au milieu de l'océan Austral, sous les 40èmes rugissants. Cet archipel abrite environ trois millions de manchots royaux. Au sein de cet archipel, notre étude a été menée au sein de la colonie de la Baie du Marin sur l'île de la Possession (46°26' S, 51°52' E) qui compte environ 40 000 couples (Weimerskirch *et al.* 1992).

Le cycle de reproduction du manchot royal s'étend sur 14 mois et sa principale caractéristique est la très longue période d'élevage de son poussin (figure 5). Comme il lui est donc



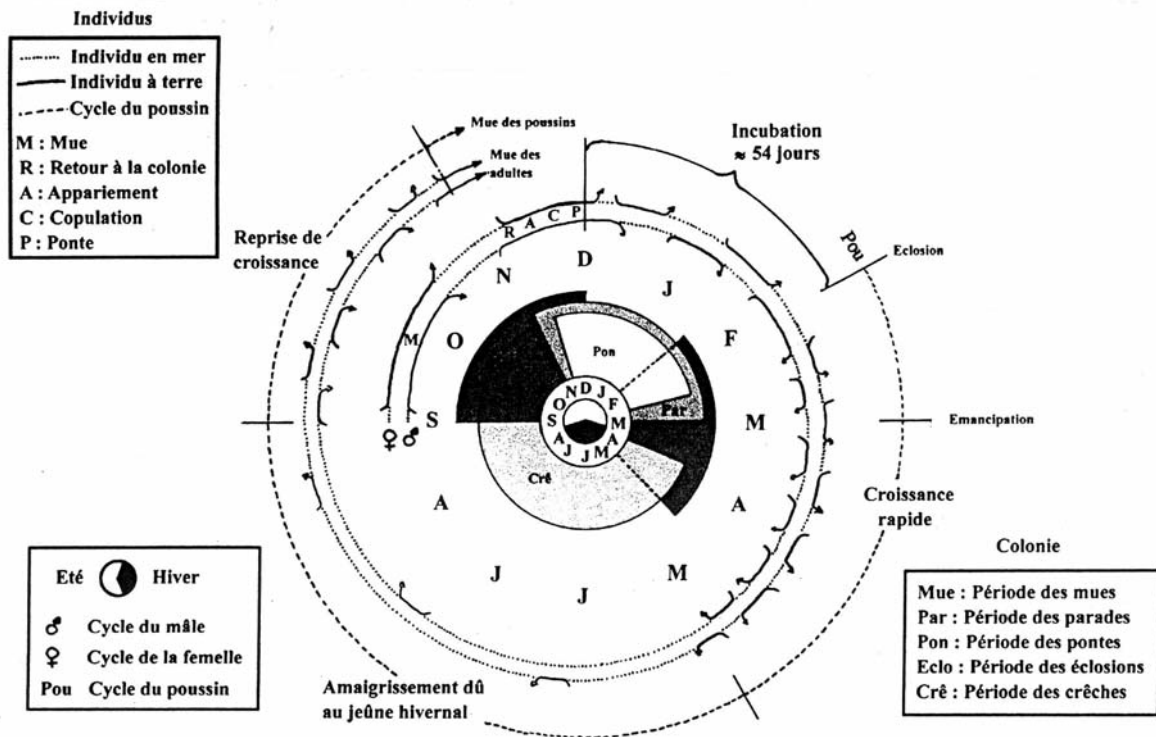


Figure 5. Cycle reproducteur du manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) se reproduisant dans l'Archipel des Crozet.

impossible de se reproduire chaque année, le manchot royal se reproduit généralement 2 fois tous les 3 ans. Comme tous les manchots, l'adulte jeûne régulièrement au cours de la mue et de la reproduction. La période de reproduction est précédée par la mue pré-nuptiale totale qui dure environ quatre semaines, dont trois semaines passées à jeûner à terre (Cherel *et al.* 1988a). La mue est précédée d'un voyage alimentaire en mer pour s'engraisser et n'a pas lieu avant que le jeune de la saison précédente soit émancipé (à l'âge approximatif de 11 mois). Sur la colonie, on peut observer des oiseaux en mue d'Octobre à Janvier. La mue est ensuite suivie d'un voyage alimentaire qui dure environ deux semaines, pendant lesquelles les oiseaux s'engraissent avant de s'engager dans un nouveau cycle de reproduction. La période de reproduction n'est pas synchrone au sein de la colonie de telle sorte que la ponte des œufs couvre une période d'environ quatre mois qui s'étend de la fin du printemps jusqu'au début de l'été (de Novembre à Février ; Weimerskirch *et al.* 1992). A contrario de la majorité des autres manchots, le manchot royal ne fait pas de nid. L'unique œuf pondu est gardé sur les pattes des parents et il est recouvert par un repli de peau de l'abdomen. L'incubation de l'œuf dure en moyenne 53 jours (Stonehouse 1960). Les manchots restent en couple jusqu'à ce que le poussin soit émancipé. Ils s'occupent donc tour à tour de l'œuf puis du jeune. Pendant les 53 jours de couvaison de l'œuf, les parents s'occupent alternativement par périodes de 8 à 18 jours de l'œuf. Le mâle, en particulier, jeûne pendant un bon mois au début du cycle reproducteur entre le moment où il arrive dans la colonie pour parader et la fin du premier relais d'incubation qu'il assure systématiquement et qui dure à lui seul en moyenne 17 jours (Weimerskirch *et al.* 1992). Celui des parents qui ne couve pas part se nourrir au large. Sur la colonie, l'éclosion des jeunes s'étale ainsi de début janvier pour les reproducteurs les plus précoces à début avril pour les plus tardifs.

3- Adaptations physiologiques au jeûne

Le jeûne est défini comme une période de déficit énergétique. Lors de l'entrée en jeûne, des ajustements métaboliques se mettent en place pour permettre aux organismes de maintenir une homéostasie énergétique jusqu'à la période de réalimentation. Entre autres, la dépense énergétique est diminuée, notamment via la réduction du métabolisme de base, ceci chez les oiseaux (Le Maho *et al.* 1981 ; Cherel *et al.* 1988b) comme chez les mammifères (Keeseey et Hirvonen 1997). D'autres facteurs participent à la réduction de la dépense énergétique, telle que la réduction de la température corporelle (Westerterp 1977 ; Le Maho *et al.* 1981), la



diminution de l'activité locomotrice (Underwood *et al.* 1999), une augmentation des périodes de sommeil (Dewasmes *et al.* 1984 ; 1989) ou encore des épisodes de torpeur nocturne (Hohtola *et al.* 1991 ; Calder 1994).

3.1. Mobilisation des réserves énergétiques

Chez les oiseaux et chez les mammifères, l'énergie est stockée sous trois formes principales : le glycogène (mobilisé pendant les premières heures du jeûne), les triglycérides (forme biochimique privilégiée de stockage des réserves) et les protéines (majoritairement musculaires qui constituent une source potentielle d'énergie en plus de leurs rôle fonctionnel et/ou structural). Les triglycérides apparaissent donc comme la forme de réserve énergétique essentielle de l'organisme. Lors d'un jeûne prolongé, l'étude de l'évolution de la masse corporelle et de la vitesse d'amaigrissement a permis de caractériser trois phases distinctes chez les oiseaux (Le Maho *et al.* 1976 ; 1981 ; 1988) (figure 6).

3.1.1. Phase I du jeûne

La phase I est une période d'adaptation de l'organisme aux contraintes du jeûne pendant laquelle la vitesse d'amaigrissement diminue. Elle se traduit par un épuisement des réserves en glycogène (Cherel *et al.* 1992), une diminution de la glycémie, une excrétion azotée élevée et une mobilisation progressive des réserves lipidiques (Le Maho *et al.* 1981 ; Cherel *et al.* 1988b).

3.1.2. Phase II du jeûne

La phase II est marquée par une vitesse d'amaigrissement faible et stable. Elle est caractérisée par une épargne des protéines corporelles et une utilisation préférentielle des réserves lipidiques (Robin *et al.* 1988 ; Cherel *et al.* 1994a). Néanmoins, une contribution incompressible des protéines (environ 5 %) à la dépense énergétique globale est liée aux besoins énergétiques des tissus gluco-dépendants (Cahill 1976 ; Cherel et Groscolas 1998). La lipolyse du tissu adipeux blanc aboutit à une concentration plasmatique en acides gras libres élevée (Cherel et Le Maho 1985). Ces acides gras fournissent directement l'énergie nécessaire



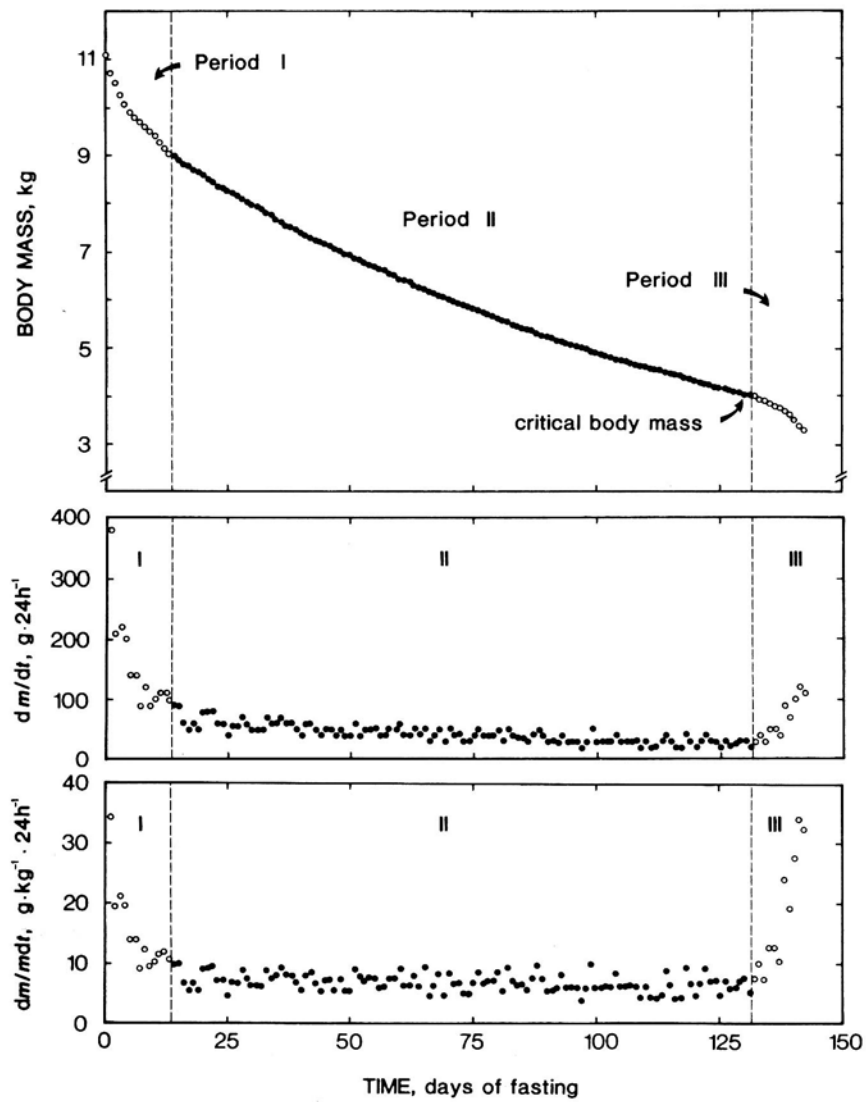


Figure 6. Masse corporelle, perte de masse journalière (dm/dt) et vitesse d'amaigrissement spécifique (dm/mdt) au cours des phases I, II et III du jeûne prolongé spontané chez le poussin de manchot royal. D'après Cherel et Le Maho (1985).

au fonctionnement général de l'organisme et, via la cétogenèse hépatique, aux tissus gluco-dépendants (cerveau, cellules sanguines, ...). En conséquence de l'épargne protéique, la concentration plasmatique en acide urique et l'excrétion azotée restent faibles pendant toute la durée de la phase II (Le Maho *et al.* 1981). La durée de cette phase ainsi que l'importance relative de la contribution protéique à la dépense énergétique de l'organisme, semblent dépendre de l'adiposité initiale de l'animal. En effet, l'utilisation des protéines est d'autant plus faible et la durée de la phase II d'autant plus longue que l'adiposité initiale est élevée (Cherel et Groscolas 1998).

3.1.3. Phase III du jeûne

La phase III est la phase critique du jeûne prolongé définie par une augmentation de la vitesse d'amaigrissement. Elle est caractérisée par une augmentation de la contribution protéique à la dépense énergétique globale (Le Maho *et al.* 1981) et par une diminution de celle des lipides bien que les réserves lipidiques ne soient pas encore épuisées (Cherel *et al.* 1994a ; Robin *et al.* 1988). Bien que souvent réversible, cette phase est considérée comme critique car les protéines assurent d'autres rôles physiologiques importants (enzymatiques, hormonaux, ...) en sus de celui de réserve énergétique.

3.2. Modifications hormonales

Le début du jeûne est marqué par des modifications hormonales et une succession chronologique d'adaptations métaboliques qui permettent une mobilisation séquentielle des réserves corporelles à travers une modulation du métabolisme lipidique et protéique. Au cours des premiers jours de jeûne, la diminution des taux de thyroxine, de corticostérone et d'insuline et l'augmentation progressive du taux de glucagon favorisent la diminution du métabolisme de base, la mise en place de l'épargne protéique ainsi que la mobilisation progressive des réserves lipidiques (Cherel *et al.* 1988b ; Le Ninan *et al.* 1988a). La corticostéronémie et la glucagonémie restent faibles au cours de la phase II, alors qu'elles atteignent leur niveau le plus élevé au cours de la phase III (Cherel *et al.* 1988b ; Le Ninan *et al.* 1988b). Une forte glucagonémie a des effets hyperglycémiantes et lipolytiques chez les oiseaux. La corticostérone apparaît comme le facteur principal impliqué dans l'augmentation



de la mobilisation protéique (Cherel *et al.* 1988b) et de l'activité locomotrice en phase III (Challet *et al.* 1995).

4- Jeûne spontané

De nombreuses espèces animales jeûnent spontanément au cours de leur cycle annuel, soit parce que les ressources de l'environnement sont réduites (conditions environnementales défavorables), soit parce qu'il y a incompatibilité entre le fait de s'alimenter et certaines activités (telles que la reproduction, la migration ou encore la mue) alors même que la nourriture est abondante (Mrosovsky et Sherry 1980). Ces périodes d'anorexies saisonnières, grâce à des adaptations physiologiques et comportementales, permettent à l'animal de couvrir des besoins énergétiques en utilisant des réserves endogènes. La reproduction reste l'une des périodes du cycle annuel la plus souvent associée à une anorexie spontanée, en particulier chez les oiseaux chez lesquels l'incubation puis la protection de la couvée imposent la présence quasi constante des parents (Le Maho *et al.* 1976 ; Korschgen 1977; Sherry *et al.* 1980).

4.1. Jeûne de reproduction

Chez les eiders comme chez les manchots, le jeûne de reproduction est caractérisé par une réduction du catabolisme protéique et une réduction de la dépense énergétique (Robin *et al.* 1998) indiquées par une diminution de la concentration plasmatique en acide urique. Chez les deux espèces, les régulations hormonales opérant au cours du jeûne de reproduction sont identiques à celles classiquement décrites au cours d'un jeûne prolongé. Chez les eiders, la perte de masse liée au jeûne de reproduction varie de 30 à 45 % (Parker et Holm 1990). Selon les années, les eiders complètent leur incubation soit en utilisant les lipides comme ressource énergétique principale (phase II du jeûne) soit en dégradant les protéines (phase III) (Hollmén *et al.* 2001). Chez les manchots, le jeûne de reproduction occasionne une perte de masse de 30 à 35 % (Cherel *et al.* 1994a) mais occasionne rarement l'entrée en phase III qui induit l'abandon de l'œuf (Groscolas et Robin 2001).



4.2. Jeûne de mue

Bien que les manchots soient adaptés à de longues périodes de jeûne, le jeûne de mue est potentiellement un événement stressant à l'issue duquel ils sont confrontés à une condition énergétique critique (Cherel *et al.* 1994b ; Gauthier-Clerc *et al.* 2002 ; Green *et al.* 2004). En effet, les manchots peuvent alors perdre jusqu'à 45 % de leur masse (Cherel *et al.* 1994a). Contrairement au jeûne de reproduction, le jeûne de mue est associé à une augmentation de la dépense énergétique et à un catabolisme protéique intense afin de fournir les acides aminés nécessaires à la synthèse des nouvelles plumes (Groscolas et Cherel 1992 ; Cherel *et al.* 1994a). Cette mobilisation massive des protéines pendant la mue est notamment reflétée par le maintien des taux d'acide urique plasmatiques à des niveaux assez élevés. Alors qu'une déplétion de 30 à 50 % des protéines corporelles est généralement considérée comme létale chez les oiseaux et les mammifères, les manchots peuvent supporter une déplétion protéique de 60 à 70 % (Groscolas et Cherel 1992).

Du point de vue endocrine, la comparaison du jeûne de reproduction avec le jeûne de mue du manchot royal montre qu'il n'existe pas de différences au niveau des hormones pancréatiques et corticosurréaliennes ni de la T_3 . Au contraire, la concentration plasmatique de la T_4 est cinq fois plus élevée pendant la période de synthèse du nouveau plumage que pendant la phase II du jeûne de reproduction. Quand la synthèse des plumes est terminée, la thyroïdémie diminue alors pour atteindre rapidement une valeur proche de celle trouvée chez les manchots lors du jeûne de reproduction (Groscolas et Cherel 1992), ce qui suggère un contrôle de la mue par la T_4 circulante.

5- Problématique et questions posées

Nous avons précédemment illustré dans notre revue bibliographique les compromis réalisés par les organismes entre l'immunocompétence et l'effort reproducteur afin de maximiser leur fitness. Globalement, les différents travaux s'accordent à confirmer l'hypothèse d'une dépression immunitaire au cours de l'effort reproducteur. Néanmoins, la diversité des techniques de mesure de l'immunocompétence utilisées, les limitations méthodologiques imputables à la complexité du système immunitaire aboutissent à des résultats peu comparables voire parfois contradictoires. Ainsi plusieurs questions restent encore en suspens. Entre autres, les causes ultimes et proximales d'un tel phénomène restent non élucidées. De



plus, la validité de certains résultats reste sujette à caution. De nombreux travaux négligent en effet l'impact potentiel sur la mesure de l'immunocompétence de facteurs confondants tels que le phénomène d'immunoredistribution (qui souligne la nécessité de mesurer simultanément toutes les composantes immunitaires), l'hypothèse d'augmentation de la prise alimentaire (qui suppose le contrôle du gain d'énergie des individus), ou encore le chevauchement de la mue et de la reproduction. Dans ce contexte, notre travail s'est tout d'abord employé à examiner l'effet d'un investissement reproducteur donné sur les trois composantes (composantes cellulaire et humorale de l'immunité acquise et composante innée) du système immunitaire de femelles d'eider à duvet (*Somateria mollissima*) nichant dans le Haut-Arctique (figure 7). L'étude s'est également intéressée aux mécanismes aussi bien ultimes que proximaux du compromis observé entre la reproduction et l'immunocompétence. La femelle d'eider à duvet représente à plusieurs titres un modèle biologique original et tout à fait adapté à la problématique. Tout d'abord, ces oiseaux nidifuges (les jeunes quittent le nid immédiatement après l'éclosion) pondent et incubent de un à six œufs. Cette variation inter individuelle de leur taille de couvée permet de mesurer l'effet d'un investissement reproducteur plus ou moins important sur leur immunocompétence. Enfin, puisqu'elles jeûnent de façon totale pendant toute la durée de l'incubation (qui dure de 24 à 26 jours), elles ne peuvent ainsi pas compenser une diminution éventuelle de leur immunocompétence par une augmentation de leur prise alimentaire. Cette espèce permet ainsi d'examiner comment les ressources investies dans un effort reproducteur donné pourraient être détournées du système immunitaire. Enfin, afin de discriminer les effets du jeûne de ceux de l'effort reproducteur sur l'immunité, nous avons cherché à comparer les effets de deux types de jeûnes métaboliquement différents (jeûne de reproduction versus jeûne de mue) sur l'immunocompétence. Or, les eiders, qui ne jeûnent pas pendant la mue, ne permettent pas une telle comparaison intraspécifique. Les manchots royaux (*Aptenodytes patagonicus*) de la région subantarctique se nourrissent exclusivement en mer et sont ainsi contraints de rester à terre et de jeûner pendant d'assez longues périodes au cours de la reproduction (Stonehouse 1960 ; Groscolas et Robin 2001) et également au cours de la mue (Cherel *et al.* 1994a) alors que leur isolation thermique est compromise (Groscolas et Cherel 1992). Les manchots représentent ainsi un modèle propice à une telle étude (figure 8). De plus, chez les manchots comme chez les eiders, leur mue et l'événement de reproduction ne se chevauchent pas mais se succèdent (Stonehouse 1960 ; Gauthier-Clerc *et al.* 2002).



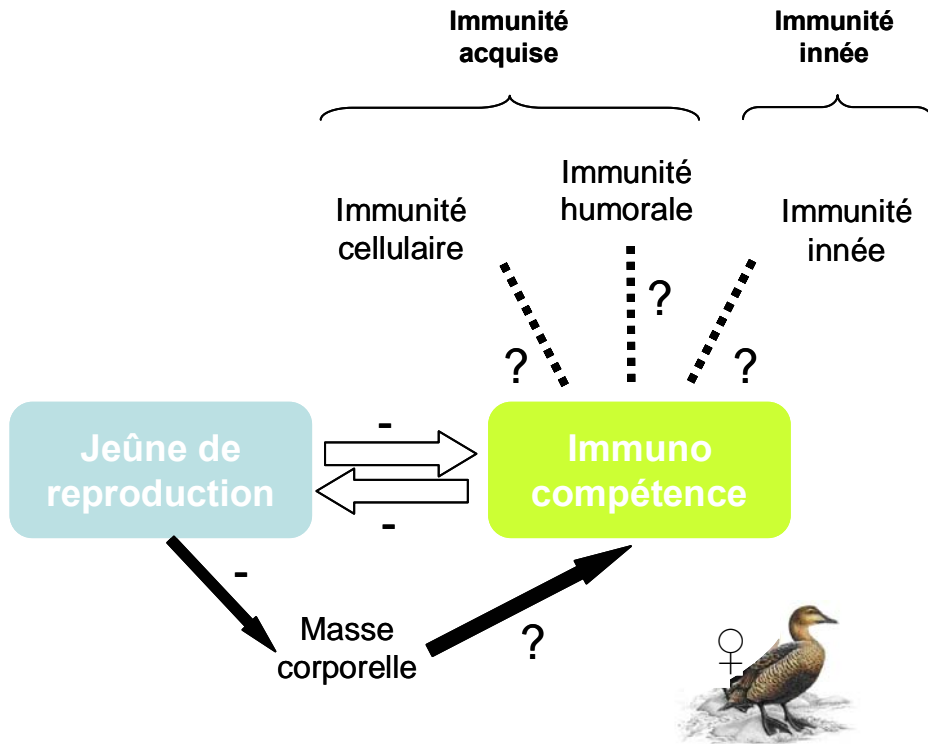


Figure 7. Compromis entre l'effort reproducteur (jeûne d'incubation) et les trois composantes (composantes cellulaire et humorale de l'immunité acquise et composante innée) du système immunitaire chez les femelles d'eider à duvet (*Somateria mollissima*). Notre travail s'est par ailleurs intéressé aux mécanismes ultimes et proximaux du compromis observé entre l'effort reproducteur et l'immunocompétence.

Les questions suivantes seront ainsi abordées dans ce travail de thèse :

1. *Quels sont les effets de la taille de couvée initiale et du temps passé à incuber sur l'immunocompétence des femelles d'eider à duvet au cours du jeûne d'incubation ? Ces effets sont-ils les mêmes pour les deux composantes acquises et la composante innée ?*

Pour ce faire, nous avons évalué l'évolution des trois composantes immunitaires en fonction de la taille de couvée initiale et de l'avancement dans le jeûne chez des femelles sauvages incubant des couvées de taille naturellement hétérogène.

2. *Quelles sont les causes ultimes de l'immunosuppression observée au cours du jeûne d'incubation chez les femelles d'eider à duvet ?*

Nous avons alors cherché à tester les deux hypothèses fonctionnelles (évitement de pathologies auto-immunes et allocation optimale des ressources) par la mesure de protéines de stress et par des manipulations hormonales, respectivement.

3. *Quelles sont les causes proximales sous-tendant l'immunosuppression au cours du jeûne d'incubation chez les femelles d'eider à duvet et les mâles de manchot royal ?*

A cet effet, nous avons vérifié les effets immunomodulateurs de la corticostérone chez les femelles d'eider à duvet en confrontant tout d'abord les taux basaux de corticostérone à la mesure de leur immunocompétence. Nous avons ensuite expérimentalement manipulé les concentrations plasmatiques en corticostérone chez les femelles d'eider au cours de l'incubation et mesuré les effets d'un tel traitement sur leur immunocompétence. Les mâles d'eider n'assurant pas l'incubation, nous avons par ailleurs évalué les effets de la testostérone sur le système immunitaire de mâles de manchot royal au cours du jeûne d'incubation.

4. *Quelle est l'importance relative du jeûne stricto sensu et de l'effort reproducteur sur l'immunocompétence des mâles de manchot royal ?*

Afin de tenter de discriminer les effets du jeûne *stricto sensu* de ceux de l'effort reproducteur sur l'immunocompétence, nous avons comparé les effets sur l'immunité de deux jeûnes métaboliquement distincts par les besoins nutritionnels qu'ils impliquent (jeûne de reproduction versus jeûne de mue). Pour ce faire, nous avons utilisé des manchots royaux dont les contraintes biologiques les obligent à jeûner à terre pendant la reproduction et la mue.



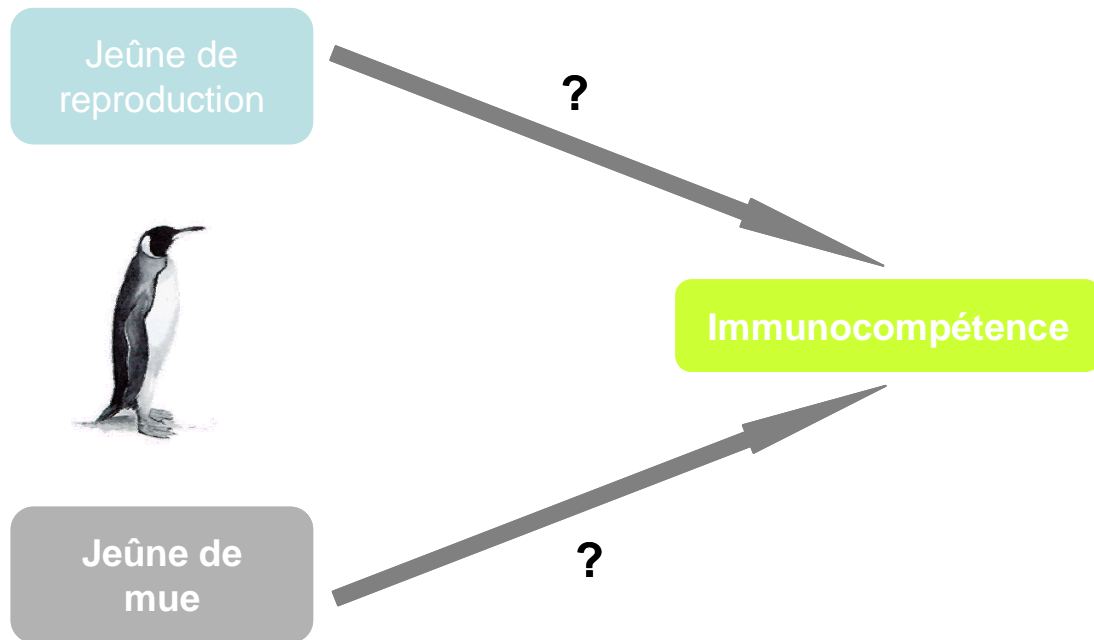


Figure 8. Effets respectifs des jeûnes de reproduction et de mue sur l'immunocompétence de mâles de manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*).

C- Matériel & Méthodes



C- MATÉRIEL & MÉTHODES

1- Sites d'étude

Les données présentées sur les femelles d'eider à duvet ont été collectées au cours de trois saisons de reproduction successives (étés 2003, 2004 et 2005) sur le territoire norvégien de l'**archipel du Svalbard** situé entre 74° et 81° de latitude nord et entre 10° et 34° de longitude est. Nous avons travaillé sur la côte ouest du Spitsberg, dans le Kongsfjord (78°55'N, 20°07'E). La station scientifique est basée à l'intérieur du fjord, dans la ville de Ny-Ålesund. Le soutien logistique indispensable au bon déroulement de nos campagnes de terrain nous a été apporté par l'Institut Polaire Français Paul-Emile Victor (IPEV). Nos expérimentations ont obtenu l'aval de trois autorités successives : l'autorité norvégienne de recherche sur les animaux (NARA), l'autorité du Gouverneur du Svalbard et le comité d'éthique de l'IPEV. Les données exploitées sur les manchots ont été collectées par Vanessa M. Viera et René Groscolas dans les Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF), sur l'**archipel des Crozet** (46°26'S, 51°52'E) dans le cadre du programme 119 « Econergie » (IPEV).

2- Collecte des données sur les femelles d'eider à duvet

A l'intérieur du fjord, nos études ont été alternativement menées sur deux îles : **Prins Heinrich** et **Storholmen**, qui sont des sanctuaires d'oiseaux protégés (figure 9). Ces deux îles sont facilement accessibles par bateau depuis la station. Nos expérimentations ont principalement eu lieu sur Storholmen qui est située plus au fond du fjord avec une superficie supérieure d'environ 0,60 km². Cette île abrite de 900 à 1500 couples. Prins Heinrich présente une superficie d'environ 0,12 km². En fonction des années, cette île abrite entre 100 et 150 couples. Pendant la période de reproduction, le jour est permanent et la température ambiante varie de 2 à 10°C.

2.1. Suivi des femelles sauvages

Dès la ponte des premiers œufs, nous avons procédé au **marquage des nids** au moyen de bâtons de bois colorés et numérotés avec des chiffres assez gros facilement visibles de loin



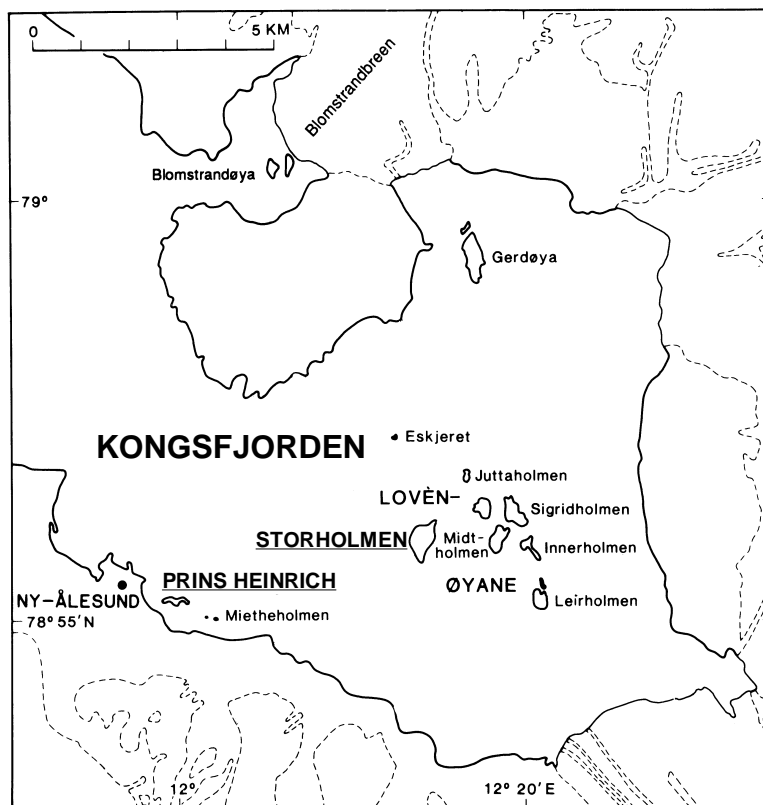
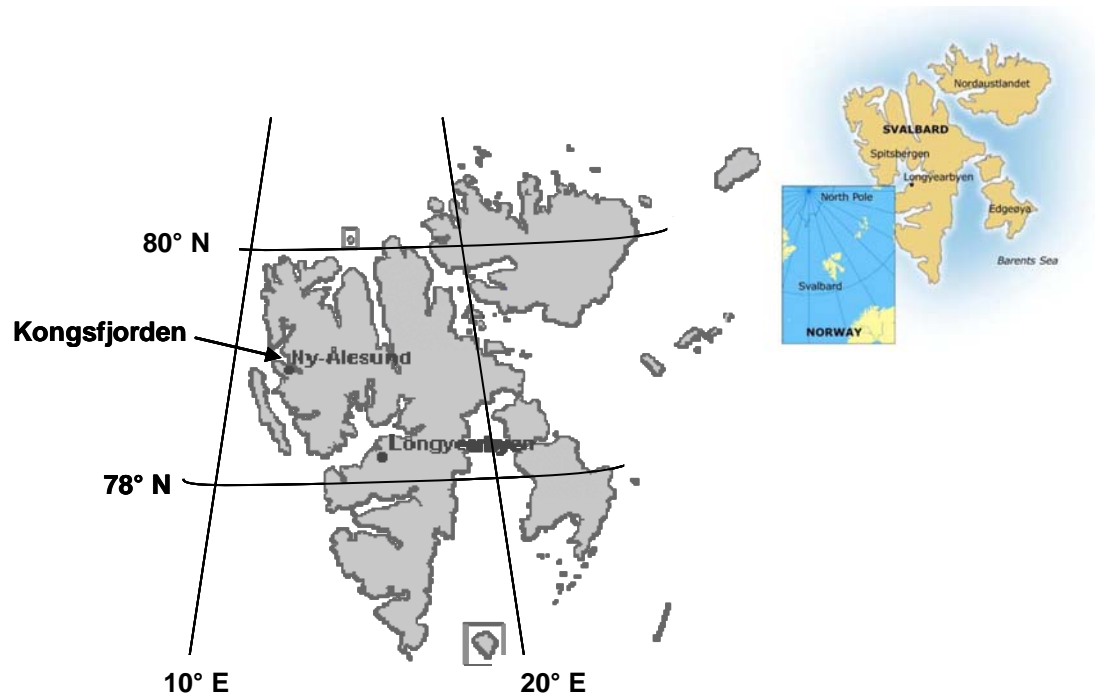


Figure 9. Situation géographique du site d'étude. Les îles Prins Heinrich et Storholmen sont situées dans le Kongsfjorden, Spitsberg, Archipel du Svalbard (78°55'N, 20°07'E).

aux jumelles afin de limiter le dérangement au sein de la colonie. Nous avons ensuite suivi l'évolution des tailles de couvées au minimum tous les deux jours afin de déterminer la taille de couvée initiale de chaque femelle et le taux de prédation éventuel. Etant donné que les femelles pondent un oeuf par jour (Watson *et al.* 1993), une couvée est considérée comme complète lorsque aucun œuf n'est pondu dans un intervalle de deux jours (Yoccoz *et al.* 2002). En fonction des années, les femelles initient la ponte entre le 13 et le 25 juin. Afin d'éviter au maximum les risques initiaux d'abandon du nid (Korschgen 1977), les premières femelles ont été capturées après avoir incubé pendant au moins cinq jours.

2.2. Manipulation des femelles sauvages

Les femelles sont **capturées sur leur nid avec une canne à pêche** munie d'un collet en nylon à son extrémité. Immédiatement après la capture (moins de trois minutes après la tentative d'approche de la femelle), une prise de sang est effectuée dans la veine brachiale ou alaire. Pendant ce temps, le deuxième expérimentateur s'occupe de couvrir le nid avec le duvet pour éviter que les œufs se refroidissent en l'absence de la femelle et aussi pour éviter qu'ils soient repérés par les goélands bourgmestre (*Larus hyperboreus*), principaux prédateurs aériens des œufs d'eider. Après avoir effectué la prise de sang, nous procédons aux mesures biométriques de l'aile (avec un mètre flexible) et du tarse (avec un pied à coulisse). Après avoir reçu le traitement correspondant à l'expérimentation en cours, les femelles sont finalement pesées avant d'être relâchées. La contention n'excède jamais dix minutes, à l'issue desquelles les femelles mettent en moyenne cinq minutes à regagner leur nid (observation personnelle). Le sang collecté est conservé pendant quelques heures dans de la neige récupérée sur le site. Le plasma est préparé par centrifugation (10 min à 10000 tpm) puis fractionné avant d'être congelé à -20°C.

2.3. Capture de femelles sauvages et conditions de captivité

L'étude des effets des implants de corticostérone sur l'immunocompétence des femelles (article V) a été menée sur des femelles captives. En effet, il a été préalablement établi que les femelles implantées à la corticostérone sont moins attentives au nid (Criscuolo *et al.* 2005) ce qui augmente la probabilité de prédation des œufs et à terme l'abandon du nid. De plus, la



captivité nous permettait d'augmenter la fréquence des prises de sang favorisant un suivi quotidien de la cinétique des différents métabolites et hormones plasmatiques et de la masse corporelle. Pour ce faire, immédiatement après leur capture sur nid à la canne à pêche, des femelles dont la durée d'incubation et la taille de couvée étaient connues ont été transportées dans une aire aménagée et placées pendant quelques jours dans des cages individuelles (1m x 1m x 1m) à température ambiante. Pendant la durée de leur captivité, les femelles ont reçu de la neige *ad libitum*.

3- Protocoles expérimentaux

Les figures 10 et 11 décrivent les protocoles expérimentaux et les dosages plasmatiques réalisés chez les femelles d'eider à duvet et les mâles de manchot royal.

3.1. Test PHA

Le test PHA sert à évaluer la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Pour ce faire, les femelles reçoivent au niveau du patagium de l'aile droite une injection de 100 µl d'une solution de phytohémagglutinine (PHA ; Sigma L-8754) diluée dans une solution saline (PBS) à une concentration de 5 mg.ml⁻¹. L'aile gauche qui sert de contrôle est injectée de la même quantité de PBS. L'épaisseur de chaque patagium alaire est mesurée avec un comparateur d'épaisseur électronique de marque Mitutoyo (ID-C1012), au moins 3 fois, avant l'injection et 24 heures après l'injection. La réponse à médiation cellulaire est ainsi calculée comme la différence de gonflement (avant et après l'injection) entre l'aile droite injectée au PHA et l'aile gauche servant de contrôle.

3.2. Injection de LPS

L'injection de lipopolysaccharides (LPS) sert à évaluer l'immunité innée. A la capture, les femelles subissent une prise de sang puis reçoivent une injection intra-péritonéale d'une solution de LPS (Sigma L-2630) diluée dans du PBS à une concentration de 0,35 mg.kg⁻¹. Une deuxième prise de sang est effectuée 24 heures après cette injection. Le plasma collecté avant et après l'injection de LPS sert ensuite à doser les taux d'oxyde nitrique (NO)



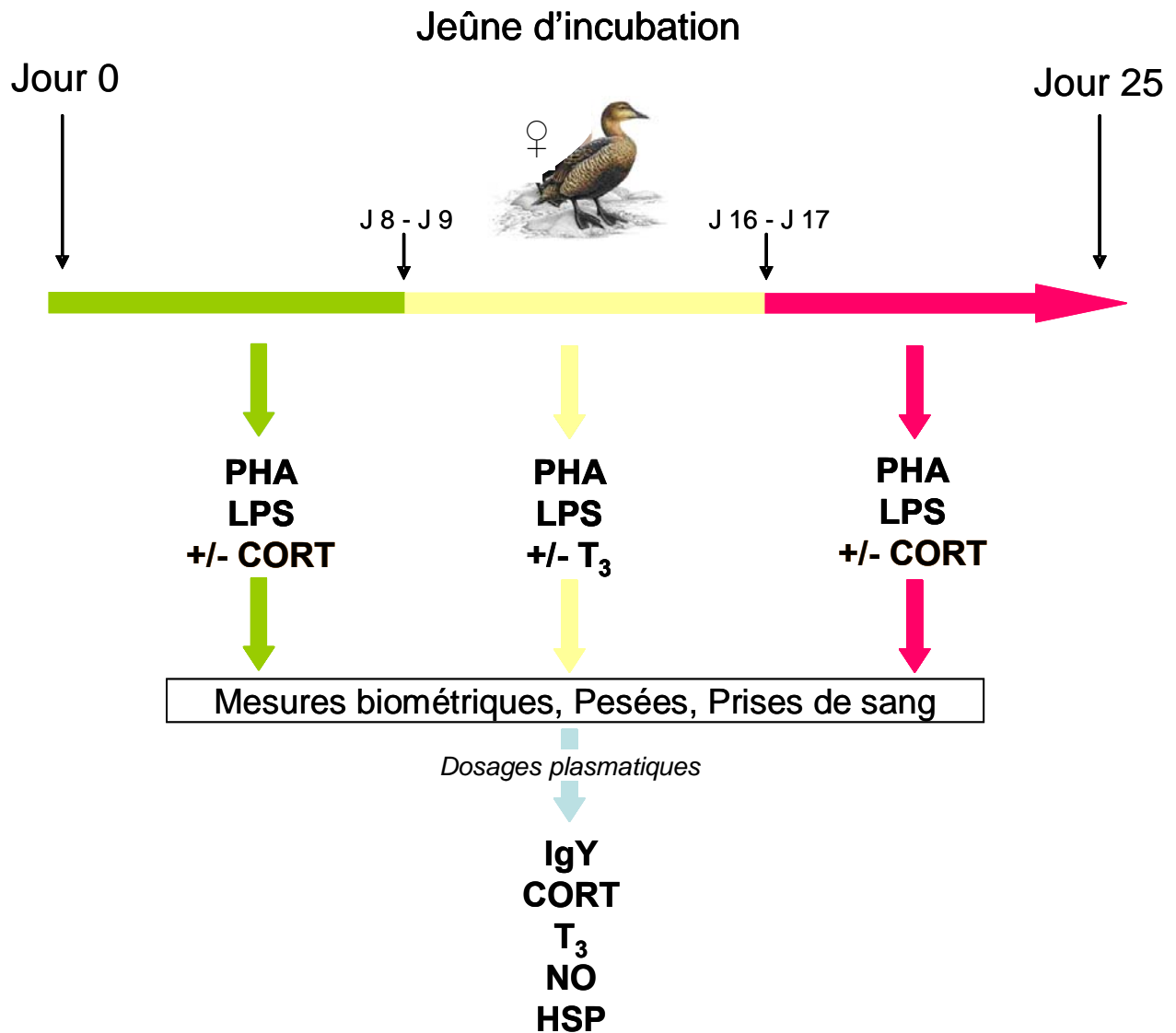


Figure 10. Protocoles expérimentaux et dosages plasmatiques réalisés chez des femelles d'eider à duvet au cours du premier (vert), deuxième (jaune) et dernier tiers (rouge) de leur jeûne d'incubation. Des femelles sauvages et/ou captives ont reçu des injections de phytohémagglutinine (PHA) et de lipopolysaccharides (LPS) et des implants de triiodothyronine (T₃) et de corticostérone (CORT). Les taux plasmatiques d'immunoglobulines Y (IgY), de CORT, de T₃, d'oxyde nitrique (NO) et de protéines de stress (HSP, « heat shock proteins ») ont été dosés par des méthodes enzymatiques, colorimétriques et/ou radioimmunologiques.

plasmatiques. La réponse immunitaire innée est alors calculée comme le pourcentage d'augmentation de la production en NO consécutive à l'injection de LPS. Les dosages plasmatiques de NO ont été réalisés par François Criscuolo au sein de l'unité CNRS-UPR 9078 (Paris V). Se reporter à l'article II pour le détail de ce dosage.

3.3. Implants hormonaux

Des femelles ont reçu des implants de triiodothyronine et de corticostérone, respectivement. Les implants sont issus du commerce (Innovative Research of America ; Sarasota, Floride, USA). Se reporter aux articles IV et V concernant la méthodologie employée pour l'implantation. Les doses retenues pour les expérimentations ont été choisies sur la base de travaux préliminaires effectués sur des femelles d'eider captives implantées avec des doses différentes appliquées plus ou moins longtemps.

4- Exploitation des échantillons au laboratoire

4.1. Evaluation de la condition corporelle

La condition corporelle des femelles a été évaluée par l'indice de condition corporelle défini par MacColl et Hatchwela (2003). Il consiste à diviser la masse corporelle initiale des femelles par la longueur du tarse élevée au cube (**masse initiale/tarse³**). Chez les eiders, la masse initiale correspond à la masse après la ponte des œufs. Elle est extrapolée par la formule suivante: $M_1 = M_0 + (ML \times T)$ (Criscuolo *et al.* 2002). Dans cette formule, M_1 représente la masse initiale, M_0 la masse au moment de la capture, ML la perte de masse journalière et T le nombre de jours écoulés entre le début de l'incubation et le jour de la capture. La perte de masse journalière, évaluée pour une saison donnée, est en moyenne de 23 g par jour (Criscuolo *et al.* 2002).



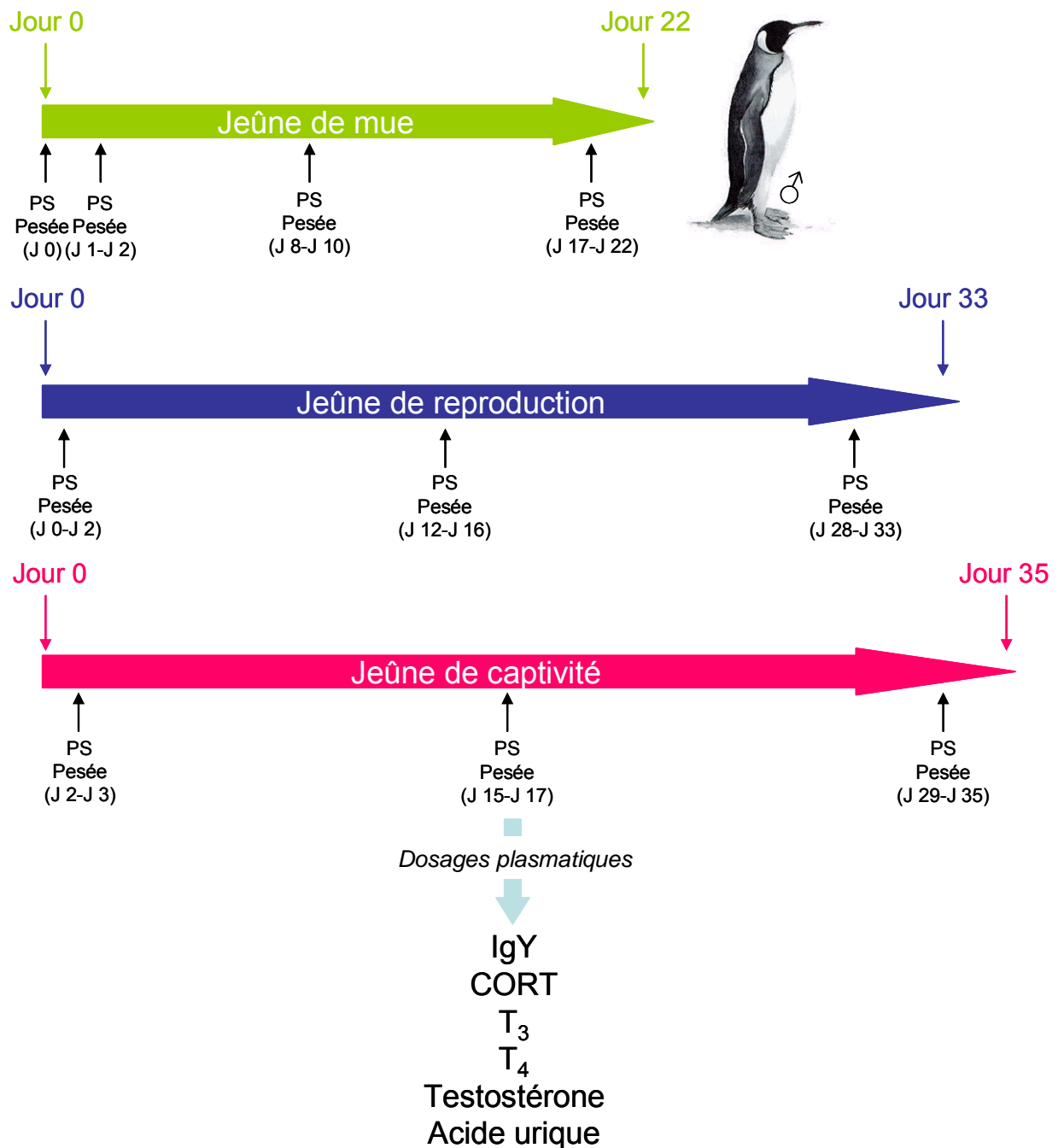


Figure 11. Protocoles expérimentaux et dosages plasmatiques réalisés chez des mâles de manchot royal au cours de leurs jeûnes de mue (vert) et de reproduction (bleu) et au cours d'un jeûne expérimental en captivité (rouge). Des prises de sang (PS) et des pesées ont été effectuées à différents temps. Les taux plasmatiques d'immunoglobulines Y (IgY), de corticostérone (CORT), de triiodothyronine (T₃), de thyroxine (T₄), de testostérone et d'acide urique ont été dosés par des méthodes enzymatiques, colorimétriques et/ou radioimmunologiques.

4.2. Dosage des immunoglobulines

Le dosage des immunoglobulines plasmatiques sert à indiquer l'état de l'**immunité à médiation humorale**. Ce dosage est effectué par un **test ELISA** (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Il ne requiert qu'une faible quantité de plasma et ne nécessite pas l'injection préalable d'un antigène. Le protocole de ce dosage préalablement décrit par Martinez *et al.* (2003) est détaillé dans les articles I, III, IV, V et VI. Son application à nos deux espèces (eiders et manchots) a préalablement nécessité la détermination de la dilution appropriée du plasma. Pour les eiders et les manchots, la dilution du plasma est de 1/32000^e (figure 12).

4.3. Dosages hormonaux (RIA)

Les concentrations plasmatiques de corticostérone, triiodothyronine, thyroxine et testostérone ont été mesurées au sein de notre laboratoire (DEPE, UMR 7178, Strasbourg) par des **dosages radioimmunologiques** (RIA) sur 10 à 100 µl de plasma en utilisant des kits commerciaux (ICN Biomedicals ; Costa Mesa, CA, USA). Les kits de dosage de ces hormones reposent sur le principe de compétition directe entre l'hormone plasmatique (froide) et l'hormone marquée à l'iode 125 radioactive pour leur site de liaison spécifique (anticorps). La radioactivité résiduelle après lavages est inversement proportionnelle à la quantité d'hormones plasmatiques présentes. La concentration d'une hormone donnée est alors déterminée par comparaison avec les valeurs de la gamme étalon indiquée par le fournisseur. La radioactivité est mesurée pendant 5 minutes sur chaque échantillon à l'aide d'un compteur gamma.

4.4. Dosage de l'acide urique

Les concentrations plasmatiques en acide urique (métabolite issu de la dégradation des protéines) ont été déterminées en utilisant une **méthode enzymatique colorimétrique** sur 20 µl de plasma selon les protocoles décrits par les fournisseurs (Sigma-Aldrich ; USA). Cette méthode repose sur la formation d'un produit coloré, l'intensité de la coloration étant proportionnelle à la concentration. Afin de valider le dosage, un étalon est dosé. Les mesures de densité optique sont effectuées à 520 nm.



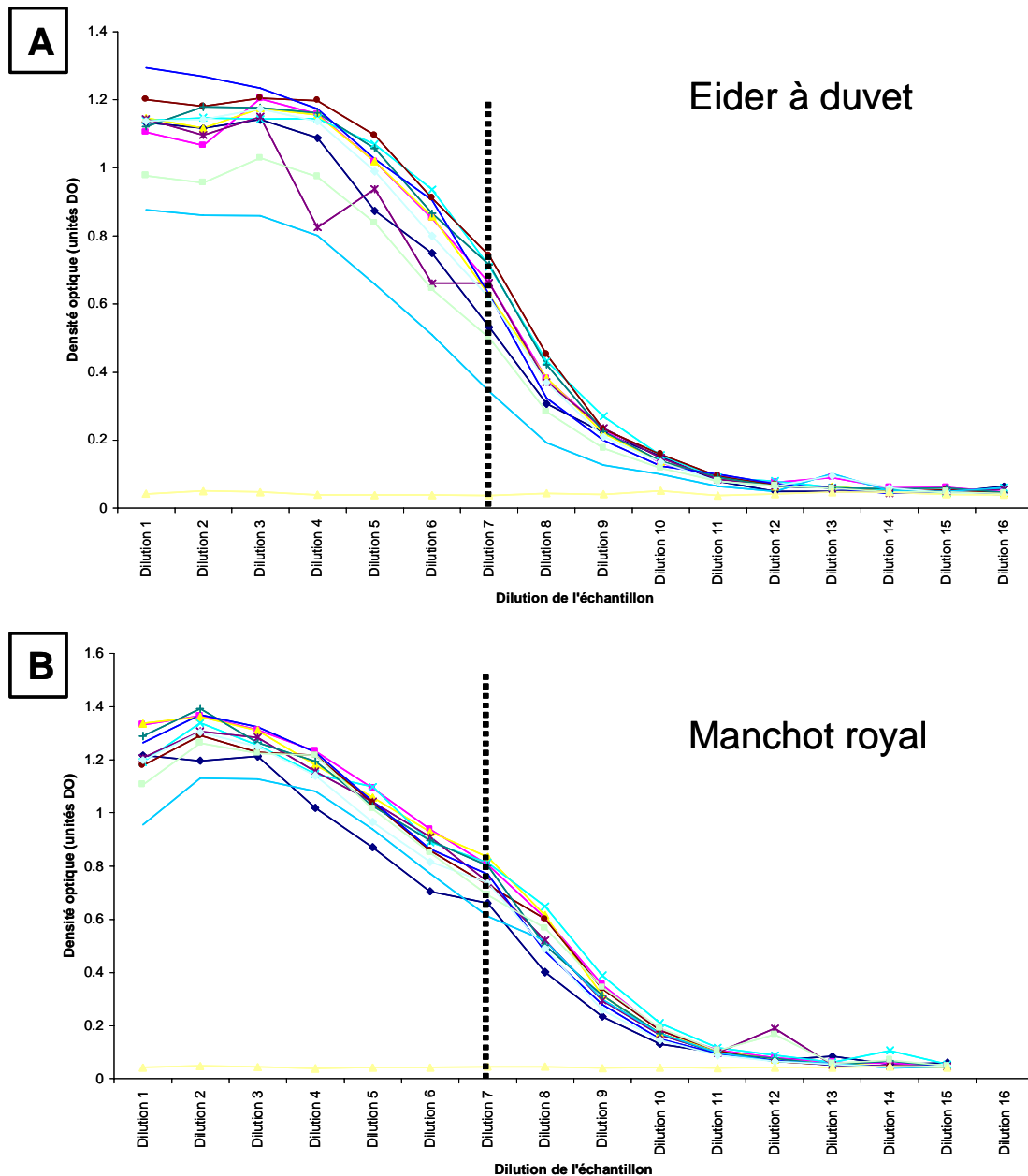


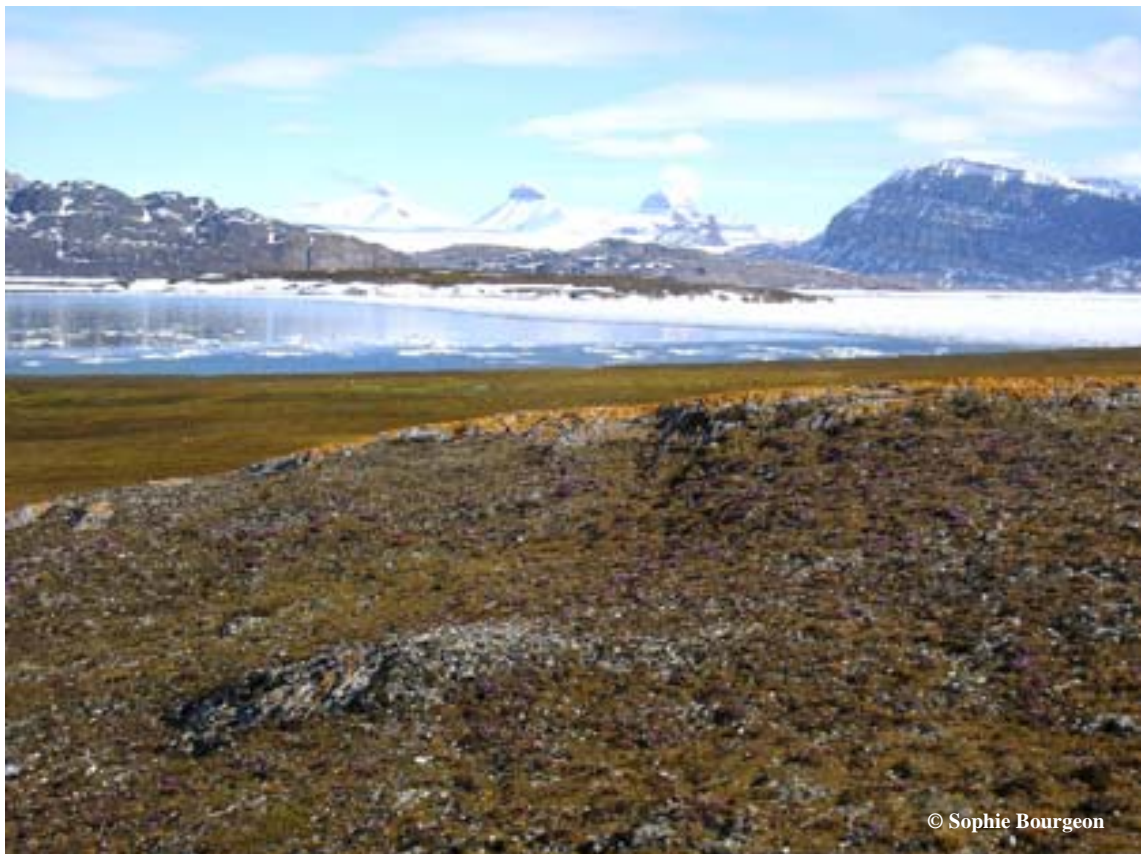
Figure 12. Concentration d'immunoglobulines plasmatiques : courbe d'étalonnage en ELISA. Une gamme de dilution de 11 plasmas d'eider à duvet (A) et de 11 plasmas de manchot royal (B) a été réalisée en effectuant des dilutions en cascade au demi (la dilution 1 correspond à une dilution au $1/500^{\circ}$ du plasma dans un tampon carbonate bicarbonate). La courbe en jaune correspond à un contrôle négatif avec le tampon carbonate bicarbonate. Pour doser les immunoglobulines plasmatiques, la dilution de plasma appropriée doit se situer dans la partie médiane de la courbe d'absorbance. Cette dilution correspond à la dilution 7 (dilution au $1/32000^{\circ}$) chez les deux espèces.

4.5. Dosage des HSP

Le dosage des protéines de stress a été effectué par Javier Martínez au sein du département de microbiologie et de parasitologie (Madrid) par une technique de **Western Blot** sur les globules rouges. Se reporter à l'article III pour le détail de ce dosage.



D- Résultats



D- RESULTATS

1- Le jeûne d'incubation chez la femelle d'eider à duvet

1.1. L'immunité acquise

Nous avons tout d'abord cherché à tester si l'hypothèse d'immunosuppression au cours d'un effort reproducteur est vérifiée chez l'eider à duvet. Partant du postulat que l'immunité innée serait une ligne de défense trop importante pour être diminuée, nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'impact du jeûne d'incubation sur l'immunité acquise. Pour ce faire, nous avons mesuré l'impact du jeûne d'incubation sur les deux composantes de l'immunité acquise de femelles en fonction de leur taille de couvée initiale (article I). Le test intradermique au PHA induit des gonflements plus prononcés au niveau du patagium alaire des femelles en début d'incubation par rapport aux femelles achevant l'incubation (figure 13). De plus, la mesure plasmatique des immunoglobulines est plus élevée chez des femelles échantillonnées au cours de la première moitié de l'incubation que chez des femelles échantillonnées en fin d'incubation (figure 14). Au cours de l'incubation, l'immunité à médiation cellulaire de la femelle d'eider subit une diminution de 40 % contre 25 % pour son immunité à médiation humorale, et cela indépendamment de la taille de couvée initiale. La réponse à médiation cellulaire a néanmoins une tendance plus marquée, bien que non significative, que les taux plasmatiques d'immunoglobulines à être négativement affectée par la taille de couvée. Les femelles avec les tailles de couvée les plus importantes présentent en effet une réponse cellulaire sensiblement plus faible (article I). Nous avons ainsi établi que **les deux composantes de l'immunité acquise sont significativement diminuées à mesure que le jeûne d'incubation progresse**. Il n'a cependant pas été établi de corrélation entre ces deux composantes, **les variations de l'une et l'autre sont donc indépendantes** (figure 15).

Par ailleurs, indépendamment du caractère fonctionnel ou non de la diminution de l'immunité acquise observée au cours du jeûne d'incubation, nous avons voulu tester la relation invoquée entre l'immunosuppression et la corticostéronémie (Deerenberg *et al.* 1997). Nos résultats montrent tout d'abord que la concentration plasmatique en corticostérone ne varie pas au cours de l'incubation. Les variations d'aucune des deux composantes immunitaires acquises ne sont par ailleurs reliées à la corticostéronémie (article I).



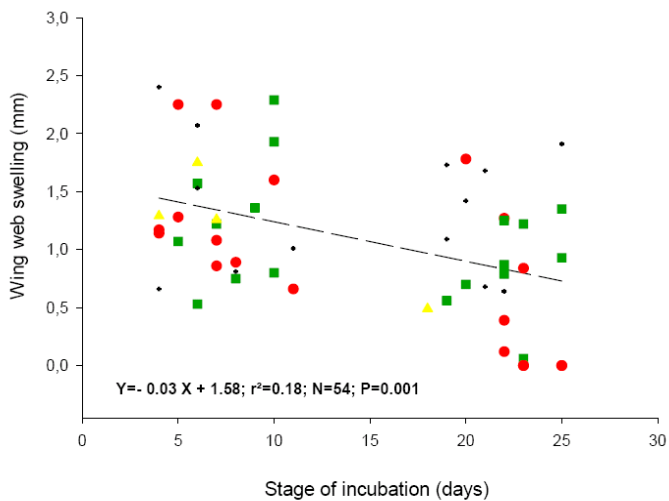


Figure 13. Gonflement alaire en réponse au test PHA 1) au cours de l'incubation et 2) en fonction de la taille de couvée initiale (triangle jaune : un œuf ; carré noir : deux œufs ; carré vert : trois œufs et rond rouge : quatre œufs) de femelles d'eider à duvet sauvages.

Figure 14. Taux plasmatique d'immunoglobulines 1) au cours de l'incubation et 2) en fonction de la taille de couvée initiale (triangle jaune : un œuf ; carré noir : deux œufs ; carré vert : trois œufs et rond rouge : quatre œufs) de femelles d'eider à duvet sauvages.

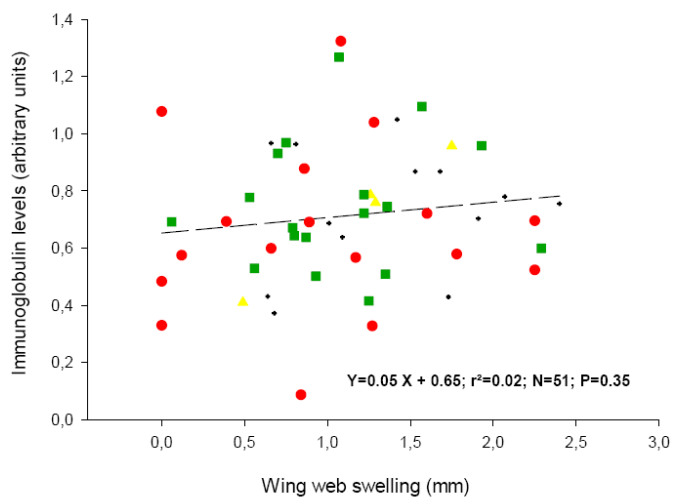
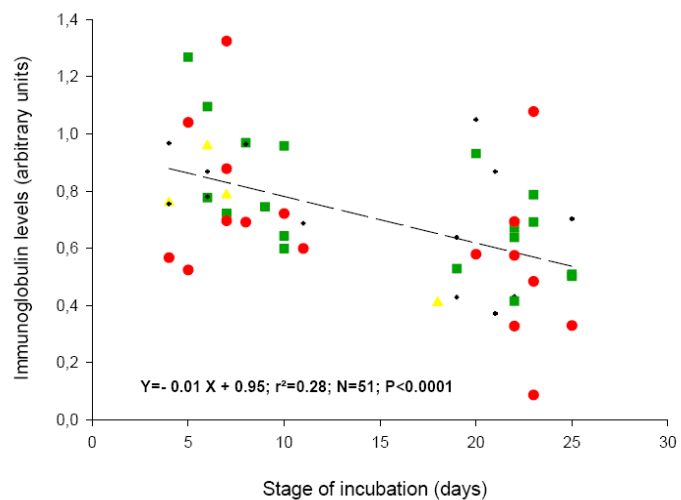


Figure 15. Relation entre le gonflement alaire et le taux plasmatique d'immunoglobulines en fonction de la taille de couvée initiale (triangle jaune : un œuf ; carré noir : deux œufs ; carré vert : trois œufs et rond rouge : quatre œufs) de femelles d'eider à duvet sauvages. Tous les jours d'incubation ont été considérés.

1.2. L'immunité innée

Afin de vérifier le postulat qui propose que l'immunité innée serait une composante immunitaire trop essentielle pour être diminuée en faveur de l'investissement reproducteur, nous avons cherché à évaluer cette composante au cours du jeûne d'incubation. Pour ce faire, les femelles ont reçu l'injection d'un antigène (lipopolysaccharides, LPS) stimulant la libération dans la circulation sanguine d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages et les hétérophiles (cellules appartenant à l'immunité innée). La réponse immunitaire innée est ainsi évaluée par la différence de production en NO avant et après l'injection de LPS (article II). Ce pourcentage ne varie pas tout au long de l'incubation. Bien que les deux composantes de l'immunité acquise diminuent significativement au cours de l'incubation (article I), **les femelles semblent donc préserver l'intégrité de leur réponse immunitaire innée pendant l'incubation** (article II). Pourtant, les taux plasmatiques de NO avant l'injection de LPS augmentent de 40 % au cours de l'incubation. A l'inverse, la production de NO post-injection ne diffère pas de celle que soit la période au cours de l'incubation à laquelle les femelles ont reçu l'injection. Il a enfin été établi une relation négative entre la réponse immunitaire innée et les taux plasmatiques de NO avant l'injection de LPS, ce qui indique que les femelles qui présentent des taux plasmatiques de NO élevés avant l'injection vont présenter des réponses au LPS plus faibles (figure 16). Il a par ailleurs été mis en évidence une relation positive entre l'indice de condition corporelle et les taux plasmatiques de NO post-injection, ce qui illustre que **les femelles en meilleure condition corporelle sont caractérisées par une production d'oxyde nitrique augmentée après l'injection** (figure 17). La condition corporelle a par ailleurs été évaluée par la mesure de la concentration plasmatique de corticostérone. La relation négative entre la condition corporelle et la corticostéronémie confirme que les femelles en bonne condition corporelle présentent également une corticostéronémie plus faible que les femelles en moindre condition corporelle (article II). Toutes ces observations ont permis de soulever de nombreux points de questionnement quant à la régulation de la réponse immunitaire innée au cours du jeûne et de la production de NO qui peut être partiellement indépendante du système immunitaire. Ces points seront développés au cours de la discussion.



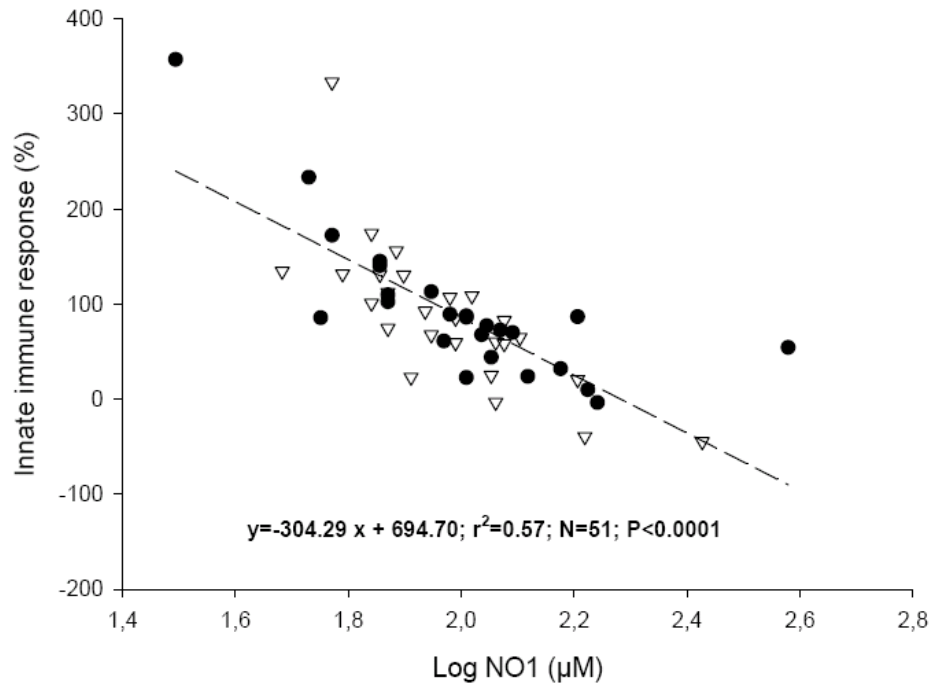


Figure 16. Relation entre les taux plasmatiques d'oxyde nitrique avant l'injection de lipopolysaccharides et la réponse immunitaire innée chez des femelles d'eider à duvet au cours de leur jeûne d'incubation, selon leur condition corporelle : bonne (rond noir) ou mauvaise (triangle blanc).

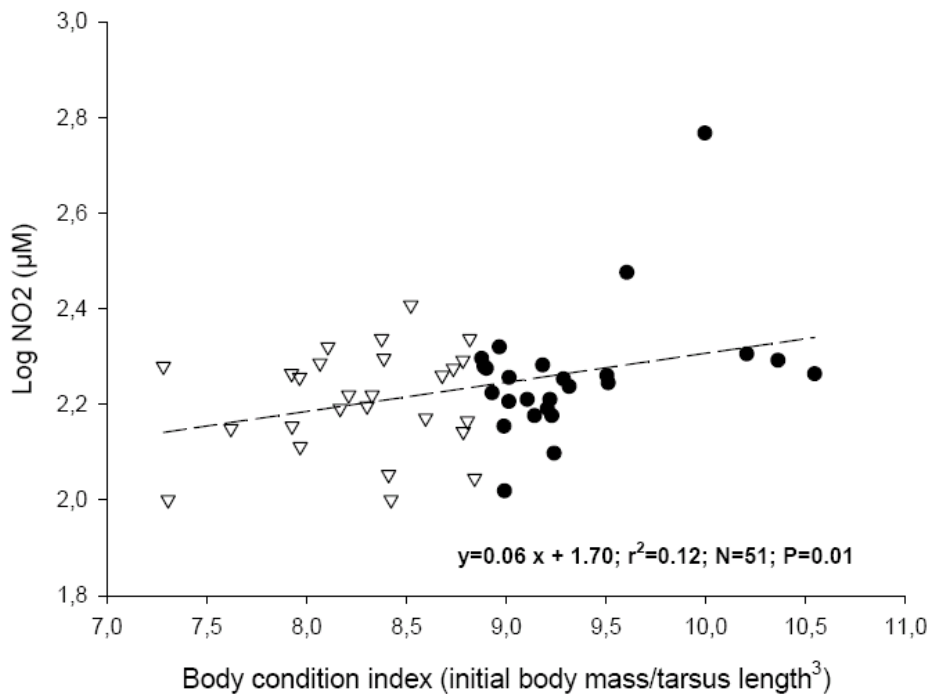


Figure 17. Relation entre l'indice de condition corporelle et les taux plasmatiques d'oxyde nitrique après l'injection de lipopolysaccharides chez des femelles d'eider à duvet au cours de leur jeûne d'incubation, selon leur condition corporelle : bonne (rond noir) ou mauvaise (triangle blanc).

2- Immunosuppression: causes ultimes

La mise en évidence d'une immunosuppression au cours du jeûne de reproduction nous amène par conséquent à confirmer l'existence d'un compromis entre l'effort reproducteur et le système immunitaire chez les femelles d'eider à duvet. Cependant, les causes ultimes d'un tel compromis échappent toujours à notre compréhension. Deux hypothèses fonctionnelles non mutuellement exclusives ont été invoquées. Nous avons alternativement tenté de tester ces deux hypothèses au moyen de protocoles adaptés.

2.1. Hypothèse d'évitement de pathologies auto-immunes

L'hypothèse d'évitement de pathologies auto-immunes postule qu'un effort reproducteur favorise la surexpression de protéines de stress (HSP), qui facilitent l'assemblage des protéines. Ces protéines intra-érythrocytaires hautement conservées, présentes chez de nombreux organismes incluant les parasites, sont la cible du système immunitaire de l'hôte lors d'une infection. Etant donné que les protéines de stress de l'hôte et du pathogène sont très proches, il y a alors pour l'hôte un risque croissant de réponses auto-immunes. Nous avons ainsi cherché à déterminer l'expression de deux protéines de stress HSP70 et HSP60 au cours de l'incubation en relation avec les variations de l'immunité humorale (article III). Conformément à nos précédents résultats, les femelles présentent une diminution de 15 % de leurs taux plasmatiques d'immunoglobulines au cours de l'incubation. En parallèle, nous avons mis en évidence **une augmentation significative de l'expression de HSP70 et HSP60** de 12 et 10 %, respectivement (article III). De plus, il existe une relation positive et significative entre ces deux paramètres (figure 18). Par contre, seule l'expression de HSP60 est négativement corrélée aux taux plasmatiques d'immunoglobulines, **une augmentation de l'expression de HSP60 semblant être associée à un déclin de l'immunité humorale** (figure 19).

Cependant, la corticostérone ne semble pas impliquée. En effet, les concentrations plasmatiques en corticostérone ne varient pas significativement au cours du jeûne d'incubation (article III). De plus, la concentration plasmatique de cette hormone n'est reliée à l'expression d'aucune des deux protéines de stress ni aux taux circulants d'immunoglobulines. Nos résultats semblent ainsi pouvoir partiellement expliquer



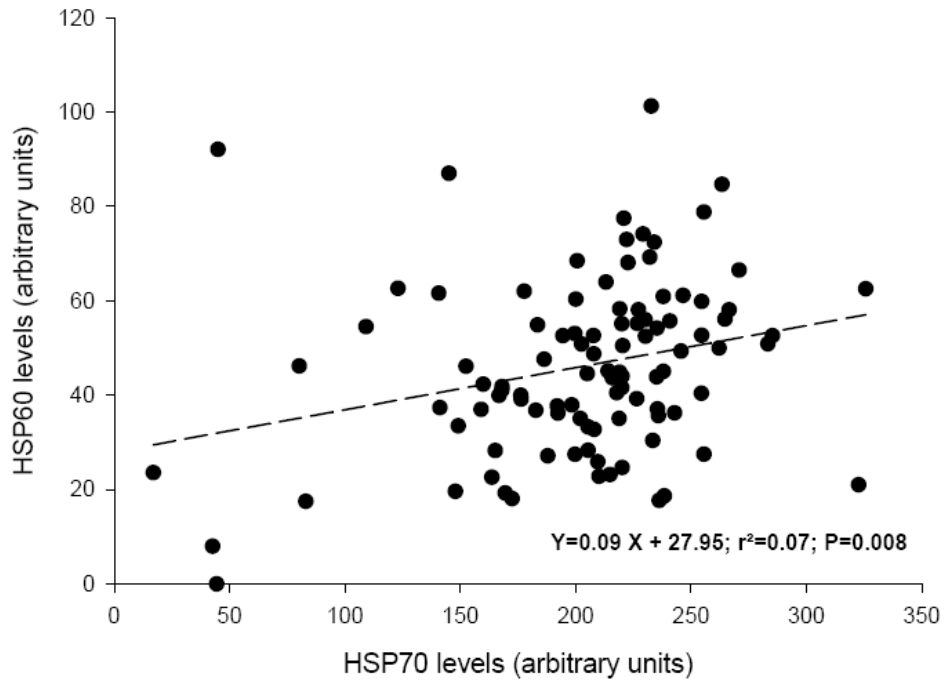


Figure 18. Relation entre l'expression (western blot) de HSP60 et de HSP70 chez des femelles d'eider à duvet au cours de leur jeûne d'incubation. HSP, « heat shock protein ».

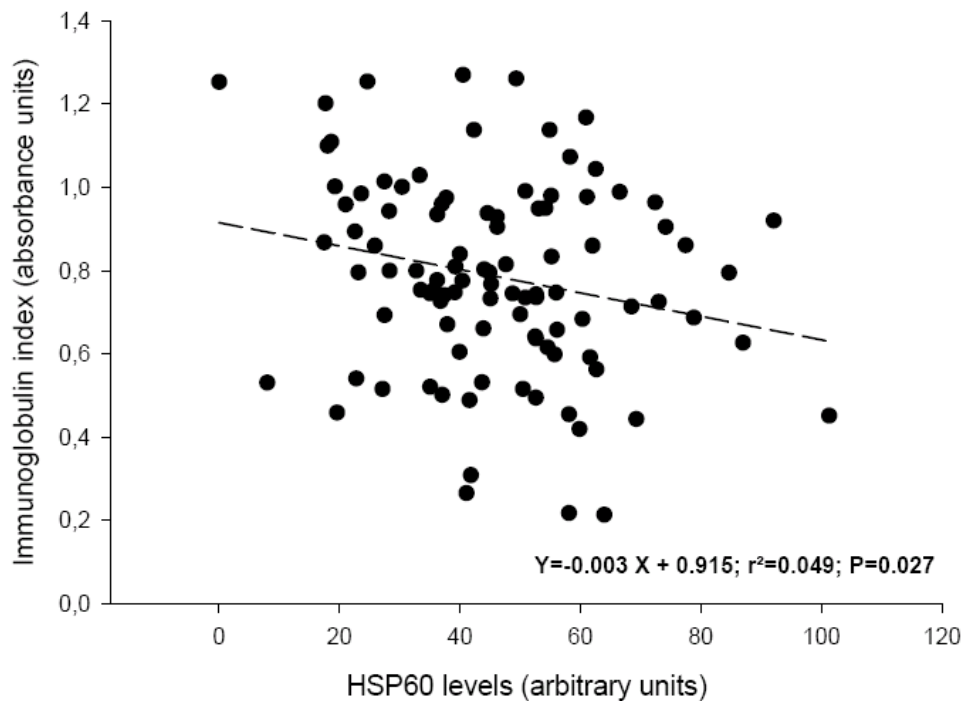


Figure 19. Relation entre l'expression (western blot) de HSP60 et le taux plasmatique d'immunoglobulines chez des femelles d'eider à duvet au cours de leur jeûne d'incubation. HSP, « heat shock protein ».

l'immunosuppression au cours de la reproduction par l'hypothèse d'évitement de pathologies auto-immunes. Néanmoins, cette hypothèse n'est pas exclusive de l'hypothèse d'allocation optimale des ressources qu'il faut alors tester.

2.2. Hypothèse d'allocation optimale des ressources

Cette hypothèse propose que l'investissement dans des comportements coûteux telle que la reproduction se ferait au détriment des ressources disponibles pour les autres systèmes tel que le système immunitaire. Une telle hypothèse requiert un coût énergétique ou nutritionnel associé à la maintenance et l'activation du système immunitaire. Or, l'existence d'un tel coût reste équivoque. Nous avons ainsi cherché à augmenter la dépense énergétique des femelles en vue de mesurer l'effet d'une telle manipulation sur leur état immunitaire. Pour ce faire, des femelles sauvages ont reçu un implant de **triiodothyronine** (T_3) au cours de leur jeûne d'incubation (article IV). La T_3 est une hormone thyroïdienne connue pour contrôler partiellement la thermorégulation et le métabolisme énergétique. Ainsi, la baisse de la T_3 plasmatique au cours du jeûne est interprétée comme un moyen d'épargner de l'énergie. Il a notamment été mis en évidence une relation positive entre les taux circulants de T_3 , la thermogénèse et le taux métabolique basal (BMR) chez des oiseaux nidifuges pendant le jeûne (Gabarrou *et al.* 1997). Un apport exogène en T_3 devrait alors permettre une augmentation de la dépense énergétique des femelles au cours du jeûne de reproduction. L'implantation sur des femelles sauvages a permis de multiplier par 4 les taux circulants en T_3 (les taux passant en moyenne de 12 pg.ml^{-1} avant l'implantation à 45 pg.ml^{-1} après l'implantation). Notre manipulation semble effectivement contribuer à augmenter la dépense énergétique des femelles, ce qui se manifeste par une perte de masse 40 % supérieure chez les femelles implantées par rapport aux femelles contrôles. Par contre, le traitement n'affecte pas significativement la réponse à médiation cellulaire, alors même que les femelles implantées présentent des taux plasmatiques en immunoglobulines 13 % inférieurs à ceux observés chez les femelles contrôles (figure 20). De plus, le traitement n'a pas induit de changements des taux plasmatiques de corticostérone. En effet, bien que la corticostéronémie ait augmenté de 60 % entre le début et la fin de l'expérimentation, cette augmentation est identique chez nos groupes expérimentaux et contrôles (en moyenne 12 ng.ml^{-1} au début de l'expérience contre 19 ng.ml^{-1} à la fin, quel que soit le groupe expérimental). Ainsi, l'augmentation de la



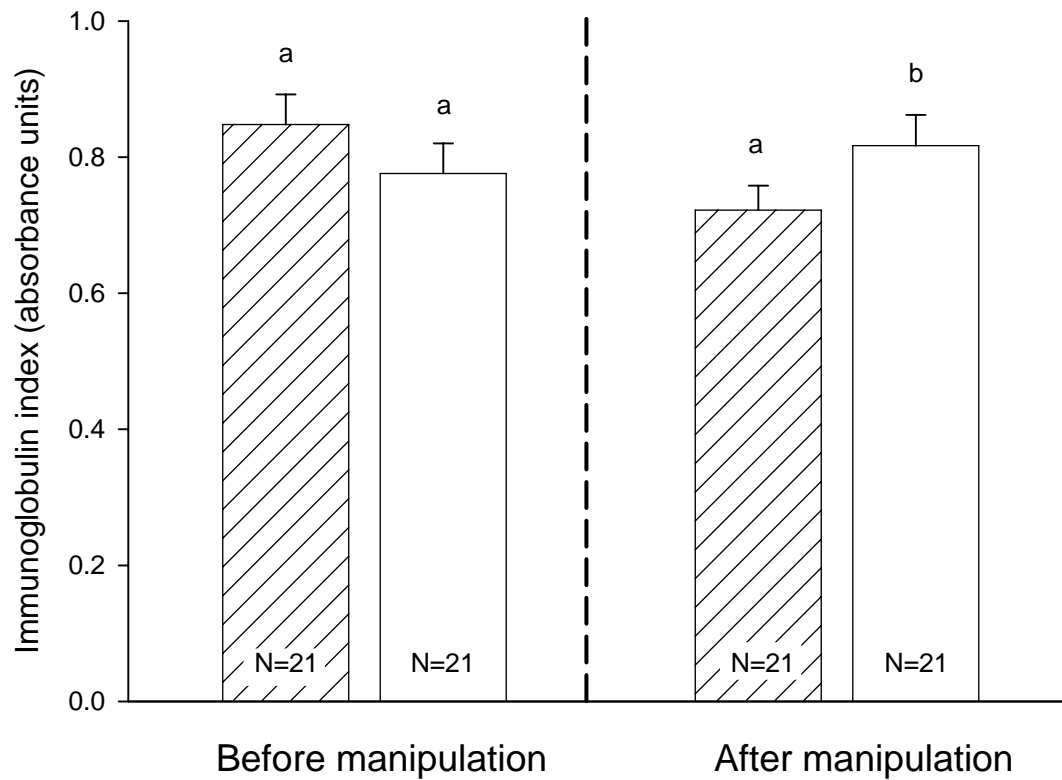


Figure 20. Effets de l'administration de triiodothyronine (T_3) sur les taux plasmatiques d'immunoglobulines chez des femelles d'eider à duvet sauvages au cours de leur jeûne d'incubation. Les taux plasmatiques d'immunoglobulines ont été mesurés chez des femelles ayant subi un implant de T_3 (barres hachurées) et chez des femelles contrôles (barres pleines), avant et après l'implantation. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type. Les valeurs dont l'exposant diffère sont significativement différentes (tests post-hoc LSD).

corticostéronémie ne semble pas responsable de **la diminution de l'immunité humorale observée chez les femelles implantées**. L'effet immunosuppresseur de la T₃ serait alors davantage modulé par ses **effets sur la diminution des réserves corporelles** des oiseaux, qui ont déjà été impliquées dans la régulation du système immunitaire. Les présents résultats semblent ainsi en accord avec l'hypothèse d'allocation optimale des ressources.

3- Immunosuppression: causes proximales

Quelles que soient les hypothèses adaptatives invoquées, les causes proximales qui sous-tendent la dépression immunitaire observée au cours de l'effort reproducteur restent non élucidées. Des changements hormonaux ont été invoqués. On a notamment attribué à la corticostérone et à la testostérone des rôles immunosuppresseurs. Nous avons voulu vérifier les effets de ces hormones chez nos deux modèles biologiques.

3.1. Rôle de la testostérone chez le mâle de manchot royal

Chez les eiders à duvet, seules les femelles couvent les œufs et prennent soin des canetons, ce qui ne nous permet pas d'étudier l'effet de la testostérone sur les composantes immunitaires chez ce modèle biologique. Nous nous sommes donc intéressés à un autre modèle biologique aviaire qui jeûne également pendant l'incubation, mais où les deux partenaires participent à l'effort reproducteur. Nous avons en effet étudié l'effet du jeûne d'incubation sur le système immunitaire chez le mâle de manchot royal (article VI). Au début du jeûne d'incubation, les mâles en parade présentent des taux plasmatiques d'immunoglobulines 29 % inférieurs à ceux des mâles en milieu et fin de jeûne (article VI). A l'inverse, les taux plasmatiques en testostérone sont beaucoup plus élevés pendant la parade plutôt qu'au cours des autres stades du jeûne d'incubation (en moyenne 3 ng.ml⁻¹ en parade contre une concentration quasi nulle au cours des stades suivants) dévoilant ainsi une relation négative entre les taux plasmatiques d'immunoglobulines et de testostérone, **de fortes concentrations en testostérone étant associées à de faibles taux plasmatiques d'immunoglobulines chez les mâles en parade** (figure 21). Ainsi, chez le mâle de manchot royal, la **testostérone** semblerait présenter des **effets immunosuppresseurs** au cours du jeûne de reproduction.



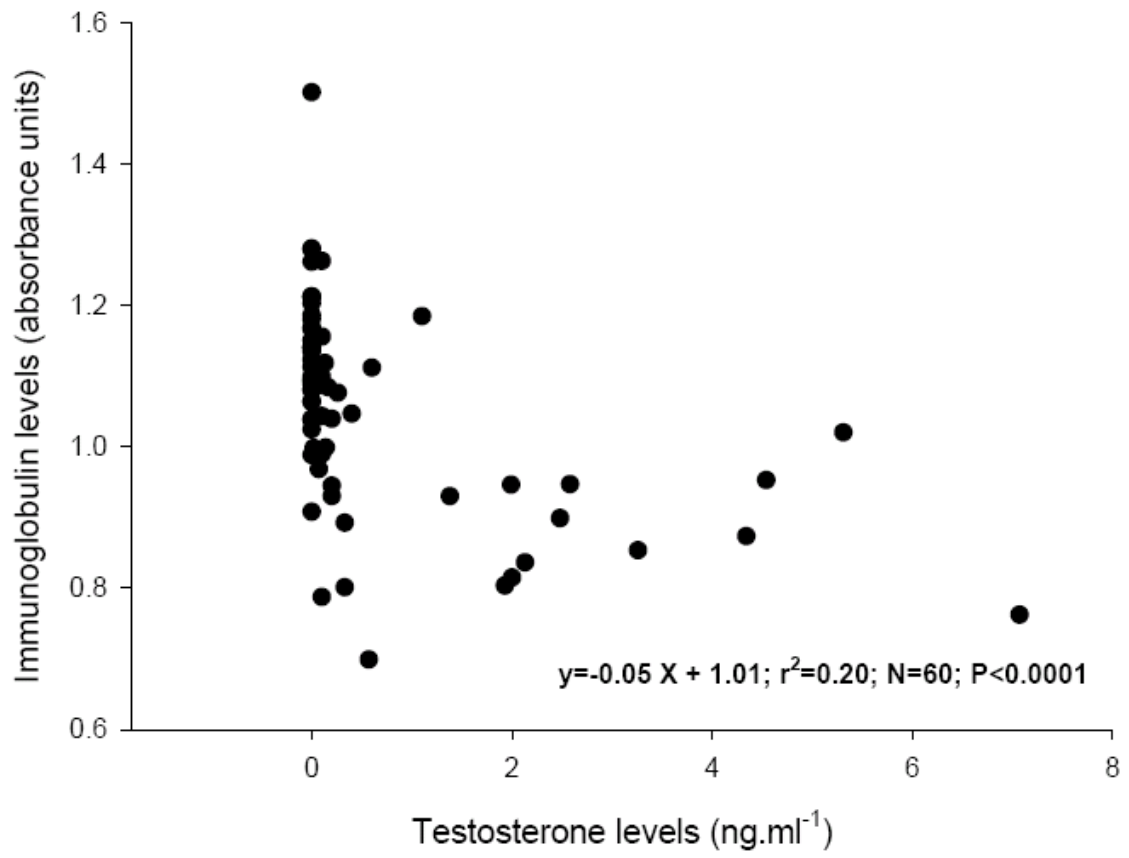


Figure 21. Relation entre les taux plasmatiques de testostérone et d'immunoglobulines chez des mâles de manchot royal au cours de leur jeûne de reproduction.

3.2. Rôle de la corticostérone

Bien que nous ayons montré que les deux composantes de l'immunité acquise diminuent significativement au cours du jeûne d'incubation chez les femelles d'eider à duvet, **nous n'avons jamais établi de relation entre aucune de ces deux composantes et les concentrations plasmatiques de corticostérone** (articles I, II, III et IV). Nous avons par ailleurs mis en évidence que la corticostéronémie ne varie pas significativement au cours du jeûne d'incubation (article I). Cependant, selon les années, les eiders achèvent leur incubation soit en utilisant les lipides comme source principale d'énergie (lipolyse) soit en dégradant les protéines (protéolyse). Ceci implique que les femelles peuvent entrer en phase III du jeûne. Alors que la phase II est caractérisée par le maintien d'une faible corticostéronémie, la phase III est marquée par une augmentation des taux plasmatiques de corticostérone. En effet, une augmentation de la corticostéronémie pendant le jeûne est susceptible d'induire la protéolyse. En l'état, nos résultats ne nous permettent cependant pas d'exclure l'effet immunosuppresseur potentiel de la corticostérone au cours du jeûne à long-terme.

3.2.1. Manipulation de la corticostéronémie chez la femelle d'eider à duvet

Nous avons alors cherché à examiner les effets d'une augmentation expérimentale de la corticostéronémie sur les deux composantes acquises de l'immunité. Pour ce faire, des femelles captives ont reçu des implants de corticostérone à différents stades de leur incubation. Parallèlement, nous avons expérimentalement allongé la période de jeûne spontané de 5 à 6 jours, de telle sorte que les femelles présentent une masse corporelle significativement plus faible mais des taux en corticostérone similaires à des femelles contrôles (avant leur entrée en phase III) (article V). Notre manipulation a induit des taux de corticostérone six fois plus élevés chez les femelles ayant reçu un implant que chez les femelles contrôles (en moyenne de 16 ng.ml^{-1} à 110 ng.ml^{-1} , indépendamment du stade de l'incubation). Comme attendu, le groupe de femelles dont la durée d'incubation a été prolongée présentent une corticostéronémie similaire à celle des femelles contrôles. De plus, les femelles ayant reçu un implant ont accusé une perte de masse 35 % supérieure à celle des femelles contrôles. Le groupe en jeûne prolongé présente une masse corporelle significativement non différente de celle des femelles implantées mais 8 % plus faible que celle des femelles contrôles. Les femelles implantées ne montrent pas de réponse immunitaire



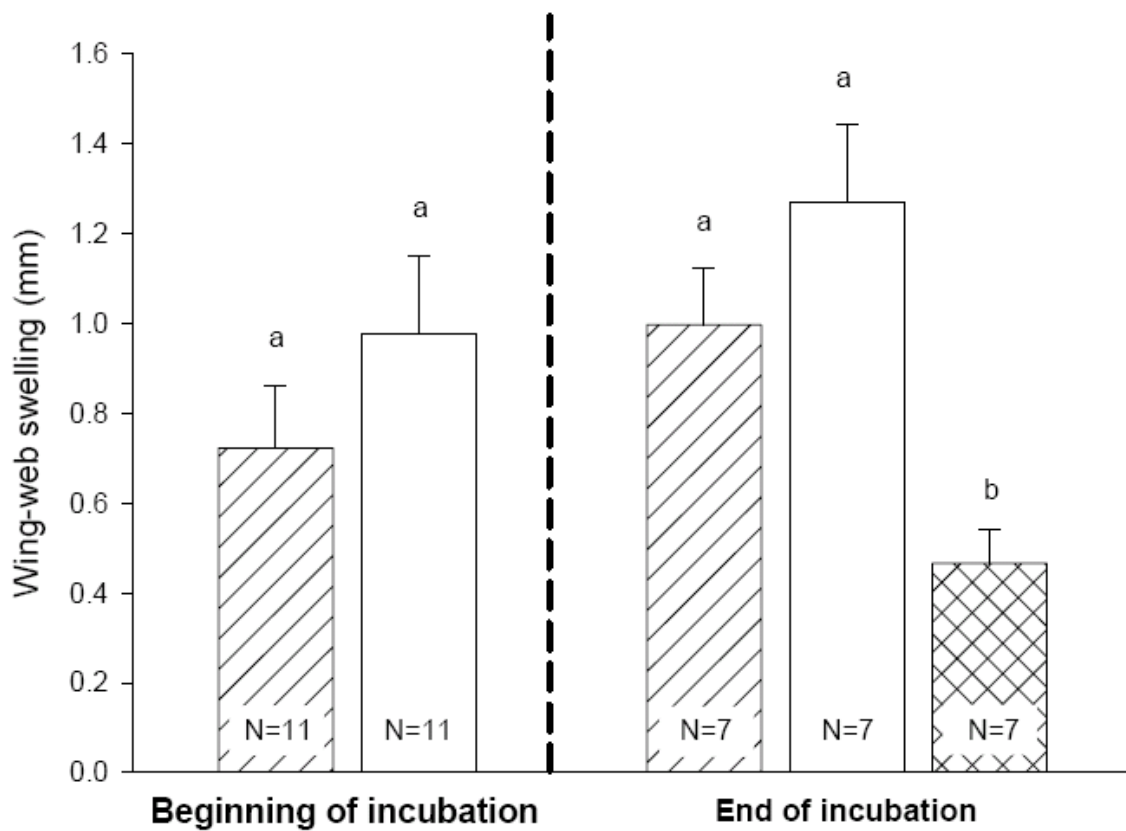


Figure 22. Effets de l'administration de corticostérone sur le gonflement alaire chez des femelles d'eider à duvet captives. Le gonflement alaire a été mesuré chez des femelles ayant subi un implant de corticostérone (barres hachurées), chez des femelles contrôles (barres pleines) et chez des femelles dont la durée de jeûne a été expérimentalement augmentée (barres doublement hachurées). Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type. Les valeurs dont l'exposant diffère sont significativement différentes (tests post-hoc LSD).

à médiation cellulaire significativement différente de celle des femelles contrôles. Seules les femelles en jeûne prolongé montrent une réponse en moyenne 60 % inférieure à celle des femelles implantées et contrôles (figure 22). La réponse immunitaire à médiation cellulaire n'est pas reliée à la corticostéronémie mais est positivement corrélée à la masse corporelle en début d'incubation, les femelles les plus lourdes présentant des réponses plus élevées. Les taux plasmatiques d'immunoglobulines quant à eux diminuent de 45 et 33 % chez les femelles implantées en début et fin d'incubation, respectivement alors que les diminutions ne sont que de 25 et 25 % chez les femelles contrôles aux mêmes stades. Quant aux femelles en jeûne prolongé, elles présentent des taux plasmatiques d'immunoglobulines similaires à ceux des femelles contrôles en fin d'incubation (figure 23). Les taux plasmatiques d'immunoglobulines et de corticostérone ne sont négativement corrélés qu'avant l'implantation en fin d'incubation, de fortes concentrations en corticostérone étant associées à de faibles taux plasmatiques d'immunoglobulines (article V). Ainsi, l'apport exogène de corticostérone n'affecte qu'une seule composante immunitaire. De plus, l'**effet immunosuppresseur de cette hormone** apparaît s'opérer à travers **ses effets sur les réserves corporelles**. Nous avons par conséquent cherché à déterminer l'effet d'une déplétion extrême des réserves énergétiques sur le système immunitaire. Pour ce faire, nous avons expérimentalement allongé la durée de jeûne de sorte à induire une phase III chez les oiseaux. Etant donné la difficulté d'une telle manipulation chez des femelles d'eider à duvet, notamment en terme de réalimentation, nous avons utilisé des manchots royaux captifs (article VI).

3.2.2. Induction de la phase III chez le mâle de manchot royal

Le jeûne de captivité chez le manchot se caractérise par une diminution progressive du taux plasmatique des immunoglobulines. Il atteint 40 % à la fin du jeûne (article VI). Comme attendu, les manchots captifs montrent une augmentation de 90 % de leur corticostéronémie à la fin du jeûne qui traduit l'entrée en phase III, mais pour autant, il n'y a pas de relation directe entre les taux plasmatiques élevés de corticostérone et la diminution des taux plasmatiques d'immunoglobulines. Quoi qu'il en soit, l'émaciation prononcée des réserves énergétiques semble avoir un effet immunosuppresseur (article VI).



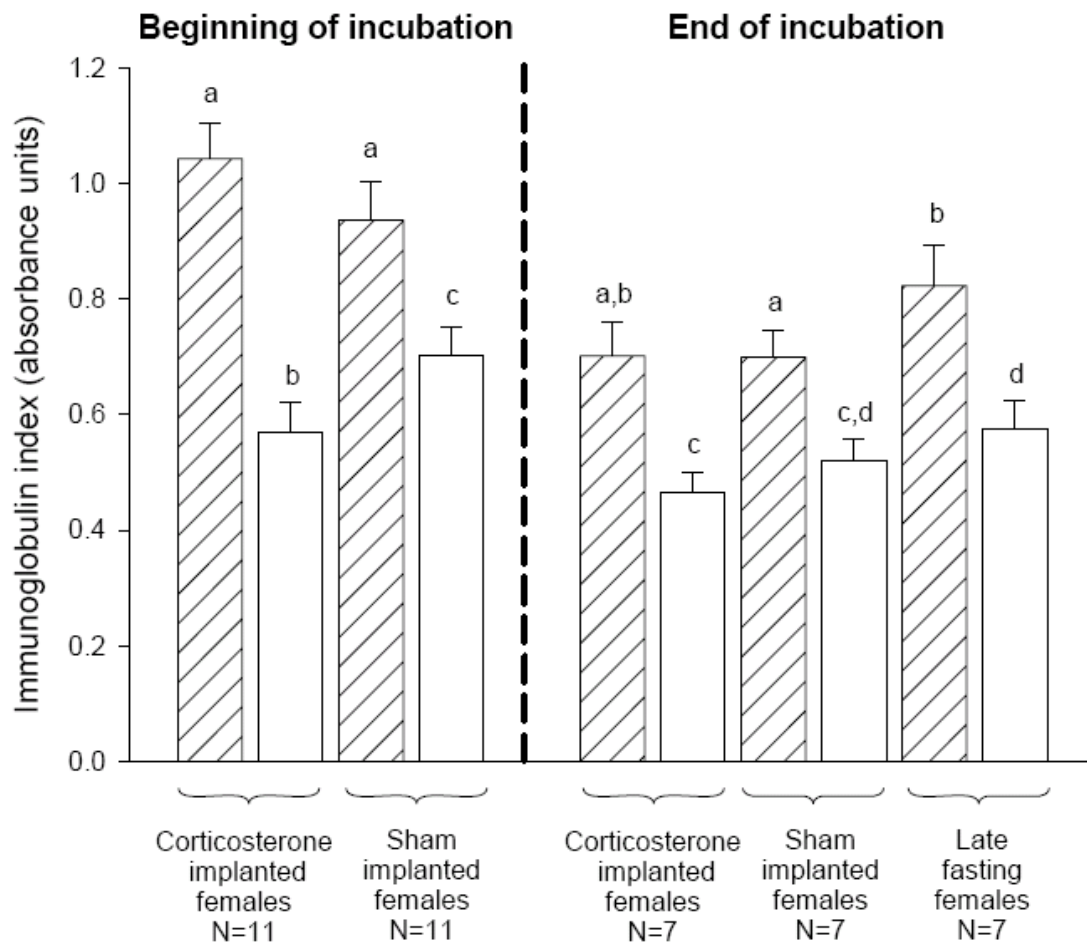


Figure 23. Effets de l'administration de corticostérone sur les taux plasmatiques d'immunoglobulines chez des femelles d'eider à duvet captives. Les taux plasmatiques d'immunoglobulines ont été mesurés chez des femelles ayant subi un implant de corticostérone, chez des femelles contrôles et chez des femelles dont la durée de jeûne a été expérimentalement augmentée, avant (barres hachurées) et après (barres pleines) le traitement. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type. Les valeurs dont l'exposant diffère sont significativement différentes (tests post-hoc LSD).

4- Jeûne de mue chez le manchot royal

Etant donné que l'immunosuppression observée au cours du jeûne d'incubation chez les femelles d'eider à duvet semble être directement reliée à l'état des réserves lipidiques des femelles c'est-à-dire à leur situation nutritionnelle, il nous est apparu important de mesurer l'état du système immunitaire lors d'un autre type de jeûne : le jeûne de mue. Or, les eiders à duvet ne jeûnent pas totalement pendant la mue. De plus, incapables de voler pendant trois à quatre semaines, les eiders muent en pleine mer, à des centaines de kilomètres de la côte afin de se protéger des prédateurs et deviennent ainsi inaccessibles. Nous avons alors étudié le jeûne de mue chez le manchot royal que la diminution d'isolation thermique empêche de retourner se nourrir en pleine mer et par conséquent l'oblige à jeûner à terre où il est aisément manipulable (article VI). **Le jeûne de mue est ainsi caractérisé par une augmentation de 44 % des taux plasmatiques d'immunoglobulines** au cours du jeûne (article VI). Parallèlement à ce profil immunitaire, les concentrations plasmatiques de corticostérone diminuent de 25 % à la fin du jeûne (article VI). A l'inverse, les concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes augmentent pendant la mue. Les taux de T_3 augmentent de 119 % à la fin du jeûne alors que les taux de thyroxine (T_4) augmentent de 125 % au début de la mue, restent stables jusqu'au milieu de la mue avant de diminuer à la fin du jeûne (article VI). Seules les variations plasmatiques en T_3 expliquent l'augmentation progressive des taux plasmatiques d'immunoglobulines au cours du jeûne de mue, les fortes concentrations en T_3 étant associées à de forts taux plasmatiques d'immunoglobulines (figure 24). Au cours du **jeûne de mue** chez le manchot, la **T_3 semble ainsi jouer un rôle immunostimulateur** sur l'immunité humorale (article VI).



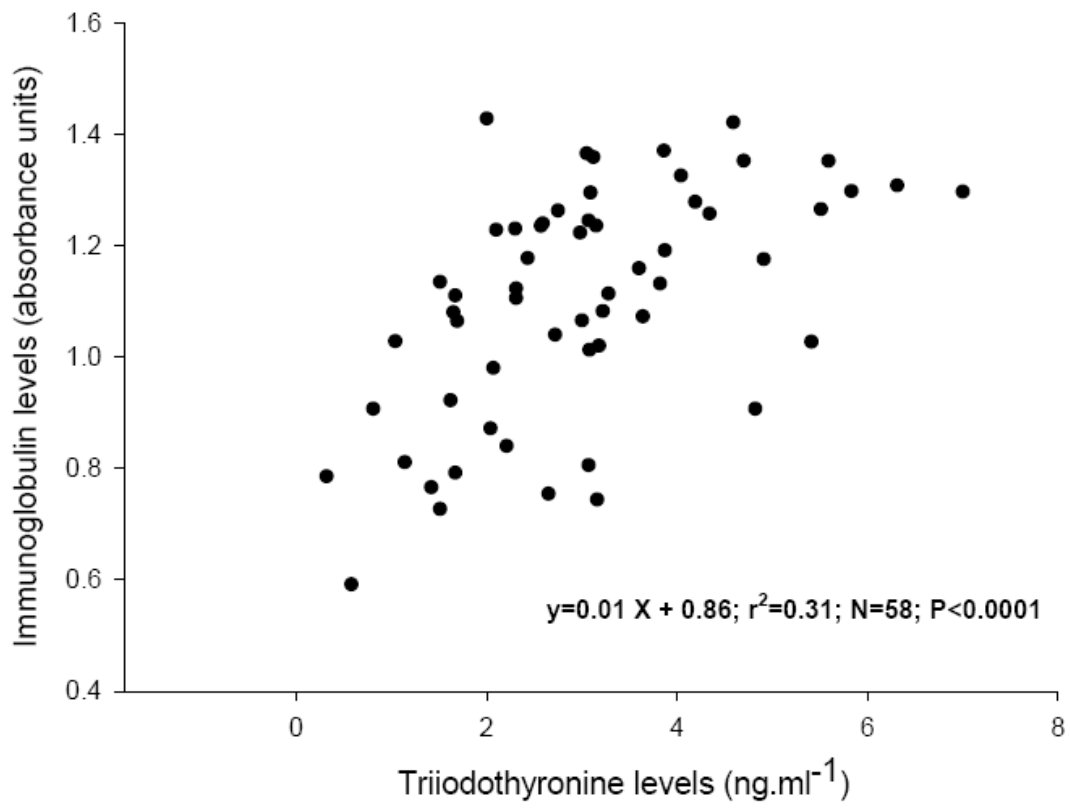


Figure 24. Relation entre les taux plasmatiques de triiodothyronine et d'immunoglobulines chez des manchots royaux en pré-mue et en mue.

E- Discussion



E- DISCUSSION

1- Diminution de l'immunité acquise au cours du jeûne d'incubation chez la femelle d'eider à duvet

Nous avons ainsi montré que les femelles présentent des réponses cellulaires réduites vis-à-vis du PHA et une diminution de leurs taux plasmatiques d'immunoglobulines à mesure que le jeûne d'incubation progresse (article I). En accord avec la littérature, nos résultats laissent apparaître que **les femelles d'eider à duvet semblent préférentiellement allouer leurs ressources à l'effort reproducteur au détriment des deux composantes de l'immunité acquise**. Cependant, l'absence de corrélation entre ces deux paramètres nous laisse envisager que les variations d'une composante ne semblent pas être un bon indicateur des variations de l'autre composante. Ce résultat conforte tout d'abord l'hypothèse que toutes les composantes immunitaires pourraient ne pas être affectées de la même façon au cours d'un effort reproducteur (Norris et Evans 2000). De plus, il renforce l'idée qu'une évaluation de toutes les composantes immunitaires s'impose afin d'évaluer les éventuels compromis entre la reproduction et le système immunitaire. En effet, Zuk et Johnsen (1998) ont montré chez le coq bankiva que les mâles à grandes crêtes présentent des taux de lymphocytes plus faibles mais une réponse à médiation cellulaire plus grande pendant la saison de reproduction. Cet exemple illustre le phénomène d'**immunoredistribution** défini par Braude *et al.* (1999). Afin de tester l'occurrence d'un tel phénomène chez les femelles d'eider, nous avons mesuré simultanément les deux composantes de l'immunité acquise. Cependant, la complexité du système immunitaire nous empêche de stimuler simultanément plusieurs composantes immunitaires, la stimulation d'une composante pouvant limiter l'activation d'une autre (Norris et Evans 2000). En conséquence, la composante humorale n'a pas été mesurée en réponse vis-à-vis d'un antigène particulier mais par le taux circulant d'immunoglobulines (Morales *et al.* 2004 ; Ots et Hōrak 1998 ; Szép et Møller 1999). Bien qu'une telle évaluation d'une composante immunitaire puisse éventuellement refléter une plus grande charge parasitaire plutôt que l'immunocompétence (Moreno *et al.* 2002 ; Norris et Evans 2000), notre dosage d'immunoglobulines en parallèle du test PHA nous a permis de mesurer l'état des deux composantes immunitaires acquises sur un même individu.

Par ailleurs, la diminution de l'immunocompétence au cours de l'incubation s'opère **indépendamment de la taille de couvée initiale des femelles**. Ce résultat est conforté par les



travaux de Hanssen *et al.* (2003a) où aucune relation entre la taille de couvée initiale et les taux de lymphocytes ou d'hétérophiles chez des femelles d'eider n'a pu être observée. Ce résultat se justifie dans le cadre de l'hypothèse de la « taille de couvée optimale » avancée par Monaghan et Nager (1997). Cette hypothèse postule en effet que les oiseaux produisent une couvée dont la taille est ajustée en fonction de leurs possibilités à investir dans cette couvée. Erikstad et Tveraa (1995) et Erikstad *et al.* (1993) ont établi que la taille de couvée optimale chez les eiders est le résultat d'un équilibre entre les réserves énergétiques allouées à la production des œufs et celles investies dans l'incubation, étant donné que les canetons se nourrissent seuls dès l'éclosion. Hanssen *et al.* (2003b) ont alors postulé que la taille de couvée peut refléter la 'qualité' des femelles, de petites couvées étant produites par des femelles de plus faible 'qualité'. Pour vérifier si l'incubation d'une plus grande couvée est plus coûteuse en terme d'une réduction plus importante de la fonction immunitaire, Hanssen *et al.* (2005) ont artificiellement augmenté les tailles de couvée de femelles d'eider. Ils ont ainsi montré que de fortes demandes d'incubation résultent à court-terme en une perte de masse supérieure, une réduction plus importante de l'immunité humorale et induisent également des effets à long-terme, comme un retard d'initiation de la ponte et de diminution de la taille de couvée lors de la période de reproduction suivante.

2- Maintien de l'immunité innée au cours du jeûne d'incubation chez la femelle d'eider à duvet

Alors que les deux composantes immunitaires acquises diminuent, **les femelles semblent préserver l'intégrité de leur réponse immunitaire innée au cours de l'incubation** (article II). Nous avons évalué l'immunité innée par la mesure de la production d'oxyde nitrique (NO) consécutive à l'injection d'un antigène (LPS) qui induit l'activation des macrophages et des hétérophiles, cellules de l'immunité innée. Le pourcentage d'augmentation d'oxyde nitrique plasmatique produit en réponse à cette stimulation ne varie pas au cours de l'incubation, ce qui reflète une certaine insensibilité de l'immunité innée vis-à-vis du jeûne d'incubation. Ce phénomène pourrait permettre de limiter les infections en compensant la diminution de l'immunité acquise par le maintien d'une barrière primaire efficace (Roitt *et al.* 1998). Cette hypothèse est confortée par des mesures indirectes de l'immunité innée (ratio hétérophiles/lymphocytes) qui ne varient pas au cours de l'incubation chez des eiders (Hanssen *et al.* 2003a). De même, Hangalapura *et al.* (2005) ont mis en évidence chez des



poulets soumis à un jeûne expérimental prolongé, une suppression de leur réponse lymphocytaire alors que leur immunité innée est augmentée. Néanmoins, bien que l'immunité innée ne semble pas varier au cours de l'incubation dans notre étude, son intensité paraît limitée à une valeur seuil. En effet, alors que la production de NO avant la stimulation (NO1) des macrophages et hétérophiles augmente significativement au cours de l'incubation, la production de NO en réponse à la stimulation (NO2) ne varie pas à mesure que l'incubation progresse. En conséquence, la réponse immunitaire innée (NO2-NO1/NO1) ne varie pas dans le temps. Cette valeur seuil peut également être une sécurité vis-à-vis d'un stress oxydatif trop important. Les granulocytes en particulier ont des effets sur les cellules de l'hôte puisqu'ils déversent leur NO/ROS à l'extérieur. De plus, une suractivation des macrophages va conduire à l'activation du système immunitaire acquis.

Une explication possible du maintien du système immunitaire inné est que le recrutement des cellules phagocytaires serait énergétiquement moins coûteux que l'activation des composantes immunitaires acquises (humorale et cellulaire). Privilégier l'immunité innée pourrait ainsi contribuer à limiter les coûts associés à l'activation de l'immunité acquise en terme de fitness (Hanssen *et al.* 2004). Cependant, l'existence de coûts énergétiques associés à l'activation de l'immunité acquise reste équivoque. Chez les souris, l'activation d'une réponse immunitaire provoque une augmentation de 15 à 20 % de leur consommation en oxygène (Demas *et al.* 1997). Cependant, chez des mésanges bleues (Svensson *et al.* 1998) et des diamants mandarins (Verhulst *et al.* 2005), l'induction d'une réponse humorale n'induit qu'une faible augmentation du taux métabolique basal (BMR). De plus, Hanssen *et al.* (2004) n'ont pas mis en évidence une perte de masse accélérée chez des femelles d'eider en réponse à une injection d'antigènes. Ainsi, la nature des liens entre les réponses immunitaires, l'effort reproducteur et le métabolisme énergétique échappe toujours à notre compréhension. Cependant, nos travaux montrent que les taux de NO2 sont positivement corrélés à la condition corporelle initiale, les femelles en bonne condition présentant des taux de NO2 supérieurs aux femelles en mauvaise condition corporelle. **L'immunocompétence des femelles d'eider pourrait ainsi dépendre partiellement de leur condition corporelle** (Norris et Evans 2000). Cette hypothèse est renforcée par la démonstration d'un contrôle de l'immunité humorale par les réserves lipidiques chez les mammifères (Demas *et al.* 2003), ce qui soulève la question du contrôle hormonal du système immunitaire (Demas et Sakaria 2005). Le tissu adipeux, outre son rôle de stockage des lipides, peut également agir comme un organe endocrine responsable de la synthèse et de la sécrétion de plusieurs hormones biologiquement actives (Ahima et Flier



2000). La leptine, hormone sécrétée par le tissu adipeux, a été impliquée dans la stimulation d'une variété de paramètres immunologiques chez les mammifères (Lord *et al.* 1998 ; Faggioni *et al.* 2001) et chez les oiseaux (Lõhmus *et al.* 2004). Les taux de leptine circulante sont généralement proportionnels à la quantité de lipides de réserve (Lõhmus et Sundström 2004). Ainsi, la diminution de la disponibilité en réserves lipidiques, notamment observée au cours du jeûne, pourrait affecter l'immunité via des changements endocriniens (Demas et Sakaria 2005).

3- Causes ultimes de l'immunosuppression au cours du jeûne d'incubation chez la femelle d'eider à duvet

Après avoir mis en évidence chez la femelle d'eider à duvet que les deux composantes immunitaires acquises diminuent significativement au cours du jeûne d'incubation alors que l'immunité innée ne semble pas affectée, nous nous sommes employés à en déterminer les causes ultimes.

3.1. Hypothèse d'évitement de pathologies auto-immunes

Alors que les femelles d'eider jeûnent de façon totale au cours de l'incubation, elles devraient réduire leur dépense énergétique. Cependant, elles sont contraintes de maintenir un taux minimal de chaleur nécessaire à l'incubation des œufs (Criscuolo *et al.* 2003). Ce dilemme énergétique favorise la production de **protéines de stress** (« heat shock protein », HSP ; Locke et Noble 1995 ; Råberg *et al.* 1998 ; Sørensen *et al.* 2003) qui sont de bons indicateurs de stress physiologique (Martinez *et al.* 1999 ; Moreno *et al.* 2002). Les HSP sont par ailleurs la cible du système immunitaire de l'hôte (Lamb *et al.* 1989). Dans la mesure où ces protéines sont aussi présentes chez les pathogènes, la surexpression des HSP de l'hôte en réponse à un stress favorise ainsi la survenue de pathologies auto-immunes. Tout d'abord, en accord avec nos précédents résultats et ceux de Hanssen *et al.* (2004), nous observons une diminution significative de la composante humorale au cours du jeûne d'incubation via une diminution de 15 % du taux plasmatique d'immunoglobulines. Notre étude montre par ailleurs que l'expression de HSP70 et HSP60, 1) **augmente au cours de l'incubation** et 2) que les deux protéines sont positivement corrélées, l'augmentation d'un type de protéine étant associée à



l'augmentation de l'autre type (article III). Chez des couples d'hirondelle rustique, Merino *et al.* (2002) montrent également une corrélation positive entre HSP70 et HSP60. De plus, ces auteurs ont défini un rôle spécifique pour chacune de ces protéines. En effet, l'expression de HSP70 ne varie pas en fonction de l'infection parasitaire et/ou du sexe des hirondelles alors que l'expression de HSP60 est significativement plus élevée chez les oiseaux infectés par des hématozoaires (Merino *et al.* 2002). Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de relation entre l'expression de HSP70 et les taux plasmatiques d'immunoglobulines. A l'inverse, les taux de HSP60 sont négativement corrélés aux taux plasmatiques d'immunoglobulines, l'augmentation de l'expression de HSP60 étant associée à la diminution des taux plasmatiques d'immunoglobulines. Ce résultat indique bien un lien entre le système immunitaire et la synthèse des protéines de stress préalablement suggéré par Moreno *et al.* (2002). De même, chez les poussins d'hirondelle rousseline, Merino *et al.* (2001) trouvent une relation négative entre leur réponse immunitaire cellulaire vis-à-vis du PHA et l'expression de HSP60, une forte expression de HSP60 étant associée à de faibles réponses cellulaires. Par conséquent, nos résultats semblent en accord avec l'hypothèse d'évitement de pathologies auto-immunes chez les femelles d'eider au cours du jeûne de reproduction. Le système immunitaire des femelles pourrait alors être adaptivement rétro-régulé afin de diminuer les risques de réponses auto-immunes.

Par ailleurs, la diminution de l'immunité humorale observée dans notre étude pourrait être compensée par l'expression augmentée de HSP60 et HSP70. En effet, les deux protéines sont susceptibles d'induire des réponses immunitaires innées (Gullo et Teoh 2004) et pourraient constituer les signaux de danger nécessaires à l'induction d'une réponse plus efficace de la part des cellules présentatrices d'antigènes tels que les macrophages ou les cellules dendritiques (van Eden *et al.* 2003 ; Zheng *et al.* 2004). De plus, les effecteurs de l'immunité acquise et innée utilisent des peptides présentés par des HSP pour répondre (Hickman-Miller et Hildebrand 2004). Ainsi, l'augmentation de l'expression des HSP au cours du jeûne d'incubation pourrait contribuer à améliorer l'efficacité du système immunitaire inné des femelles. Ce phénomène d'immunoredistribution (Zuk et Johnsen 1998 ; Braude *et al.* 1999) permettrait de compenser la diminution de l'immunité humorale afin d'aboutir à une protection inchangée des organismes contre les pathogènes. En accord avec ce postulat, nous n'observons pas de diminution de l'immunité innée au cours du jeûne d'incubation chez les femelles d'eider à duvet.



3.2. Hypothèse d'allocation optimale des ressources

Cette hypothèse postule que les organismes confrontés à des ressources limitées alloueraient préférentiellement leur énergie dans un événement reproducteur au détriment du système immunitaire (Råberg *et al.* 1998). Nous avons précédemment établi que les femelles d'eider présentent une diminution significative de leurs composantes immunitaires acquises au cours du jeûne d'incubation. Bien que la démonstration d'un coût énergétique lié à l'activation du système immunitaire reste équivoque (Eraud *et al.* 2005; Verhulst *et al.* 2005), nous avons par ailleurs précédemment supposé que la disponibilité en réserves lipidiques observée au cours du jeûne pourrait affecter l'immunité. Malgré la situation de jeûne, les femelles maintiennent une température corporelle élevée pour incuber les œufs par une forte concentration en T_3 (Criscuolo *et al.* 2005). En effet, la T_3 contrôle partiellement la thermorégulation et le métabolisme énergétique chez les mammifères et les oiseaux (McNabb 1995). Les taux circulants de T_3 , la thermogénèse et le BMR sont notamment positivement corrélés au cours du jeûne chez des espèces nidifuges (Sechman *et al.* 1989 ; Gabarrou *et al.* 1997). Chez des femelles de gobemouche noir, Moreno *et al.* (2001) montrent une corrélation négative entre la dépense énergétique et la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Cependant, les relations directes entre les hormones thyroïdiennes et le système immunitaire sont loin d'être totalement élucidées (Smits *et al.* 2002). Notre étude s'est alors attachée à mesurer les conséquences d'une **augmentation de la dépense énergétique obtenue par des implants de T_3** sur les composantes immunitaires acquises des femelles d'eider au cours du jeûne d'incubation (article IV). Comme attendu, les femelles implantées perdent significativement plus de masse que les femelles contrôles. Dans notre étude, l'augmentation expérimentale des concentrations plasmatiques en T_3 n'altère cependant qu'une seule des deux composantes immunitaires. En effet, les taux plasmatiques d'immunoglobulines sont significativement plus faibles chez les femelles ayant reçu un implant par rapport aux femelles contrôles alors que la réponse à médiation cellulaire n'est pas affectée par le traitement. Par ailleurs, le traitement n'affecte pas les concentrations plasmatiques de corticostérone. Les taux plasmatiques d'immunoglobulines s'avèrent ainsi plus sensibles au traitement à la T_3 que la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Comme suggéré par Norris et Evans (2000), l'immunocompétence pourrait donc être fixée par les réserves lipidiques. Une telle relation entre le métabolisme énergétique et l'immunocompétence est confortée par l'existence de facteurs endocrines qui régulent les deux processus (Apanius 1998). Le tissu adipeux a été



récemment décrit comme un participant actif de la régulation de processus biologiques essentiels telle que l'homéostasie immunitaire (Matarese et La Cava 2004), notamment via la leptine (Lord *et al.* 1998 ; Faggioni *et al.* 2001 ; Löhms *et al.* 2004). L'administration exogène de T_3 est susceptible d'augmenter le BMR et de contribuer à une plus grande déplétion énergétique au cours du jeûne. En conséquence, les taux de leptine, proportionnels à l'état des réserves lipidiques, pourraient être diminués chez les femelles ayant reçu un implant de T_3 comparées aux femelles contrôles. Bien que les effets de la leptine favorisent la survie dans des conditions hostiles, un jeûne simultané aboutit à une dépression immunitaire et une fécondité altérée car cette hormone peptidique suspend les processus consommateurs d'énergie (Matarese et La Cava 2004). L'effet immunosuppresseur induit par l'apport exogène de T_3 pourrait potentiellement être imputable à la leptine. Afin d'examiner plus finement le rôle de la leptine sur le fonctionnement immunitaire des femelles en jeûne, il serait donc utile de manipuler directement les concentrations en leptine (Löhms *et al.* 2004). Puisque nous avons établi qu'une utilisation accrue des réserves lipidiques conduit à une immunosuppression, il paraît fort probable que l'immunocompétence soit reliée à la quantité disponible de réserves lipidiques. Nos résultats tendent ainsi à supporter l'hypothèse d'allocation optimale des ressources. Chez les femelles d'eider qui jeûnent pendant l'incubation, la condition corporelle initiale et l'utilisation séquentielle des réserves endogènes pourraient alors conditionner les variations observées de l'immunocompétence au cours du jeûne d'incubation. Ainsi, les femelles en bonne condition initiale accuseraient une moindre diminution de leur immunocompétence que les femelles en moindre condition initiale.

4- Causes proximales de l'immunosuppression au cours du jeûne d'incubation

Après s'être intéressés aux causes ultimes de l'immunosuppression au cours du jeûne d'incubation, nous avons ensuite cherché à évaluer les effets de la testostérone et de la corticostérone sur l'immunité.



4.1. Rôle immunosuppresseur de la testostérone chez le mâle de manchot royal

Nous avons évalué le rôle immunomodulateur de la testostérone chez des mâles de manchot royal au cours du jeûne de reproduction (article VI). Nous avons tout d'abord établi que le jeûne de reproduction ne semble pas affecter l'immunité humorale, les manchots en milieu de jeûne (environ 15 jours de jeûne) ne présentant pas des taux plasmatiques d'immunoglobulines significativement différents de ceux des manchots en fin de jeûne (environ 30 jours de jeûne). En accord avec cette observation, le jeûne de reproduction ne semble pas sévèrement affecter le statut énergétique des oiseaux. En effet, le jeûne de reproduction est caractérisé par une économie d'énergie et une épargne des protéines (Cherel *et al.* 1988b ; Groscolas et Robin 2001).

Par contre, les mâles en parade montrent une diminution de 30 % de leurs taux plasmatiques d'immunoglobulines par rapport aux autres stades alors qu'ils ne jeûnent que depuis un à deux jours seulement. Par ailleurs, cette période de parade est marquée par des taux plasmatiques très élevés en testostérone ; ils redeviennent quasiment nuls après cette période. Nous avons établi une corrélation négative entre les taux plasmatiques de testostérone et d'immunoglobulines, de fortes concentrations plasmatiques en testostérone étant associées à de faibles taux d'immunoglobulines. La **testostérone semble donc avoir un effet immunosuppresseur chez le mâle de manchot** au début de son jeûne de reproduction, comme il l'a été suggéré pour d'autres espèces aviaires (Folstad et Karter 1992). Hillgarth *et al.* (1996) ont suggéré que l'effet immunosuppresseur de la testostérone chez les mâles en parade pouvait entre autres limiter la production d'anticorps dirigés contre les spermatozoïdes.

4.2. Evaluation du rôle de la corticostérone sur l'immunocompétence de la femelle d'eider à duvet

Ilmonen *et al.* (2003) ont défini que la dépression immunitaire est généralement régulée via des interactions complexes entre le système neuroendocrine et l'immunité, en particulier par les glucocorticoïdes. Cette hormone a notamment été impliquée dans l'inhibition *in vitro* de la prolifération lymphocytaire chez le poulet (Hangalapura *et al.* 2005) et dans une diminution de la capacité phagocytaire de rats soumis à un jeûne expérimental prolongé (Salman *et al.* 1998). Cependant, contrairement aux deux composantes de l'immunité acquise qui diminuent



significativement au cours du jeûne de reproduction chez les femelles d'eider, nous avons établi, à travers différentes études (articles I, II, III et IV), que **la corticostéronémie ne varie pas significativement au cours de l'incubation, indépendamment de la taille de couvée initiale des femelles**. Ce résultat est en accord avec le fait que de fortes concentrations plasmatiques en corticostérone favorisent la protéolyse pendant le jeûne et que les oiseaux doivent maintenir leur corticostéronémie à des valeurs basses pendant le jeûne de reproduction (Cherel *et al.* 1988b ; Criscuolo *et al.* 2005). L'expression des HSP qui augmente significativement au cours de l'incubation semble ainsi un meilleur marqueur de stress que la mesure de la corticostéronémie chez les femelles d'eider à duvet au cours du jeûne d'incubation (Martinez-Padilla *et al.* 2004 ; Tomás *et al.* 2004). De plus, nous n'avons pas établi de corrélation entre les taux plasmatiques de corticostérone et aucune des deux composantes immunitaires acquises. Seule l'immunité innée tend à être négativement corrélée à la corticostéronémie, de fortes concentrations plasmatiques en corticostérone étant associées à de faibles réponses. Par ailleurs, en synergie avec la prolactine impliquée dans le comportement d'incubation des eiders (Criscuolo *et al.* 2005), la corticostérone peut promouvoir la phagocytose (Rodriguez *et al.* 2001) et la production de NO (Lourenco *et al.* 2005). Nos résultats ne semblent donc pas en faveur de l'hypothèse d'une immunosuppression médiée par les glucocorticoïdes chez les femelles d'eider à duvet au cours de leur jeûne d'incubation (Deerenberg *et al.* 1997 ; Råberg *et al.* 1998 ; Saino *et al.* 2002). Néanmoins, nous ne pouvons pas pour autant rejeter l'hypothèse d'une immunosuppression fonctionnelle ni même celle du rôle potentiel de la corticostérone dans l'immunosuppression. En effet, la corticostérone plasmatique est partiellement liée à des globulines. La seule mesure de la corticostérone libre pourrait ainsi cacher la quantité réelle d'hormone responsable des effets biologiques observés (Romero 2004). De plus, les glucocorticoïdes interagissent avec deux types de récepteurs afin d'induire les effets physiologiques ou comportementaux. Des études menées en laboratoire ont montré que la configuration de ces récepteurs est susceptible d'être modifiée ce qui altère les effets physiologiques des glucocorticoïdes (Romero 2002). Enfin, selon les années, les eiders sont susceptibles d'achever leur incubation soit en utilisant les lipides comme principale source énergétique (phase II du jeûne), soit en dégradant les protéines (phase III du jeûne) (Hollmén *et al.* 2001). Alors que la phase II du jeûne est associée au maintien d'une corticostéronémie faible, la phase III est caractérisée par une augmentation des taux plasmatiques de corticostérone, responsable de l'induction de la protéolyse caractéristique de cette phase (Robin *et al.* 1998). Par ailleurs, nous avons



préalablement établi que la corticostérone pouvait être un lien fonctionnel entre la condition corporelle des femelles et la réponse immunitaire (article II). Dans ce contexte, il nous est alors apparu indispensable de prolonger le jeûne des oiseaux jusqu'en phase III ou encore de pratiquer des implants de corticostérone et d'en examiner les conséquences sur le système immunitaire en vue de déterminer jusqu'à quel point cette hormone stéroïde peut être impliquée dans les phénomènes d'immunosuppression et/ou d'immunoredistribution.

4.3. Manipulations de la corticostéronémie et effets sur l'immunocompétence

Nous avons tout d'abord cherché à mesurer les effets d'un apport exogène en corticostérone sur les composantes immunitaires acquises de femelles d'eider au cours du jeûne d'incubation. Nous avons enfin mesuré l'impact de l'entrée en phase III sur l'immunocompétence de manchots royaux.

4.3.1. Implants de corticostérone chez la femelle d'eider à duvet

L'augmentation expérimentale des concentrations plasmatiques en corticostérone n'affecte qu'une seule des deux composantes immunitaires acquises. En effet, les femelles ayant reçu un implant montrent une diminution significative de leur taux plasmatique d'immunoglobulines comparé aux femelles contrôles, d'autant plus importante que l'implantation a lieu au début de l'incubation. Par contre, la réponse immunitaire à médiation cellulaire n'est pas affectée par le traitement. Paradoxalement, nous n'avons pas établi de relation entre la corticostéronémie et les taux plasmatiques d'immunoglobulines (article V). Ces derniers semblent ainsi plus sensibles au traitement à la corticostérone que la réponse cellulaire. D'autre part, les femelles implantées à la corticostérone perdent significativement plus de masse que les femelles contrôles. Ce phénomène est lié au fait que la corticostérone induit la protéolyse chez les oiseaux qui jeûnent (Cherel *et al.* 1988b). Etant donné la plus faible valeur énergétique des protéines par rapport aux lipides (18 versus 39 kJ.g⁻¹), la même dépense énergétique aboutira ainsi à une plus grande perte de masse chez les individus réalisant la protéolyse par rapport à ceux effectuant la lipolyse. De plus, contrairement à la mobilisation des lipides, l'utilisation des protéines corporelles est liée à une perte d'eau plus importante liée au stockage respectif de ces réserves. Par ailleurs, le groupe de femelles



soumis à un jeûne expérimental prolongé présente une corticostéronémie similaire à celle des femelles contrôles mais une masse significativement plus faible. Seul ce dernier groupe de femelles montre une diminution significative de la réponse immunitaire à médiation cellulaire par rapport aux femelles ayant reçu un implant et aux femelles contrôles. La réponse à médiation cellulaire semble donc plus sensible à la perte de masse qu'aux taux plasmatiques élevés de corticostérone. En accord avec ce résultat, nous avons par ailleurs établi une corrélation positive entre la masse corporelle et la réponse à médiation cellulaire, les femelles ayant des réserves corporelles plus importantes montrant les réponses les plus fortes. A l'inverse, les taux plasmatiques d'immunoglobulines seraient plus sensibles à une forte corticostéronémie qu'à une perte de masse marquée bien qu'une corticostéronémie élevée aboutisse à une plus grande perte de masse. De même, chez les mouettes tridactyles (*Rissa tridactyla*) en cours de reproduction, de forts taux de corticostérone sont associés à une détérioration marquée de la condition corporelle (Kitaysky *et al.* 1999). La présente étude montre qu'**une diminution de la condition corporelle par l'administration de corticostérone ou encore par l'allongement de la période de jeûne affecte négativement les taux plasmatiques d'immunoglobulines et la réponse cellulaire, respectivement.** L'immunosuppression observée pourrait ainsi être médiée par les variations de la masse corporelle. Ce résultat tend lui aussi à étayer l'hypothèse d'allocation optimale des ressources. Il serait alors très intéressant de prolonger expérimentalement les femelles jusqu'en phase III du jeûne pour examiner les effets combinés d'une corticostéronémie élevée et d'une perte de masse importante sur les composantes acquises de l'immunité. Or, une telle situation s'avère délicate chez les femelles d'eider en captivité en raison des difficultés à les réalimenter. Nous avons donc réalisé cette expérience chez des mâles de manchot royal chez lesquels la réalimentation s'effectue sans problème.

4.3.2. Induction de la phase III du jeûne chez le mâle de manchot royal

Nous avons mis en évidence que l'entrée en phase III de manchots captifs, synonyme d'une sévère déplétion énergétique, est caractérisée par une diminution de 40 % des taux plasmatiques d'immunoglobulines (article VI). A cause du stress de captivité, les taux de corticostérone sont trois à quatre fois plus élevés chez des manchots captifs en début de jeûne par rapport aux oiseaux se reproduisant dans leur milieu naturel. Cependant, les



concentrations des autres hormones telles que la testostérone ou les hormones thyroïdiennes ne sont pas significativement différentes de celles des oiseaux sauvages. La diminution de l'immunité humorale concomitante à l'entrée en phase III semble ainsi imputable à l'hypercorticotéronémie. Par contre, nous ne pouvons pas établir à ce stade si la corticostérone induit une dépression immunitaire de façon directe ou par le biais de l'induction de la protéolyse.

5- Augmentation de l'immunocompétence cours du jeûne de mue chez le manchot royal

Nous avons préalablement établi une diminution des deux composantes immunitaires acquises (article I) et le maintien de l'immunité innée (article II) au cours du jeûne d'incubation chez les femelles d'eider à duvet. Nous avons également mis en évidence une diminution de l'immunité humorale au début du jeûne de reproduction de mâles de manchots alors que celle-ci semble maintenue à des valeurs moyennes du milieu jusqu'en fin de jeûne d'incubation (article VI). Nous avons par ailleurs démontré l'importance de l'état des réserves lipidiques sur l'état de la fonction immunitaire. Or, le jeûne de reproduction est associé à un contexte hormonal particulier. Ceci nous empêche de discriminer les effets de l'état des réserves lipidiques de ceux liés à l'effort reproducteur. Par conséquent, nous avons voulu vérifier l'effet immunosuppresseur de la déplétion des réserves lipidiques sur l'immunité en déterminant l'impact sur l'immunocompétence d'un autre type de jeûne, c'est-à-dire associé à un contexte hormonal et des besoins nutritionnels différents de celui de la reproduction. Nous nous sommes ainsi intéressés aux effets immunomodulateurs du jeûne de mue chez des manchots royaux. Partant du constat que le jeûne de mue est énergétiquement plus coûteux que le jeûne de reproduction, laissant les oiseaux sans réserves lipidiques à la fin de la mue (Gauthier-Clerc *et al.* 2002), on s'attend à ce que le jeûne de mue induise une dépression immunitaire. Contrairement à nos prédictions, nous observons que **le jeûne de mue des manchots est associé à l'augmentation progressive de leurs taux plasmatiques d'immunoglobulines** atteignant 40 % en fin de mue (article VI ; figure 25). Ce résultat conforte les observations de Sanz *et al.* (2004) et de Moreno *et al.* (2001) qui montrent une augmentation de l'immunité au cours de la mue chez les mâles de gobemouche noir. Moreno *et al.* (2001) ont en effet montré que chez certaines espèces d'oiseaux, la mue est associée à une hypertrophie des organes lymphoïdes tels que le thymus ou la rate. Cependant, la finalité



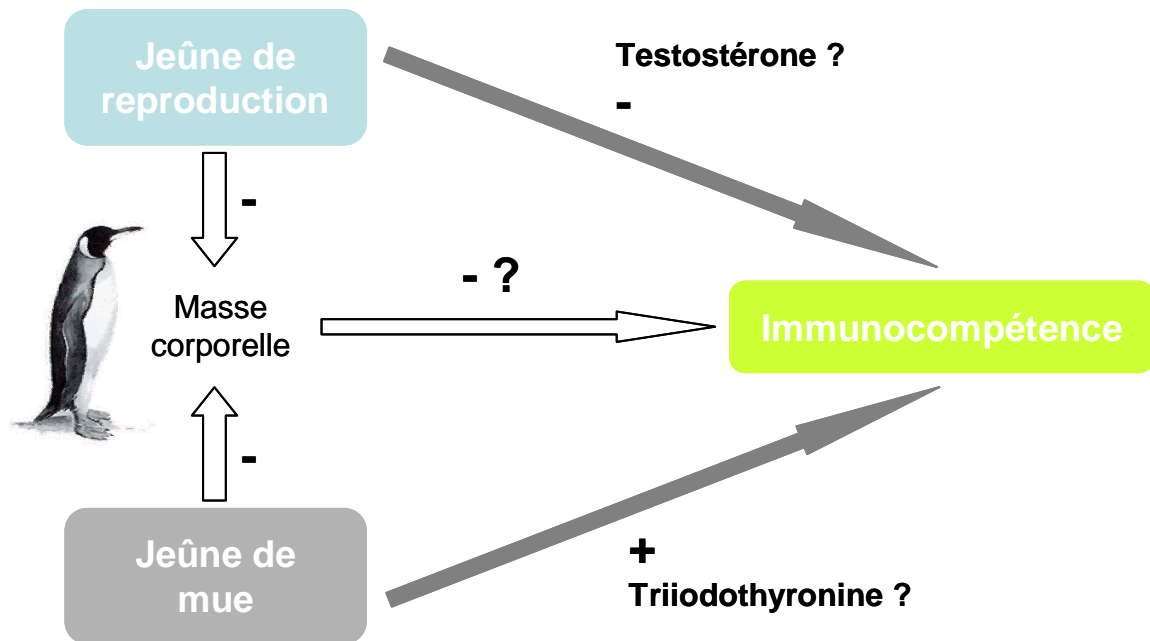


Figure 25. Effets respectifs des jeûnes de reproduction et de mue sur l'immunocompétence de mâles de manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) : résultats obtenus.

d'un tel phénomène reste incertaine. Elle pourrait tout d'abord être imputable à l'expansion du système circulatoire nécessitant une production lymphocytaire augmentée. Elle pourrait encore servir à éviter les infections consécutives aux plaies de la peau occasionnées par les follicules des plumes en croissance (Moreno 2004). Ainsi, la stimulation du système immunitaire observée pendant la mue pourrait être un mécanisme fonctionnel servant à compenser l'altération de la peau qui constitue une barrière physique naturelle contre les pathogènes. Cependant, les mécanismes proximaux favorisant l'augmentation de l'immunité restent indéterminés. Chez le manchot royal, nous avons mis en évidence que l'augmentation des taux d'immunoglobulines est associée à une augmentation progressive des taux de T_3 alors que les taux de T_4 restent élevés tout au long de la mue. La stimulation du système immunitaire pourrait ainsi être facilitée par les hormones thyroïdiennes. Dans la littérature, ces hormones ont déjà été impliquées dans la régulation du système immunitaire bien que leur rôle n'ait pas encore été clairement défini (Smits *et al.* 2002). En effet, la dépression des hormones thyroïdiennes est associée à une suppression de l'activité des cellules T cytotoxiques chez des canards colvert (Fowles *et al.* 1997) alors qu'elle conduit à l'augmentation *in vitro* de la réponse proliférative des cellules T envers une stimulation mitogénique (Williamson *et al.* 1990). Nous postulons que les effets immunomodulateurs de ces hormones pourraient être dépendants du contexte hormonal associé à un état métabolique donné. En effet, nous avons constaté qu'un apport exogène de T_3 contribue à altérer le système immunitaire et la condition corporelle au cours du jeûne de reproduction chez des femelles d'eider à duvet. A l'inverse, les taux naturellement élevés en T_3 au cours du jeûne de mue semblent associés à une augmentation de l'immunité humorale de mâles de manchot royal.

6- CONCLUSION

Ces résultats suggèrent que les femelles d'eider à duvet allouent préférentiellement leurs ressources à l'effort reproducteur, cela au détriment des deux composantes du système immunitaire acquis, et indépendamment de leur taille de couvée initiale. Cependant, les variations d'une composante ne semblent pas être un bon indicateur des variations de l'autre composante. Ceci conforte bien l'idée qu'une évaluation de toutes les composantes immunitaires s'impose afin d'évaluer une éventuelle immunoredistribution entre les différentes composantes. Les femelles semblent justement préserver l'intégrité de leur réponse



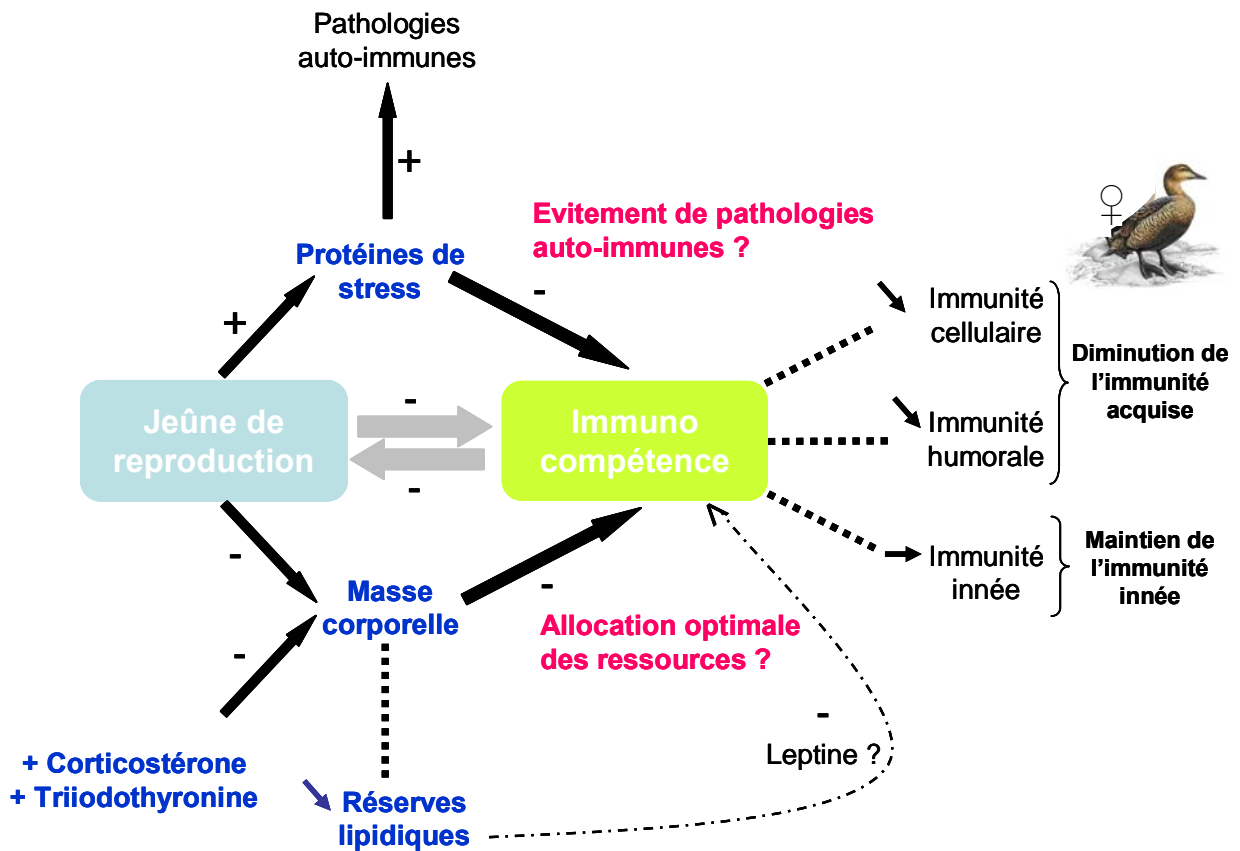


Figure 26. Compromis entre l'effort reproducteur (jeûne d'incubation) et les trois composantes (composantes cellulaire et humorale de l'immunité acquise et composante innée) du système immunitaire chez les femelles d'eider à duvet (*Somateria mollissima*) : résultats obtenus.

immunitaire innée au cours de l'incubation (figure 26). L'augmentation de l'expression des protéines de stress, concomitante à la dépression immunitaire, nous laisse par ailleurs penser qu'une des causes ultimes de la dépression immunitaire au cours de la reproduction pourrait être l'évitement de pathologies auto-immunes. Afin de limiter ces risques, qui augmentent en période de reproduction, le système immunitaire serait alors rétro-régulé. De plus, bien que nous n'apportons pas de preuves tangibles concernant l'existence d'un coût énergétique lié à l'activation d'une réponse immunitaire, nous n'excluons pas pour autant l'hypothèse d'allocation optimale des ressources. En effet, nous avons établi que des implants hormonaux de corticostérone et de triiodothyronine induisent une perte de masse et une dépression immunitaire plus importantes chez les femelles implantées par rapport aux femelles contrôles. Ces résultats confortent l'existence d'un lien préalablement établi entre les réserves, notamment lipidiques, et le système immunitaire. Le tissu adipeux, en plus d'être un lieu de stockage des lipides, peut également agir comme un organe endocrine responsable de la synthèse et de la sécrétion de plusieurs hormones biologiquement actives. La leptine, hormone sécrétée par le tissu adipeux, a été impliquée dans la stimulation d'une variété de paramètres immunologiques. Or, les taux de leptine circulante sont généralement proportionnels à la quantité de lipides de réserve. Ainsi, la diminution de la disponibilité en réserves lipidiques observée au cours du jeûne de reproduction pourrait affecter l'immunité via des changements endocriniens autres que ceux étudiés dans ce travail. L'ensemble des données que nous avons recueillies constitue ainsi les bases sur lesquelles pourra s'appuyer notre réflexion pour l'élaboration de nouvelles investigations.

7- PERSPECTIVES

1) Nous avons établi que l'induction d'une perte de masse augmentée tend à accroître la dépression immunitaire. Il serait donc tout d'abord très intéressant de manipuler expérimentalement la disponibilité des réserves lipidiques et d'examiner l'impact d'une telle manipulation sur l'immunocompétence de femelles d'eider à duvet au cours du jeûne d'incubation. Plus généralement, il s'agirait d'évaluer l'interrelation entre la condition corporelle des femelles et l'état de leur système immunitaire. Pour ce faire, deux approches sont envisageables. La première vise à manipuler les concentrations en **leptine** chez des femelles d'eider à duvet au cours du jeûne d'incubation. En effet, les taux



plasmatiques de leptine sont proportionnels à la quantité des lipides de réserves. On peut alors prédire qu'un apport exogène en leptine par implants, qui simulerait par conséquent des réserves lipidiques importantes, devrait limiter la dépression immunitaire, voire l'empêcher. La deuxième approche projetée d'évaluer directement la condition corporelle de femelles en relation avec leur immunocompétence. Ce point pourrait être envisagé en développant des méthodes de **mesures de composition corporelle non invasives** telle que la méthode de l'eau doublement marquée. Cette technique consiste à injecter des isotopes radioactifs stables dont la décroissance renseigne sur la composition corporelle des oiseaux. Cependant, cette technique impose un suivi strict et régulier qui peut s'avérer compliqué à mettre en oeuvre sur des femelles sauvages. Il serait alors utile d'utiliser en complément un **modèle aviaire de laboratoire** tel que le canard colvert, en soumettant les oiseaux à différents stress nutritionnels contrôlés, allant de quelques jours de jeûne jusqu'à l'entrée en phase III suivis ou non d'une réalimentation en passant par différents états physiologiques intermédiaires. Le sacrifice de ces oiseaux nous permettrait de corréliser leur condition corporelle (alors mesurée par des méthodes biochimiques) à leur immunocompétence. On s'attend à une corrélation positive entre la disponibilité des réserves et l'immunité des oiseaux aboutissant à des profils immunitaires superposables à ceux des réserves.

2) Des travaux ont plus récemment évoqué le **stress oxydatif** comme un coût potentiel de la reproduction (Wiersma *et al.* 2004 ; Bertrand *et al.* 2006). En outre, le stress oxydatif, augmenté au cours d'un événement reproducteur (Nilsson 2002 ; Wiersma *et al.* 2004), tendrait à induire une dépression immunitaire (Alonso-Alvarez *et al.* 2004). Les relations entre l'immunocompétence et le stress oxydatif et leurs conséquences potentielles sur le compromis entre la survie et la reproduction mériteraient par conséquent de faire l'objet de nouvelles approches expérimentales. Nous pourrions tout d'abord envisager de quantifier **les effets d'un effort reproducteur accru** sur les processus immunologiques et antioxydants. Le stress oxydatif pourrait être quantifié par la mesure de la résistance globale du sang vis-à-vis de l'agression de radicaux libres (test KRL ; Alonso-Alvarez *et al.* 2004). Cette technique non invasive rendrait par ailleurs possible l'étude des effets à long-terme chez des oiseaux se reproduisant en milieu naturel. Ensuite, si la dépression immunitaire s'avère être un effet secondaire d'une plus grande production de radicaux libres, un apport exogène en antioxydants ne devrait pas aboutir à une diminution de



l'immunité. Pour tester cette prédiction, nous pourrions augmenter artificiellement la taille de couvée de femelles d'eider à duvet au cours de leur jeûne de reproduction en combinaison avec un **traitement antioxydant** par injection de vitamine C et mesurer l'impact sur l'immunocompétence et le stress oxydatif.

3) Enfin, l'existence de compromis entre l'effort reproducteur et l'immunocompétence de femelles d'eider à duvet étant établie, il apparaît indispensable de mesurer leurs effets à long-terme sur la fitness des individus c'est-à-dire leur survie et leur succès reproducteur futur. En effet, documenter les effets à court-terme d'un effort reproducteur sur l'immunocompétence reste une étape indispensable mais non suffisante pour définir la dépression immunitaire comme un coût potentiel de la reproduction tel qu'il est défini par Williams (1966). Néanmoins, chez les espèces longévives, la manifestation du coût de la reproduction est attendue davantage en terme de fécondité réduite plutôt qu'en terme de diminution de la survie (Charlesworth 1980 ; Lindén et Møller 1989). Les investigations menées par Hanssen *et al.* (2004 ; 2005) sur les eiders à duvet restent insuffisantes dans la mesure où les impacts d'une manipulation de l'effort parental ou d'une activation de l'immunité sur le taux de retour et/ou la taille de couvée n'ont été déterminés que l'année suivante. Or, nous avons préalablement évoqué que les femelles ont une tendance naturelle à alterner cycliquement des tailles de couvée importantes, faibles ou nulles (Yoccoz *et al.* 2002). Il faudrait donc envisager **un suivi à plus long-terme** de nos populations par l'utilisation d'étiquettes électroniques permettant une identification automatique.

* * *



F- Références bibliographiques



- Adamo, S.A. 2004. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour*, 68, 1443-1449.
- Ahima, R.S., Flier, J.S. 2000. Leptin. *Annual Review of Physiology*, 62, 413-437.
- Alexander, R. McN. 1999. *Energy for animal life*. Oxford University Press.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G. 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters*, 7, 363-368.
- Andersson, M. 1994. *Sexual Selection*. Princeton, New Jersey, Princeton University Press.
- Apanius, V. 1998. Stress and Immune Defense. *Advances in the Study of Behavior*, 27, 133-153.
- Ardia, D.R., Schat, K.A., Winkler, D.W. 2003. Reproductive effort reduces long-term immune function in breeding tree swallows (*Tachycineta bicolor*). *Proceedings of the Royal Society of London*, 270, 1679-1683.
- Bachman, S.E., Mashaly, M.M. 1987. Relationship between circulating thyroid hormones and cell-mediated immunity in immature male chickens. *Developmental and Comparative Immunology*, 11 (1), 203-213.
- Barrat, A. 1976. Quelques aspects de la biologie et de l'écologie du manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) des îles Crozet. *Comité National Finlandais de la Recherche en Antarctique*, 40, 9-51.
- Bellrose, F.C. 1980. *Ducks, Geese and Swans of North America*. The Stackpole Company, Harrisburg, Pennsylvanie, 355-364.
- Bendich, A. 1996. Antioxidant vitamins and human immune responses. *Vitamins and Hormones*, 52, 35-62.
- Bertrand, S., Alonso-Alvarez, C., Devevey, G., Faivre, B., Prost, J., Sorci, G. 2006. Carotenoids modulate the trade-off between egg production and resistance to oxidative stress in zebra finches. *Oecologia*, 147 (4), 576-584.
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B., Sorci, G. 2003. Assessing the cost of mounting an immune response. *The American Naturalist*, 161 (3), 367-379.
- Bourgeon, S., Criscuolo, F., Bertile, F., Raclot, T., Gabrielsen, G.W., Massemin, S. 2006. Effects of clutch sizes and incubation stage on nest desertion in the female Common Eider *Somateria mollissima* nesting in the high Arctic. *Polar Biology*, 29, 358-363.
- Braude, S., Tang-Martinez, Z., Taylor, G.T. 1999. Stress, testosterone, and the immunoredistribution hypothesis. *Behavioral Ecology*, 10(3), 345-350.
- Buchanan, K.L., Evans, M.R., Goldsmith, A.R. 2003. Testosterone, dominance signalling and immunosuppression in the house sparrow, *Passer domesticus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55, 50-59.
- Buntin, J.D. 1996. Neural and hormonal control of parental behaviour in birds. *Advances in the Study of Behavior*, 25, 161-213.



- Bustnes, J.O., Erikstad, K.E. 1991. Parental care in the common eider (*Somateria mollissima*): factors affecting abandonment and adoption of young. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 1538-1545.
- Cahill, G.F. 1976. Starvation in man. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, 5, 397-414.
- Calder, W.A. 1994. When do hummingbirds use torpor in nature? *Physiological Zoology*, 67, 1051-1076.
- Chai, P. 1997. Hummingbird hovering energetics during moult of primary flight feathers. *Journal of Experimental Biology*, 200, 1527-1536.
- Challet, E., Le Maho, Y., Robin, J-P., Malan, A., Cherel, Y. 1995. Involvement of corticosterone in the fasting-induced rise in protein utilization and locomotor activity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 50, 405-412.
- Charlesworth, B. 1980. *Evolution in age-structured populations*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Cherel, Y., Charassin, J-B., Challet, E. 1994a. Energy and protein requirements for molt in the king penguin *Aptenodytes patagonicus*. *American Journal of Physiology*, 266 (35), R1182-R1188.
- Cherel, Y., Groscolas, R. 1998. Relationships between nutrient storage and nutrient utilization in long-term fasting birds and mammals. *Proceedings of the 22nd International Congress of Ornithology*, Durban, South Africa.
- Cherel, Y., Leloup, J., Le Maho, Y. 1988a. Fasting in king penguins. II. Hormonal and metabolic changes during molt. *American Journal of Physiology*, 254(23), R178-R184.
- Cherel, Y., Le Maho, Y. 1985. Five months of fasting in king penguin chicks: body mass loss and fuel metabolism. *American Journal of Physiology*, 249, R387-R392.
- Cherel, Y., Mauget, R., Lacroix, A., Gilles, J. 1994b. Seasonal and fasting-related changes in circulating gonadal steroids and prolactin in king penguins, *Aptenodytes patagonicus*. *Physiological Zoology*, 67, 1154-1173.
- Cherel, Y., Robin, J-P., Heitz, A., Calgari, C., Le Maho, Y. 1992. Relationships between lipid and availability and protein utilization during prolonged fasting. *Journal of Comparative Physiology B*, 162, 305-313.
- Cherel, Y., Robin, J-P., Walch, O., Karmann, H., Netchitailo, P., Le Maho, Y. 1988b. Fasting in king penguins. I. Hormonal and metabolic changes during breeding. *American Journal of Physiology*, 254(23), R170-R177.
- Cichon, M., Dubiec, A., Chadzinska, M. 2001. The effect of elevated reproductive effort on humoral immune function in collared flycatcher females. *Acta Oecologica*, 22, 71-76.
- Criscuolo, F., Chastel, O., Bertile, F., Gabrielsen, G.W., Le Maho, Y., Raclot, T. 2005. Corticosterone alone does not trigger a short term behavioural shift in incubating female common eiders *Somateria mollissima*, but does modify long term reproductive success. *Journal of Avian Biology*, 36, 306-312.
- Criscuolo, F., Chastel, O., Gabrielsen, G.W., Lacroix, A., Le Maho, Y. 2002. Factors affecting plasma concentrations of prolactin in the Common Eider *Somateria mollissima*. *General and Comparative Endocrinology*, 125, 399-409.



- Criscuolo, F., Gauthier-Clerc, M., Gabrielsen, G.W., Le Maho, Y. 2000. Recess behaviour of the incubating Common Eider *Somateria mollissima*. *Polar Biology*, 23, 571-574.
- Criscuolo, F., Raclot, T., Le Maho, Y., Gabrielsen, G.W. 2003. Do T₃ levels in incubating Eiders reflect the cost of incubation among clutch sizes? *Physiological and Biochemical Zoology*, 76(2), 196-203.
- Deerenberg, C., Arpanius, V., Daan, S., Bos, N. 1997. Reproductive effort decreases antibody responsiveness. *Proceedings of the Royal Society of London*, 264, 1021-1029.
- Demas, G.E., Chefer, V., Talan, M.I., Nelson, R.J. 1997. Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology*, 273, R1631-R1637.
- Demas, G.E., Drazen, D.L., Nelson, R.J. 2003. Reductions in total body fat decrease humoral immunity. *Proceedings of the Royal Society of London*, 270, 905-911.
- Demas, G.E., Sakaria, S. 2005. Leptin regulates tradeoffs between body fat and humoral immunity. *Proceedings of the Royal Society of London*, 272, 1845-1850.
- Dewasmes, G., Buchet, C., Geloën, A., Le Maho, Y. 1989. Sleep changes in emperor penguins during fasting. *American Journal of Physiology*, 256, R476-R480.
- Dewasmes, G., Cohen-Ada, F., Koubi, H., Le Maho, Y. 1984. Sleep changes in long-term fasting geese in relation to lipid and protein metabolism. *American Journal of Physiology*, 247, R663-R671.
- Duffy, D.L., Bentley, G.E., Drazen, D.L., Ball, G.F. 2000. Effects of testosterone on cell-mediated and humoral immunity in non-breeding adult European starlings. *Behavioral Ecology*, 11 (6), 654-662.
- Eraud, C., Duriez, O., Chastel, O., Faivre, B. 2005. The energetic cost of humoral immunity in the Collared Dove, *Streptopelia decaocto*: is the magnitude sufficient to force energy-based trade-offs? *Functional Ecology*, 19, 110-118.
- Erf, G.C., Marsh, J.A. 1989. Effect of dietary triiodothyronine on mixed-lymphocyte responsiveness in young male chickens. *Developmental and Comparative Immunology*, 13 (2), 177-186.
- Erikstad, K.E., Bustnes, J.O. 1994. Clutch size determination in Common Eiders: an egg removal and egg addition experiment. *Journal of Avian Biology*, 25, 215-218.
- Erikstad, K.E., Bustnes, J.O., Moum, T. 1993. Clutch-size determination in precocial birds: a study of the Common Eider. *The Auk*, 110 (3), 623-628.
- Erikstad, K.E., Tveraa, T. 1995. Does the cost of incubation set limits to clutch size in common eiders *Somateria mollissima*. *Oecologia*, 103, 270-274.
- Faggioni, R., Feingold, K.R., Grunfeld, C. 2001. Leptin regulation of the immune response and the immuno-deficiency of malnutrition. *FASEB Journal*, 15, 2565-2571.
- Faivre, B., Préault, M., Salvadori, F., Théry, M., Gaillard, M., Cézilly, F. 2003. Bill colour and immunocompetence in the European blackbird. *Animal Behaviour*, 65, 1125-1131.
- Faivre, B., Préault, M., Théry, M., Secondi, J., Patris, B., Cézilly, F. 2001. Pairing pattern, morphological characters and individual quality in an urban population of blackbirds *Turdus merula*. *Animal Behaviour*, 61, 969-974.



- Feder, M.E., Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61, 243-282.
- Ferens, B. 1962. Notes on the behaviour and activity of birds during the polar day in the arctic. *Prace Zoologiczne*, 6, 137-158.
- Folstad, I., Karter, A. J. 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *The American Naturalist*, 139, 603-622.
- Fowles, J.R., Fairbrother, A., Kerkvliet, N.I. 1997. Effects of induced hypo- and hyperthyroidism on immune function and plasma biochemistry in mallards (*Anas platyrhynchos*). *Comparative and Biochemical Physiology*, 118C (2), 213-220.
- Gabarrou, J-F., Duchamp, C., Williams, J., Géraert, P-A. 1997. A role for thyroid hormones in the regulation of diet-induced thermogenesis in birds. *British Journal of Nutrition*, 78, 963-973.
- Gabrielsen, G.W., Melhum, F., Karlsen, H.E., Andresen, Ø, Parker, H. 1991. Energy cost during incubation and thermoregulation in the female Common Eider *Somateria mollissima*. *Norsk Polarinstitut Skrifter*, 195, 51-62.
- Gauthier-Clerc, M., Le Maho, Y., Gendner, J-P., Handrich, Y. 2002. Moulting fast and time constraint for reproduction in the king penguin. *Polar Biology*, 25 (4), 288-295.
- Gorman, M.L., Milne, H. 1971. Seasonal changes in the adrenal steroid tissue of the Common Eider *Somateria mollissima* and its relation to organic metabolism in normal and oil-polluted birds. *Ibis*, 113, 218-227.
- Green, J.A., Butler, P.J., Woakes, A.J., Boyd, I.L. 2004. Energetics of the moult fast in female macaroni penguins *Eudyptes chrysolophus*. *Journal of Avian Biology*, 35, 153-161.
- Greenman, C.G., Martin II, L.B., Hau, M. 2005. Reproductive state, but not testosterone, reduces immune function on male house sparrows (*Passer domesticus*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(1), 60-68.
- Groscolas, R., Chereil, Y. 1992. How to molt while fasting in the cold: the metabolic and hormonal adaptations of Emperor and King penguins. *Ornis Scandinavia*, 23, 328-334.
- Groscolas, R., Rrobin, J-P. 2001. Long-term fasting and re-feeding in penguins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 128, 645-655.
- Gross, W.G., Siegel, P.B., Hall, W., Domermuth, C.H., DuBoise, R.T. 1980. Production and persistence of antibodies in chicken to sheep erythrocytes. 2. Resistance to infectious diseases. *Poultry Science*, 59, 205-210.
- Gullo, C.A., Teoh, G. 2004. Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunology Letters*, 94, 1-10.
- Gustafsson, L., Nordling, D., Andersson, M.S., Sheldon, B.C., Quarnstrøm, A. 1994. Infectious disease, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 346, 323-331.
- Hamilton, W.D., Zuk, M. 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science*, 218 (4570), 384-387.
- Hangalapura, B.N., Nieuwland, M.G.B., Buyse, J., Kemp, B., Parmentier, H.K. 2005. Effect of duration of cold stress on plasma adrenal and thyroid hormone levels and immune



- responses in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poultry Science*, 83, 1644-1649.
- Hanssen, S.A., Erikstad, K.E., Johnsen, V., Bustnes, J.O. 2003b. Differential investment and costs during avian incubation determined by individual quality: an experimental study of the common eider (*Somateria mollissima*). *Proceedings of the Royal Society of London*, 270, 531-537.
- Hanssen, S.A., Folstad, I., Erikstad, K.J. 2003a. Reduced immunocompetence and cost of reproduction in common eiders. *Oecologia*, 136, 457-464.
- Hanssen, S.A., Hasselquist, D., Folstad, I., Erikstad, K.E. 2004. Costs of immunity: immune responsiveness reduces survival in a vertebrate. *Proceedings of the Royal Society of London*, 271, 925-930.
- Hanssen, S.A., Hasselquist, D., Folstad, I., Erikstad, K.E. 2005. Cost of reproduction in a long-lived bird: incubation effort reduces immune function and future reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London*, 272, 1039-1046.
- Hasselquist, D., Marsh, J.A., Sherman, P.W., Wingfield, J.C. 1999. Is avian humoral immunocompetence suppressed by testosterone? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 45, 167-175.
- Hausmann, M.F., Winkler, D.W., Huntington, C.E., Vleck, D., Sanneman, C.E., Hanley, D., Vleck, C.M. 2005. Cell-mediated immunosenescence in birds. *Oecologia*, 145 (2), 270-275.
- Hickman-Miller, H.D., Hildebrand, W.H. 2004. The immune response under stress: the role of HSP-derived peptides. *Trends in Immunology*, 25(8), 427-433.
- Hillgarth, N., Ramenofsky, M., Wingfield, J.C. 1996. Testosterone and sexual selection. *Behavioral Ecology*, 8, 108-112.
- Hoffmann, A.A., Parsons, P.A. 1991. *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press, New York.
- Hohtola, E., Hissa, R., Pyörnilä, A., Rintamäki, H., Saarela, S. 1991. Nocturnal hypothermia in fasting Japanese quail: the effect of ambient temperature. *Physiology & Behavior*, 49, 563-567.
- Hollmén, T., Franson, J.C., Hario, M., Sankari, S., Kilpi, M., Lindström, K. 2001. Use of serum biochemistry to evaluate nutritional status and health of incubating Common Eiders (*Somateria mollissima*) in Finland. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74(3), 333-342.
- Holmgren, N., Hedenström, A. 1995. The scheduling of molt in migratory birds. *Evolutionary Ecology*, 9, 354-368.
- Hörak, P., Ots, I., Murumägi, A. 1998. Hematological health state indices of reproducing Great Tits: a response to brood size manipulation. *Functional Ecology*, 12, 750-756.
- Hörak, P., Saks, L., Ots, I., Kullisaar, T., Kollist, H., Zilmer, M. 2003. Physiological effects of immune challenge in captive greenfinches (*Carduelis chloris*). *Canadian Journal of Zoology*, 81, 371-379.
- Ilmonen, P., Hasselquist, D., Langefors, Å., Wiehn, J. 2003. Stress, immunocompetence and leukocyte profiles of pied flycatchers in relation to brood size manipulation. *Oecologia*, 136, 148-154.



- Ilmonen, P., Taarna, T., Hasselquist, D. 2000. Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proceedings of the Royal Society London*, 267, 665-670.
- Ilmonen, P., Taarna, T., Hasselquist, D. 2002. Are incubation costs in female pied flycatchers expressed in humoral immune responsiveness or breeding success? *Oecologia*, 130, 199-204.
- Isaken, K., Bakken, V. 1995. Important moulting areas for seabirds in Svalbard. *Norsk Polarinstitut Skrifter*, 135, 11-35.
- Johnsen, T.S., Zuk, M. 1999. Parasites and tradeoffs in the immune response of female red jungle fowl. *Oikos*, 86, 487-492.
- Keesey, R.E., Hirvonen, M.D. 1997. Body weight set-point: determination and adjustment. *Journal of Nutrition*, 127, S1875-S1883.
- Keil, D., Luebke, R.W., Pruett, S.B. 2001. Quantifying the relationship between multiple immunological parameters and host resistance: probing the limits of reductionism. *Journal of Immunology*, 167, 4543-4552.
- King, J.R., Farmer, D.S. 1965. Studies of fat deposition in migratory birds. Wipple H. (Eds). *Adipose tissue metabolism and obesity*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 131, 422-440.
- Kitaysky, A.S., Piatt, J.F., Wingfield, J.C., Romano, M. 1999. The adrenocortical stress-response of black-legged kittiwake chicks in relation to dietary restrictions. *Journal of Comparative Physiology B*, 169, 303-310.
- Klaassen, M. 1995. Molt and basal metabolic costs in males of two subspecies of Stonechats: the European (*Saxicola torquata rubicola*) and the African (*S. t. axillaries*). *Oecologia*, 104, 424-432.
- Klasing, K.C., Laurin, D.E., Peng, R.K., Fry, D.M. 1987. Immunologically mediated growth depression in chicks: influence of feed intake, corticosterone and interleukin-1. *The Journal of Nutrition*, 117 (9), 1629-1637.
- Korschgen, C.E. 1977. Breeding stress of female Eiders in Maine. *Journal of Wildlife Management*, 41(3), 360-373.
- Lamb, J.R., Bal, V., Rothbard, J.B., Mehlert, A., Mendez-Samperio, P., Young, D.B. 1989. The mycobacterial stress protein: a common target of T-cell recognition in infection and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 2 (supplement), 93-100.
- Le Maho, Y., Delclitte, P., Chatonnet, J. 1976. Thermoregulation in fasting emperor penguins under natural conditions. *American Journal of Physiology*, 231, 913-922.
- Le Maho, Y., Robin, J-P., Cherel, Y. 1988. Starvation as a treatment for obesity: the need to conserve body protein. *Neural Information Processing Systems*, 3, 21-24.
- Le Maho, Y., Vu Van Kha, H., Koubi, H., Dewasmes, G., Girard, J., Ferré, P., Cagnard, M. 1981. Body composition, energy expenditure, and plasma metabolites in long-term fasting geese. *American Journal of Physiology*, 241, E342-E354.
- Le Ninan, F., Cherel, Y., Robin, J-P., Leloup, J., Le Maho, Y. 1988a. Early changes in plasma hormones and metabolites during fasting in king penguin chicks. *Journal of Comparative Physiology B*, 158, 395-401.



- Le Ninan, F., Cherel, Y., Sardet, C., Le Maho, Y. 1988b. Plasma hormone levels in relation to lipid and protein metabolism during prolonged fasting in king penguin chicks. *General and Comparative Endocrinology*, 71, 331-337.
- Lillehoj, H.S., Li, G. 2004. Nitric oxide production by macrophages stimulated with coccidia sporozoites, lipopolysaccharide, or interferon- γ , and its dynamic changes in SC and TK strains of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Avian Diseases*, 48, 244-253.
- Lindén, M., Møller, A.P. 1989. Cost of reproduction and covariation of life history traits in birds. *Trends in Ecology & Evolution*, 4, 367-371.
- Lindström, Å., Klaassen, M., Kvist, A. 1999. Variation in energy intake and basal metabolic rate of a bird migrating in a wind tunnel. *Functional Ecology*, 13, 352-359.
- Lindström, Å., Visser, G., Daan, S. 1993. The energetic cost of feather synthesis is proportional to basal metabolic rate. *Physiological Zoology*, 6, 490-510.
- Lochmiller, R.L. 1995. Testing the immunocompetence handicap theory. *Trends in Ecology & Evolution*, 10 (9), 372-373.
- Lochmiller, R.L., Deerenberg, C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: what is the cost of immunity? *Oikos*, 88, 87-98.
- Locke, M., Noble, E.G. 1995. Stress proteins: the exercise response. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 20, 155-167.
- Lõhmus, M., Olin, M., Sundström, L.F., Troedsson, M.H.T., Molitor, T.W., El Halawani, M. 2004. Leptin increases T-cell immune response in birds. *General and Comparative Endocrinology*, 139, 245-250.
- Lõhmus, M., Sundström, L.F. 2004. Leptin and social environment influence the risk-taking and feeding behaviour of Asian blue quail. *Animal Behaviour*, 68, 607-612.
- Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R., Lechler, R.I. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 394, 897-901.
- Lozano, G.A. 1994. Carotenoids, parasites, and sexual selection. *Oikos*, 70, 309-311.
- Lourenco, G.A., Dorce, V.A., Paermo-Neto, J. 2005. Haloperidol treatments increased macrophage activity in male and female rats: influence of corticosterone and prolactin serum levels. *European Neuropsychopharmacology*, 15, 271-277.
- Lundqvist, M.L., Middleton, D.L., Radford, C., Warr, G.W., Magor, K.E. 2006. Immunoglobulins of the non-galliform birds: antibody expression and repertoire in the duck. *Developmental and Comparative Immunology*, 30, 93-100.
- MacColl, A.D.C., Hatchwela, B.J. 2003. Heritability of parental effort in a passerine bird. *Evolution*, 57 (9), 2191-2195.
- Marsh, J.A., Johnson, B.E., Lillehoj, H.S., Scanes, C.G. 1992. Effect of thyroxine and chicken growth hormone on immune function in autoimmune thyroiditis (obese) strain chickens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 199, 114-122.
- Martin II, L.B., Gilliam, J., Han, P., Lee, K., Wikelski, M. 2005. Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not in tropical house sparrows, *Passer domesticus*. *General and Comparative Endocrinology*, 140, 126-135.



- Martin II, L.B., Scheuerlein, A., Wilewski, M. 2003. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proceedings of the Royal Society of London*, 270, 153-158.
- Martin, T.E., Møller, A.P., Merino, S., Clobert, J. 2001. Does clutch size evolve in response to parasites and immunocompetence? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 2071-2076.
- Martinez, J., Perez-Serano, J., Bernadina, W.E., Rodriguez-Caabeiro, F. 1999. Using heat shock proteins as indicators of the immune function in Wistar rats during a secondary *Trichinella spiralis* infection. *Veterinary Parasitology*, 85, 269-275.
- Martinez, J., Tomás, G., Merino, S., Arriero, E., Moreno, J. 2003. Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichickens antibodies. *Functional Ecology*, 17, 700-706.
- Martinez-Padilla, J., Martinez, J., Davila, J.A., Merino, S., Moreno, J., Millán, J. 2004. Within-brood size differences, sex and parasites determine blood stress protein levels in Eurasian Kestrel nestlings. *Functional Ecology*, 18, 426-434.
- Matarese, G., La Cava, A. 2004. The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends in Immunology*, 25(4), 193-200.
- Matson, K.D., Cohen, A.A., Lasing, K.C., Ricklefs, R.E., Scheuerlein, A. 2006. No simple answers for ecological immunology: relationships among immune indices at the individual level break down at the species level in waterfowl. *Proceedings of the Royal Society of London*, 273, 815-822.
- Matson, K.D., Ricklefs, R.E., Klasing, K.C. 2005. A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate immunity in wild and domestic birds. *Developmental and Comparative Immunology*, 29, 275-286.
- Mauck, R.A., Matson, K.D., Philipsborn, J., Ricklefs, R.E. 2005. Increase in the constitutive innate humoral immune system in Leach's Storm-Petrel (*Oceanodroma leucorhoa*) chicks is negatively correlated with growth rate. *Functional Ecology*, 19, 1001-1007.
- Maynard Smith, J. 1978. 'Optimization Theory in Evolution'. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 9, 31-56.
- McEwen, B.S., Biron, C.A., Brunson, K.W., Bulloch, K., Chambers, W.H., Dhabhar, F.S., Goldfarb, R.H., Kitson, R.P., Miller, A.H., Spencer, R.L., Weiss, J.M. 1997. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Research Review*, 23, 79-133.
- McNabb, F.M.A. 1995. Thyroid hormones, their activation, degradation and effects on metabolism. *The Journal of Nutrition*, 125, S1773-S1776.
- Melhum, F. 1991. Egg predation in a breeding colony of the Common Eider *Somateria mollissima* in Kongsfjorden, Svalbard. *Norsk Polarinstitut Skrifter*, 195, 37-45.
- Merilä, J. 1997. Expression of genetic variance in body size of the collared flycatcher under different environmental conditions. *Evolution*, 51, 526-536.
- Merino, S., Martinez, J., Barbosa, A., Møller, A.P., de Lope, F., Perez, J., Rodriguez-Caabeiro, F. 1998. Increase in a heat shock protein from blood cells in response of nestling house martins (*Delichon urbica*) to parasitism: an experimental approach. *Oecologia*, 116, 342-347.



- Merino, S., Martinez, J., Møller, A.P., Barbosa, A., de Lope, F., Rodriguez-Caabeiro, F. 2001. Physiological and hematological consequences of a novel parasite on the red-rumped swallow *Hirundo daurica*. *International Journal for Parasitology*, 31, 1187-1193.
- Merino, S., Martinez, J., Møller, A.P., Barbosa, A., De Lope, F., Rodriguez-Caabeiro, F. 2002. Blood stress levels in relation to sex and parasitism of barn swallows (*Hirunda rustica*). *Ecoscience*, 9(3), 300-3005.
- Merino, S., Martinez, J., Møller, A.P., Sanabria, L., De Lope, F., Perez, J., Rodriguez-Caabeiro, F. 1999. Phytohaemagglutinin injection assay and physiological stress in nestling house martins. *Animal Behaviour*, 58, 219-222.
- Metcalf, N.B., Monaghan, P. 2001. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 254-260.
- Milne, H. 1976. Body weights and carcass composition of the Common Eider. *Wildfowl*, 27, 115-122.
- Møller, A.P., Kimball, R.T., Erritzøe, J. 1996. Sexual ornamentation, condition, and immune defence in the house sparrow *Passer domesticus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 39, 317-322.
- Monaghan, P., Nager, R.G. 1997. Why don't birds lay more eggs? *Trends in Ecology & Evolution*, 12, 270-274.
- Morales, J., Moreno, J., Merino, S., Tomás, G., Martinez, J., Garamszegi, Z. 2004. Associations between immune parameters, parasitism, and stress in breeding pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) females. *Canadian Journal of Zoology*, 82, 1484-1492.
- Moreno, J. 1993. Physiological mechanisms underlying reproductive trade-offs. *Etologia*, 3, 41-56.
- Moreno, J. 2004. Moulting-breeding overlap and fecundity limitation in tropical birds: a link with immunity? *Ardeola*, 51 (2), 471-476.
- Moreno, J., Merino, S., Martinez, J., Sanz, J.J., Arriero, E. 2002. Heterophil/lymphocyte ratios and heat-shock protein levels are related to growth in nestling birds. *Ecoscience*, 9 (4), 434-439.
- Moreno, J., Sanz, J.J., Arriero, E. 1999. Reproductive effort and T-lymphocyte cell-mediated immunocompetence in female pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 266, 1105-1109.
- Moreno, J., Sanz, J.J., Merino, S., Arriero, E. 2001. Daily energy expenditure and cell-mediated immunity in pied flycatchers while feeding nestlings: interaction with moult. *Oecologia*, 129, 492-497.
- Mougeot, F., Redpath, S.M., Pieltney, S.B. 2006. Elevated spring corticosterone increases parasite intensity in male red grouse. *Behavioral ecology*, 17 (1), 117-125.
- Mrosovsky, N., Sherry, D.F. 1980. Animal anorexias. *Science*, 207, 837-842.
- Nava, M.P., Veiga, J.P., Puerta, M. 2001. White blood cell counts in house sparrows (*Passer domesticus*) before and after moult and after testosterone treatment. *Canadian Journal of Zoology*, 79, 145-148.
- Nelson, R.J., Demas, G.E. 1996. Seasonal changes in immune function. *The Quarterly Review of Biology*, 71 (4), 511-548.



- Nilsson, J-Å. 2002. Metabolic consequences of hard work. *Proceedings of the Royal Society of London*, 269, 1735-1739.
- Nordling, D., Andersson, M., Zohari, S., Gustafsson, L. 1998. Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proceedings Royal Society of London*, 265, 1291-1298.
- Norris, K., Evans, M.R. 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology*, 11(1), 19-26.
- Ost, M., Kilpi, M. 1999. Parental care influences the feeding behaviour of female eiders *Somateria mollissima*. *Annales Zoologici Fennici*, 36, 195-204.
- Ots, I., Hõrak, P. 1996. Great tits *Parus major* trade health for reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London*, 263, 1443-1447.
- Ots, I., Hõrak, P. 1998. Health impact of blood parasites in breeding great tits. *Oecologia*, 116, 441-448.
- Ots, I., Kerimov, A.B., Ivankina, E.V., Ilyina, T.A., Hõrak, P. 2001. Immune challenge affects basal metabolic activity in wintering great tits. *Proceedings of the Royal Society of London*, 268, 1175-1181.
- Owens, I.P.F., Wilson, K. 1999. Immunocompetence: a neglected life history trait or conspicuous red herring? *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 170-172.
- Pap, P.L., Markus, R. 2003. Cost of reproduction, T-lymphocyte mediated immunocompetence and health status in female and nestling barn swallows *Hirundo rustica*. *Journal of Avian Biology*, 34, 428-434.
- Parker, H., Holm, H. 1990. Patterns of nutrient and energy expenditure in female Common Eiders nesting in the arctic. *Auk*, 107, 660-668.
- Peters, A. 2000. Testosterone treatment is immunosuppressive in superb fairy-wrens, yet free-living males with high testosterone are more immunocompetent. *Proceedings of the Royal Society of London*, 267, 883-889.
- Piersma, T., Lindström, Å. 1997. Rapid reversible changes in organ size as a component of adaptive behaviour. *Trends in Ecology & Evolution*, 12, 134-138.
- Råberg, L., Grahn, M., Hasselquist, D., Svensson, E. 1998. On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proceedings Royal Society of London*, 265, 1637-1641.
- Råberg, L., Nilsson, J-Å., Ilmonen, P., Stjernman, M., Hasselquist, D. 2000. The cost of an immune response: vaccination reduces parental effort. *Ecology Letters*, 3, 382-386.
- Ricklefs, R.E. 2000. Density dependence, evolutionary optimization, and the diversification of avian life histories. *Condor*, 102, 9-22.
- Ricklefs, R.E., Wikelski, M. 2002. The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology & Evolution*, 17 (10), 462-468.
- Roberts, M.L., Buchanan, K.L., Evans, M.R. 2004. Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Animal Behaviour*, 68, 227-239.
- Robin, J-P., Boucontet, L., Chillet, P., Groscolas, R. 1998. Behavioral changes in fasting emperor penguins: evidence for a "refeeding signal" linked to a metabolic shift. *American Journal of Physiology*, 274(43), R746-R753.



- Robin, J-P., Frain, M., Sardet, C., Groscolas, R., Le Maho, Y. 1988. Protein and lipid utilization during long-term fasting in emperor penguins. *American Journal of Physiology*, 254, R61-R68.
- Rodriguez, A.B., Barriga, C., Lea, R.W. 1996. Effect of prolactin, *in vivo* and *in vitro*, upon heterophil phagocytic function in the ring dove (*Streptopelia risoria*). *Developmental and Comparative Immunology*, 20 (6), 451-457.
- Rodriguez, A.B., Ortega, E., Lea, R.W., Barriga, C. 1997. Melatonin and the phagocytic process of heterophils from the ring dove (*Streptopelia risoria*). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 168 (1-2), 185-190.
- Rodriguez, A.B., Terron, M.P., Duran, J., Ortega, E., Barriga, C. 2001. Physiological concentrations of melatonin and corticosterone affect phagocytosis and oxidative metabolism of ring dove heterophils. *Journal of Pineal Research*, 31, 31-38.
- Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K. 1998. *Immunology*. London, Mosby.
- Romero, L.M. 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 128, 1-24.
- Romero, L.M. 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(5), 249-255.
- Rubolini, D., Romano, M., Boncoraglio, G., Ferrari, R.P., Martinelli, R., Galeotti, P., Fasola, M., Saino, N. 2005. Effects of elevated egg corticosterone levels on behavior, growth, and immunity of yellow-legged gull (*Larus michahellis*) chicks. *Hormones and Behavior*, 47, 592-605.
- Saino, N., Calza, S., Møller, A.P. 1997. Immunocompetence of nestling barn swallows in relation to brood size and parental effort. *Journal of Animal Ecology*, 66, 827-836.
- Saino, N., Incagli, M., Martinelli, R., Møller, A.P. 2002. Immune response of male barn swallows in relation to parental effort, corticosterone plasma levels, and sexual ornamentation. *Behavioral Ecology*, 13, 169-174.
- Saino, N., Suffritti, C., Martinelli, R., Rubolini, D., Møller, A.P. 2003. Immune response covaries with corticosterone plasma levels under experimentally stressful conditions in nestling barn swallows (*Hirundo rustica*). *Behavioral Ecology*, 14 (3), 318-325.
- Salman, H., Bergman, M., Bessler, H., Alexandrova, S., Straussberg, R., Zahavi, I., Djaldetti, M. 1998. Effect of three days starvation on the phagocytic activity of rat peritoneal macrophages. *Acta Haematologica*, 100 (1), 17-21.
- Sanz, J.J., Moreno, J., Merino, S., Tomás, G. 2004. A trade-off between two resource-demanding functions: post-nuptial moult and immunity during reproduction in male pied flycatchers. *Journal of Animal Ecology*, 73, 441-447.
- Sapolsky, R., Romero, L., Munck, A. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21, 55-89.
- Sechman, A., Niezgodá, J., Soboconski, R., 1989. The relationship between basal metabolic rate (BMR) and concentrations of plasma thyroid hormones in fasting cockerels. *Folia Biologica*, 37, 83-90.



- Sharp, P.J., Macnamee, M.C., Sterling, R.J., Lea, R.W., Petersen, H.C. 1988. Relationship between prolactin, luteinizing hormone and broody behavior in bantam hens. *Journal of Endocrinology*, 118, 279-286.
- Sheldon, B.C., Verhulst, S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 11 (8), 317-321.
- Sherry, D.F., Mrosovsky, N., Hogan, J.A. 1980. Weight loss and anorexia during incubation in bird. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 94 (1), 89-98.
- Siegel, R.B., Weathers, W.W., Beissinger, S.R. 1999. Assessing parental effort in a Neotropical parrot: a comparison of methods. *Animal Behaviour*, 57, 73-79.
- Siikamäki, P. 1995. Are larger clutches costly to incubate – the case study of the Pied Flycatcher. *Journal of Avian Biology*, 26, 76-80.
- Skwarlo-Sonta, K., Rosolowska-Huszcz, D., Sotowska-Brochocka, J., Gajewska, A. 1986. Daily variations in response of certain immunity indices to prolactin in White Leghorn chickens. *Experimental and Clinical Endocrinology*, 87 (2), 195-200.
- Slagsvold, T., Dale, S. 1996. Disappearance of female pied flycatchers in relation to breeding stage and experimentally induced molt. *Ecology*, 77, 461-471.
- Smits, J.E., Bortolotti, G.R., Tella, J.L. 1999. Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Functional Ecology*, 13, 567-572.
- Smits, J.E., Fernie, K.J., Bortolotti, G.R., Marchant, T.A. 2002. Thyroid hormone suppression and cell-mediated immunomodulation in American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to PCBs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43, 338-344.
- Sockman, K.W., Schwabl, H., Sharp, P.J. 2000. The role of prolactin in the regulation of clutch size and onset of incubation behavior in the American Kestrel. *Hormones and Behavior*, 38, 168-176.
- Sorci, G., Soler, J.J., Møller, A.P. 1997. Reduced immunocompetence of nestlings in replacement clutches of the European magpie (*Pica pica*). *Proceedings of the Royal Society of London*, 264, 1593-1598.
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N., Loeschcke, V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6, 1025-1037.
- Sotowska-Brochocka, J., Rosolowska-Huszcz, D., Skwarlo-Sonta, K., Gajewska, A. 1984. Effect of exogenous prolactin on immunity in chickens. *Research in veterinary science*, 37 (1), 123-125.
- Stearns, S.C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford.
- Stjernman, M., Råberg, L., Nilsson, J-Å. 2004. Survival costs of reproduction in the blue tit (*Parus caeruleus*): a role for blood parasites? *Proceedings of the Royal Society of London*, 271, 1387-2394.
- Stonehouse, B. 1960. The King Penguin *Aptenodytes patagonica* of South Georgia. I. Breeding behaviour and development. Falkland Islands Department Survey, Scientific Report 23, 81.
- Surai, P. 2002. *Natural antioxidant in avian nutrition and reproduction*. Nottingham University Press, Nottingham.



- Svensson, E., Nilsson, J-Å. 1997. The trade-off between molt and parental care : a sexual conflict in the blue tit ? *Behavioral Ecology*, 8, 92-98.
- Svensson, E., Råberg, L., Hasselquist, D. 1998. Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Functional Ecology*, 12, 912-919.
- Swaddle, J.P., Witter, M.S. 1997. The effects of molt on the flight performance, body mass, and behaviour of European starlings (*Sturnus vulgaris*): an experimental approach. *Canadian Journal of Zoology*, 75, 1135-1146.
- Swennen, C. 1990. Dispersal and migratory movements of Eiders *Somateria mollissima* breeding in the Netherlands. *Ornis Scandinavia*, 21, 17-27.
- Swennen, C., Ursem, J.C.H., Duiven, P. 1993. Determinate laying and egg attendance in Common Eiders. *Ornis Scandinavia*, 24, 48-52.
- Szép, T., Møller, A.P. 1999. Cost of parasitism and host immune defence in the sand martin *Riparia riparia*: a role for parent-offspring conflict? *Oecologia*, 119, 9-15.
- Tielman, B.I., Williams, J.B., Ricklefs, R.E., Klasing, K.C. 2005. Constitutive innate immunity is a component of the pace-of-life syndrome in tropical birds. *Proceedings of the Royal Society of London*, 272, 1715-1720.
- Tomás, G., Martínez, J., Merino, S. 2004. Collection and analysis of blood samples to detect stress proteins in wild birds. *Journal of Field Ornithology*, 75(3), 281-287.
- Trivers, R.L. 1972. Parental investment and sexual selection. In *Sexual selection and the descent of man* (ed. B. Campbell), 1871-1971. London, Heinemann.
- Underwood, H., Steele, C.T., Zivkovic, B. 1999. Effects of fasting on the circadian body temperature rhythm of Japanese quail. *Physiology & Behavior*, 66 (1), 137-143.
- van Eden, W., Koets, A., van Kooten, P., Prakken, B., van der Zee, R. 2003. Immunopotentiating heat shock proteins: negotiators between innate danger and control of autoimmunity. *Vaccine*, 21, 897-901.
- Verhulst, S., Riedstra, B., Wiersma, P. 2005. Brood size and immunity costs in zebra finches *Taeniopygia guttata*. *Journal of Avian Biology*, 36, 22-30.
- Viney, M.E., Riley, E.M., Buchanan, K.L. 2005. Optimal immune responses: immunocompetence revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, 20 (12), 665-669.
- Visser, M.E., Lessells, C.M. 2001. The costs of egg production and incubation in great tits (*Parus major*). *Proceedings of the Royal Society of London*, 268, 1271-1277.
- Vleck, C.M., Mays, N.A., Dawson, J.W., Goldsmith, A.R. 1991. Hormonal correlates of parental and helping behavior in cooperatively breeding Harris' hawks (*Parabuteo unicinctus*). *Auk*, 108, 638-648.
- von Schantz, T., Bensch, S., Grahn, M., Hasselquist, D., Wittzell, H. 1999. Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proceedings of the Royal Society of London*, 266, 1-12.
- Wakeley, J.S., Mendall, H.L. 1976. Migrational and survival of adult female Eiders in Maine. *Journal of Wildlife Management*, 15-21.
- Warelius, K.H. 1993. The effect of intestinal helminths of body condition of prelaying eiders *Somateria m. mollissima* (L.). Thèse de l'Université de Tromsø, 1-27.



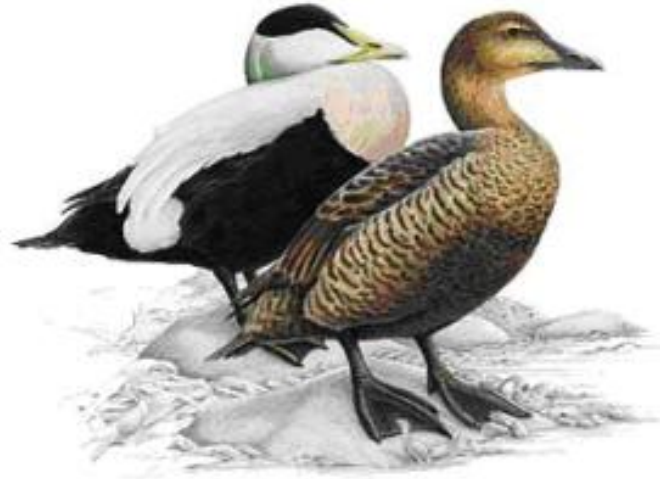
- Watson, M.D., Robertson, J., Cooke, F. 1993. Egg-laying time and laying interval in the Common Eider. *The Condor*, 95, 869-878.
- Weimerskirch, H., Stahl, J.-C., Jouventin, P. 1992. The breeding biology and population dynamics of king penguins *Aptenodytes patagonica* on the Crozet Islands. *Ibis*, 137, 107-117.
- Westerterp, K. 1977. How rats economize - Energy loss in starvation. *Physiological Zoology*, 80, 331-362.
- Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J.R., Verhulst, S. 2004. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London*, 271 (S5), S360-S363.
- Williams, G.C. 1966. Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *The American Naturalist*, 100, 687-690.
- Williams, T.D., Christians, J.K., Aiken, J.J., Evanson, M. 1999. Enhanced immune function does not depress reproductive output. *Proceedings of the Royal Society of London*, 266, 753-757.
- Williamson, R.A., Davison, T.F., Payne, L.N. 1990. Effects of thyroid hormones on humoral and cell-mediated immune responses in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Developmental and Comparative Immunology*, 14, 305-318.
- Yoccoz, N.G., Erikstad, K.E., Bustnes, J.O., Hanssen, S.A., Tveraa, T. 2002. Costs of reproduction in common eiders (*Somateria mollissima*): an assessment of relationships between reproduction based on observational and experimental studies. *Journal of Applied Statistics*, 29 (1-4), 57-64.
- Youngren, O.M., El Halawani, M.E., Silsby, J.L., Phillips, R.E. 1991. Intracranial prolactin perfusion induces incubation behaviour in turkey hens. *Biology of Reproduction*, 44, 425-431.
- Zheng, L., He, M., Long, M., Blomgram, R., Stendahl, O. 2004. Pathogen-induced apoptotic neutrophils express heat shock proteins and elicit activation of human macrophages. *The Journal of Immunology*, 6319-6326.
- Zuk, M. 1996. Disease, endocrine-immune interactions and sexual selection. *Ecology*, 77(4), 1037-1042.
- Zuk, M., Johnsen, T.S. 1998. Seasonal changes in the relationship between ornamentation and immune response in red jungle fowl. *Proceedings of the Royal Society of London*, 265, 1631-1635.
- Zuk, M., Johnsen, T.S., MacLarty, T. 1995. Endocrine-immune interactions, ornaments and mate choice in red jungle fowl. *Proceedings of the Royal Society of London*, 260, 205-210.



G- Articles



ARTICLE I



Bourgeon, S., Criscuolo, F., Le Maho, Y., Raclot, T.

Phytohemagglutinin response and immunoglobulin index decrease during
incubation fasting in female Common Eiders.

Sous presse, **Physiological and Biochemical Zoology**

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Phytohemagglutinin Response and Immunoglobulin Index Decrease during Incubation Fasting in Female Common Eiders

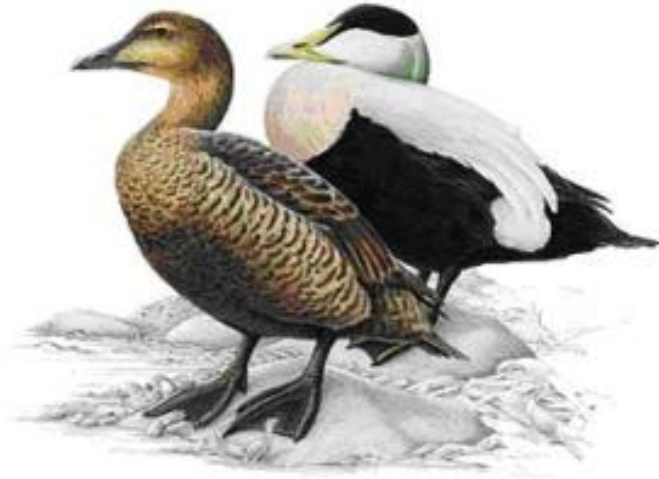
Bourgeon, S., Criscuolo, F., Le Maho, Y., Raclot, T.

Physiological and Biochemical Zoology, 2006, Sous presse

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

ARTICLE II



Bourgeon, S., Raclot, T., Le Maho, Y., Ricquier, D., Criscuolo, F.

Innate immunity, assessed by plasma NO measurements, is not suppressed during the incubation fast in eiders.

Soumis

Innate immunity, assessed by plasma NO measurements, is not suppressed during the incubation fast in eiders.

Sophie Bourgeon¹, Thierry Raclot¹, Yvon Le Maho¹, Daniel Ricquier² and François Criscuolo²

¹ *IPHC, Département Ecologie, Physiologie et Ethologie, UMR 7178, 23 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex 2, France*

² *Université Paris V René Descartes, Site Necker enfants-Malades, CNRS-UPR 9078, 156 rue de Vaugirard 75730 Paris Cedex 15, France*

Running title: Innate immunity in incubating eiders

Address for correspondence:

Sophie Bourgeon

IPHC, Département Ecologie, Physiologie et Ethologie, UMR 7178, 23 rue Becquerel,

F-67087 Strasbourg Cedex 2, France

Tel: (33) 3.88.10.69.15

Fax: (33) 3.88.10.69.06

e-mail:sophie.bourgeon@c-strasbourg.fr

ABSTRACT

Immunity is hypothesized to share limited resources with other physiological functions and this may partly account for the fitness costs of reproduction. However, immune defense is a very complex system that consists of three components. To date, no study has assessed all of these components for the same animal model and within a given situation. Previous studies have determined that the acquired immunity of common eiders (*Somateria mollissima*) is suppressed during incubation. The present paper aims at assessing the innate immune response in fasting eiders in relation to their initial body condition. Innate immunity was assessed by measuring plasma nitric oxide levels (NO), prior and after injection of lipopolysaccharides (LPS), a method which is easily applicable to wild animals. Body condition index and corticosterone levels were subsequently determined. The innate immune response in eiders did not vary significantly throughout the incubation period, while NO levels before LPS injection increased significantly by 40 % as incubation progressed. The innate immune response did not vary significantly in relation to the initial body condition but decreased significantly when corticosterone levels increased. However, NO levels after LPS injection were significantly and positively related to initial body condition, while there was a significant negative relationship with plasma corticosterone levels. Our study suggests that female eiders preserve an effective innate immune response during incubation and this response might be partially determined by the initial body condition. Nevertheless, the adaptive significance of this response, as well as the underlying endocrine mechanisms, still remain unclear and require further study.

Key-words: Innate immunity; incubation fast; initial body condition; corticosterone; trade-off

INTRODUCTION

Trade-offs between fitness components are a central concept in evolutionary ecology. The publication of a paper by Hamilton and Zuk in 1982 generated a considerable interest in the role that parasites might play in the evolution of reproductive strategies. This cumulated in the emergence of the field of ecological immunology, which investigates the role of immune effector systems in determining host fitness in the wild (reviewed in Sheldon and Verhulst 1996). The observation that a heavy parasite load during reproduction is associated with a reduced immune response (Nordling et al. 1998) and a decreased adult survival rate (Ricklefs 2000), led to the central hypothesis that immunity must share limited resources with other physiological functions and this may to some extent explain the fitness costs of reproduction (Norris and Evans 2000).

To eradicate pathogens, the activated immune system produces oxygen free radicals, which enhances the oxidative stress (von Schantz et al. 1999; Råberg et al. 1998). Immunosuppression during reproduction has been viewed as an undesirable consequence of a high metabolic rate (Råberg et al. 1998). However, even if a high metabolic rate during reproduction might contribute to immunosuppression, it is most likely not the only factor involved (Råberg et al. 1998). As recently outlined by Viney et al. (2005), a “maximum immune response” does not necessarily mean that the response is “optimal”, since an immunosuppression might be of adaptive value (Råberg et al. 1998). Firstly, since an activated immunity enhances the oxidative stress (von Schantz et al. 1999), it carries a non-negligible risk of autoimmune pathology (Macdonald et al. 2003; Bourgeon et al. in press a). Immunosuppression could therefore be explained by the immunopathology-avoidance hypothesis (Råberg et al. 1998). Secondly, the resource-limitation hypothesis assumes that different functions compete for limited resources and that investment in costly behaviours,

such as reproduction, reduces the amount of resources available to immune defense (Råberg et al. 1998). This second hypothesis assumes that there is an energetic or nutritional cost associated with the immune system (Råberg et al. 1998; Verhulst et al. 2005). However, evidence for an energetically costly immune response is still equivocal (Råberg et al. 1998). An alternative scenario can also be proposed: immunocompetence may be fixed by energetic reserves or individual quality (Norris and Evans 2000) that determine basal metabolic rate (BMR). Adipose tissue, apart from being a place for lipid storage, might also function as an important endocrine organ responsible for the synthesis and secretion of several metabolic hormones and proteins (Ahima and Flier 2000). This view is supported by recent work that indicates a link between fat stores and immunity (Demas et al. 2003). However, whether and to what extent the immune response depends on individual quality and is suppressed when body conditions deteriorate is still under debate (Eraud et al. 2005).

Immune defense is one of the most complex biological phenomena. It consists of three components (innate immunity, acquired humoral immunity, and acquired cellular immunity) between which trade-offs may appear (Gross et al. 1980; Zuk and Johnsen 1998; Norris and Evans 2000; Viney et al. 2005; Bourgeon et al. in press b). Consequently, multiple immune assays, which challenge different components of the immune system should be used to gain a better understanding of the overall immunocompetence (Adamo 2004). Since assessment of the acquired immunity has proven insufficient for ecological immune studies (Gross et al. 1980; Keil et al. 2001), assaying the innate component is of primary importance. To date, only one study has assessed the constitutive innate immunity by using an *in vitro* assay (Tieleman et al. 2005). The present paper presents an alternative method which is easily applicable to animals in the wild. The innate immune response consists of the activation of phagocyte cells as heterophils and macrophages (reviewed in Tosi 2005). Destruction of recognized pathogens by those cells is mainly driven by the production of nitric oxide (NO)

(Crippen et al. 2003), which can be experimentally stimulated by injection of lipopolysaccharides (LPS, Lillehoj and Li 2004).

Previous studies have shown that the acquired immunity of common eider ducks (*Somateria mollissima*) is suppressed during the incubation fast (Hanssen et al. 2004; Bourgeon et al. in press b), and that its experimental activation has strong negative effects on the fitness of female eiders (Hanssen et al. 2004). Based on these results, we hypothesized that, during the incubation fast, female eiders must preserve an impenetrable first line of defense. In other words, they must maintain a highly effective innate immune response, to compensate for the loss of their acquired immune components. We also predicted that the intensity of the innate immune response will be related to the initial body condition. Eider ducks are a useful model for the latter aspect, since females rely solely on their stored body fat during incubation (Korschgen 1977). Hence, their initial body condition will be an important factor in determining how the incubation will develop.

In the present study, we measured plasma NO concentrations in breeding female eider ducks before and after LPS injection at various stages during their incubation period, while also considering their initial body condition. We assessed body condition by measuring corticosterone levels (Harvey et al. 1984; Love et al. 2005) and also by calculating an index.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted in a common eider colony on Storholmen Island, Kongsfjorden, Svalbard Archipelago (78°55' N, 20°07' E) from June to July 2005. The breeding population of eiders in the study site consisted of about 900 nests. Females in the study area laid between 1 and 6 eggs, but a clutch size of 4 to 5 eggs was most common (49.35 % and 24.62 % respectively, N=845). Eider ducklings are precocial and are cared for by the female only. Incubation lasts between 24 and 26 days (Korschgen 1977). All birds started their incubation between June 07 and June 13, the main laying period for the colony. Ducks that laid their eggs after this period were not considered in this study. Ambient temperatures in June and July ranged from 2 to 10°C.

Groups and sampling protocol

Nests were checked at least every two days throughout the study period. This was done to determine initial clutch size but also to investigate the rate of egg predation and nest desertion. A clutch of eggs was considered complete when no additional egg was laid during a two-day period (Yoccoz et al. 2002). Female eiders were caught on their nests using a bamboo pole with a nylon snare. Blood was collected from the brachial vein within three minutes of capture. It was stored in tubes containing EDTA (an anticoagulant agent) and kept on ice until being centrifuged at 10,000 rpm for five minutes at 4°C in the laboratory. Plasma samples and blood cells were separately stored at -20°C and plasma was subsequently used to measure corticosterone and nitric oxide levels. After blood sampling, body size was recorded (wing and tarsus length) and birds were weighed with a portable electronic balance (± 2 g). Initial body mass (after laying the last egg) was extrapolated from body mass at sampling as described by Criscuolo et al. (2002a). Finally, to measure the innate immune response, each

female was injected with a solution of lipopolysaccharides (LPS) intra-peritoneally (see below). To assess female body condition, the following index was used: female initial body mass was divided by (tarsus length)³, as reported by MacColl and Hatchwela (2003). Mean body condition of 51 females was 8.80 ± 0.10 (mean \pm SE, N=51). Consequently, we classified females with an index ≤ 8.80 as being in bad condition, while females with an index > 8.80 as being in good condition.

A total of 51 females with clutch sizes ranging from 3 to 6 eggs (4.06 ± 0.64 eggs, N=51) (mean \pm SD) was used in this study. All birds were caught twice. To prevent nest desertion we only caught birds that were already incubating for at least five days. To cover the entire incubation period we caught individuals that were at different stages of their incubation period (17.94 ± 5.51 days into incubation, N=51) (mean \pm SD).

Innate immune response: LPS injection

To evaluate the innate immune response, we first collected blood samples from incubating females and subsequently injected 0.35 mg.kg^{-1} LPS intra-peritoneally (Sigma L-2630, diluted in phosphate-buffered saline). Birds were recaptured 24 h after injection and another blood sample was taken. Nitric oxide levels were subsequently determined (see below) prior to and 24 h after LPS injection. The ‘innate immune response’ was calculated as the increase (in percentage) in nitric oxide production following LPS injection.

Assessment of the nitric oxide levels

There are various assays for the quantification of NO in biological models as reviewed by Archer (1993). The free radical NO has a short half-life *in vivo* since it is quickly oxidized, mainly to the inorganic nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-). Diazotization is a standard technique for indirect quantification of NO production. It has been previously used in chickens

(Jarosinski et al. 2002) and is based on the reaction of NO_2^- with Griess components (sulphanilamide and N-(1-naphthyl)ethylene-diamine, Sigma G4410-10G), and the generation of a purple-azo-dye product, which is measured with a spectrophotometer at 550 nm (Jarosinski et al. 2002). This method requires previous enzymatic reduction of NO_3^- to NO_2^- using bacterial nitrate reductase (Sigma N-7265).

In our assessment, plasma (10 μl) was diluted 1:2 with sterile distilled water (10 μl) and incubated for two hours at ambient temperature with 80 μl of a medium composed of nitrate reductase (Sigma N-7265, 0.4 u.mL^{-1}), β -NADPH (Nicotinamide adenine di-nucleotide phosphate, Sigma 7505, 1 mg.mL^{-1}) and HEPES (GIBCO 15630-056, 0.1 M). A volume of 100 μL of Griess reagent was added to each sample and the optical density was measured at 550 nm after 15 minutes. Nitrite levels were determined with a standard curve generated from a NaNO_2 solution at 2.5 mM. Sodium EDTA was used as anticoagulant and no ultrafiltration of plasma was done, as previously recommended, to avoid interference in NO_3^- quantification (Ricart-Jané et al. 2002). The absorbance of background coloured plasma was controlled for non-specific increase in absorbance after Griess reaction due to hemolysis or to the presence of blood haemoproteins (Ricart-Jané et al. 2002). No particular elevated backgrounds were found in the samples.

Assessment of the corticosterone levels

Corticosterone concentration was determined by radioimmunoassay (RIA) in our laboratory using an ^{125}I RIA double antibody kit from ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, USA). The corticosterone RIA had an intraassay variability of 7.1 % (N=10 duplicates) and an interassay variability of 6.5 % (N=15 duplicates).

Statistical analyses

Statistical analysis was conducted with SPSS 12.0.1 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Values are means \pm standard error (SE) unless otherwise indicated. When data were not normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test, $P < 0.05$), values were log transformed before using parametric tests. When transformations were not possible, non parametric tests were used.

RESULTS

Table 1 provides details about the female eiders used in this study. Initial body mass, initial clutch size, and wing length were not significantly different between the two experimental groups (good and bad body condition). Body mass (1600 ± 23 g, $N=51$) was inversely related to sampling date during the fast (Spearman rank correlation: $r_s=-0.68$, $N=51$, $P<0.0001$). There was no significant relationship between female initial body mass and initial clutch size (Spearman rank correlation: $r_s=-0.03$, $N=51$, $P=0.81$).

Nitric oxide production in relation to incubation length

As expected, LPS injection stimulated NO production. Indeed, NO levels were significantly increased by 70 % following LPS injection (repeated measures ANOVA: $F_{1,50}=107.02$, $P<0.0001$) (106.82 ± 7.85 μM , $N=51$ before LPS injection versus 179.13 ± 9.64 μM , $N=51$ after LPS injection).

The percentage of increase in NO production following LPS injection (the ‘innate immune response’) did not vary significantly throughout the incubation period, ranging from 110 to 74 % (linear regression: $r^2=0.07$, $N=51$, $P=0.06$). By contrast, NO levels before LPS injection (NO1) increased significantly by about 40 % as the incubation progressed (range: 86.66-120.94 μM ; linear regression: $r^2=0.12$, $N=51$, $P=0.01$) (Figure 1). However, NO levels after LPS injection (NO2) did not vary significantly throughout the incubation period (range: 168.30-186.72 μM ; linear regression: $r^2=0.04$, $N=51$, $P=0.15$). Finally, there was a significant negative relationship between the innate immune response and NO1 levels (linear regression: $r^2=0.57$, $N=51$, $P<0.0001$) but not NO2 levels (linear regression: $r^2=0.03$, $N=51$, $P=0.23$) indicating that only when NO levels were high before LPS injection, the innate immune response was significantly lower (Figure 2).

Nitric oxide production in relation to female body condition

We first assessed female body condition by dividing their initial body mass by their (tarsus length)³. The body condition index was not significantly related to neither innate immune response nor NO1 levels (linear regression: $r^2=0.00$, $N=51$, $P=0.99$; $r^2=0.04$, $N=51$, $P=0.18$, respectively). By contrast, there was a significant positive relationship between body condition index and NO2 levels (linear regression: $r^2=0.12$, $N=51$, $P=0.01$), so that females in good body condition had greater NO2 values than females in bad body condition (Figure 3).

We subsequently assessed female body condition by measuring their corticosterone levels. Plasma corticosterone levels did not vary significantly over the incubation period (linear regression: $r^2=0.001$, $N=51$, $P=0.82$). Mean corticosterone level was 28.70 ± 4.66 ng.ml⁻¹ (range: 22-33 ng.ml⁻¹; $N=51$). We found a significant negative relationship between body condition index and plasma corticosterone levels (linear regression: $r^2=0.12$, $N=51$, $P=0.01$). Hence, females in good body condition had lower levels of corticosterone than females in bad body condition.

There was a significant negative relationship between plasma corticosterone levels and the innate immune response (linear regression: $r^2=0.10$, $N=51$, $P=0.02$) (Figure 4), whereby high levels of corticosterone were associated with a low innate immune response. We furthermore found a significant negative relationship between plasma corticosterone and NO2 levels (linear regression: $r^2=0.11$, $N=51$, $P=0.01$) (Figure 5), where high levels of corticosterone were associated with low values of NO2. However, there was no significant relationship between plasma corticosterone and NO1 levels (linear regressions: $r^2=0.04$, $N=51$, $P=0.15$).

DISCUSSION

Since the assessment of acquired immunity has proven insufficient for ecological immune studies (Gross et al. 1980; Keil et al. 2001), researchers must challenge all arms of the immune system to gain more confidence in their evaluation of immunocompetence (Adamo 2004). Hence, assaying the innate component of the immune system is of primary importance.

Our study is the third part of an investigation into the immunocompetence of female eider ducks during the incubation fast, and allows us to give an overview of how the different components of immunity are affected during this phase. Suppression of both T-cell-mediated and humoral acquired immune responses were previously observed in incubating female eiders (Hanssen et al. 2004; Hanssen et al. 2005; Bourgeon et al. in press b), but no significant correlation between these two components has been observed (Bourgeon et al. in press b). This immunosuppression appears to be adaptive since it enhances the future survival of the females (Hanssen et al. 2004). Roitt et al. (1998) suggested that, birds should consequently keep a high innate barrier to compensate for the loss of the acquired immunity, so that pathogens can be eliminated before the acquired components are triggered. Support for this hypothesis comes from indirect measurements of the innate immunity in eiders (i.e. heterophil/lymphocyte counts) by Hanssen et al. (2003a). Furthermore, the plasma NO production measured in the present study clearly illustrates that the innate response in our eiders was not suppressed during fasting. Similarly, studies on severely starved chickens showed an enhanced innate immunity while the lymphocyte response (as part of the acquired immune response) was suppressed (Hangalapura et al. 2005). A possible explanation for these observations is that the recruitment of phagocyte cells from the innate system is less energy-consuming than the activation of humoral and cellular acquired immunities. Favouring the innate system could also act as a buffer against the fitness costs associated with acquired

immunities (Hanssen et al. 2004). However, it is still unclear if the activation of an immune response is energetically costly and evidence from a number of immuno-ecological studies is equivocal. Demas et al. (1997) showed that oxygen consumption of mice was increased by 15-20 % after an immunoglobulin response was triggered. Svensson et al. (1998), however, found only a weak increase in the BMR of blue tits (*Parus caeruleus*) after antibody response challenge. Similarly, Verhulst et al. (2005) reported that the metabolic costs of eliciting a humoral immune response are negligible in zebra finches (*Taeniopygia guttata*). Also, Hanssen et al. (2004) did not find an accelerated body mass loss in female eiders responding to an injection of antigens. Therefore, the nature of the costs linking immune responses to reproductive effort and overall energy metabolism still escapes our understanding. However, since apoptosis of leukocytes is naturally induced by free radicals (Guzik et al. 2003), oxidative damage could mediate such a cost (Råberg et al. 1998; von Schantz et al. 1999). Finally, despite the fact that innate immunity was not suppressed during the incubation fast in eider ducks, it nonetheless seemed to be limited to a certain threshold. In fact, while NO1 levels significantly increased as incubation progressed, NO2 levels did not vary significantly over the course of the incubation period. As a consequence, the innate immune response (NO2-NO1/NO1) did not vary throughout incubation. Moreover, we found a negative relationship between NO1 levels and the innate immune response, so that higher NO1 levels were associated with a lower innate immune response. This could be a potential mechanism to reduce the risks of oxidative damage, since this non-specific defense leads to an over-production of free radicals. In this context, it would be interesting to test the immunosuppressive effect of an increased oxidative stress in future experiments.

Trade-offs between different components of the immune system were reported in red jungle fowl (*Gallus gallus*) (Zuk and Johnsen 1998). Before the breeding season cell-mediated immunity and the proportion of lymphocytes of male jungle fowl were positively

correlated with comb length. By contrast, during the breeding season, males with large combs had lower levels of lymphocytes but a greater cell-mediated immunity (Zuk and Johnsen 1998). The underlying mechanisms are still unknown. In a previous study on incubating eiders, humoral immunosuppression was correlated with an increase in plasma concentration of two heat shock proteins (HSP60 and HSP70, Bourgeon et al. in press a). HSP's are known to be immunogenic for innate responses (Gullo and Teoh 2004) and to promote lysis activity of the innate component members such as natural killer cells (NK) (Hickman-Miller and Hildebrand 2004). Hence, they might contribute to the maintenance of the innate immunity during fasting. NK cells are specialized in the destruction of infected host cells, which could partly compensate for lymphocyte deficiency against viral infections (Tosi 2005). In addition, in previous studies, suppression of the acquired immunity was stronger in female eiders with a low initial body condition (Hanssen et al. 2004), while adverse effects on fitness from parasites were also more pronounced in these individuals (Hanssen et al. 2003b). We found that NO₂ levels in our eiders were positively correlated with initial body condition. Hence, the immunocompetence of eider ducks might to some degree depend on initial body condition (see Norris and Evans 2000). This idea is supported by the fact that humoral immunity in mammals is controlled by body fat stores (Demas et al. 2003), which raises the question of the hormonal control of the immune system (Demas and Sakaria 2005). The peptide hormone leptin is secreted primarily by adipose tissue and has been shown to enhance a variety of immunological parameters in mammals (Lord et al. 1998; Faggioni et al. 2001) and birds (Löhmus et al. 2004). Since circulating levels of leptin are generally proportional to the amount of body fat (Löhmus and Sundtröm 2004), decreases in body fat stores may affect immunity via changes in endocrine signaling with the immune system (Demas and Sakaria 2005). To examine the role of leptin for the immune function of fasting eiders, it would be useful to manipulate leptin concentrations (Löhmus et al. 2004) at different incubation stages.

Corticosterone might also be a potential functional link between body condition and immune response. It was namely implicated in the *in vitro* inhibition of chicken lymphocyte proliferation (Hangalapura et al. 2004) and in decreased phagocyte ability in starved rats (Salman et al. 1998). Conversely, corticosterone can also promote phagocytosis (Rodriguez et al. 2001) and NO production in synergy with prolactin (Lourenco et al. 2005). This latter peptide has shown to be involved in incubation behaviour in eiders (Criscuolo et al. 2002b). In this study, we reported that corticosterone, the primary avian stress hormone, tended to be negatively correlated with the innate immune response, so that high levels of corticosterone were associated with a low innate immune response.

In conclusion, we propose that in contrast to the fate of both acquired immune components, the innate immunity is not suppressed during the incubation fast of female eiders. Moreover, the levels of NO₂ seem to depend on the initial amount of body reserves. Females in good body condition showed higher NO₂ levels than birds in bad body condition. Similarly, females with high corticosterone values had low NO₂ values and a decreased innate immune response. Nevertheless, the evolutionary significance of our observations remain to be validated. Finally, despite the fact that hormonal and neuroendocrine systems are important promoters of innate immunity (Berczi et al. 2000), their interactions need to be investigated in further experiments.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Yalin Emre and Dr Sophie Rousset for their advice and help during the NO assessment. This research was funded by The French Polar Institute Paul Emile Victor and the Comité Interprofessionnel de la Dinde Française (CIDEF). The experiments were conducted with the authorization of the French and Norwegian Ethics Committees and the Governor of Svalbard.

REFERENCES

- Adamo SA (2004) How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Anim Behav* 68: 1443-1449
- Ahima RS, Flier JS (2000) Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11: 327-332
- Archer S (1993) Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 7: 349-360
- Berczi I, Bertok L, Chow DA (2000) Natural immunity and neuroimmune host defense. *Ann NY Acad Sci* 917: 248-257
- Bourgeon S, Criscuolo F, Le Maho Y, Raclot T. Phytohemagglutinin response and immunoglobulin index decrease during incubation fasting in female Common Eiders. *Physiol Biochem Zool*, in press b
- Bourgeon S, Martinez J, Criscuolo F, Le Maho Y, Raclot T. Fasting-induced changes of immunological and stress indicators in breeding female Eiders. *Gen Comp Endocrinol*, in press a
- Crippen TL, Sheffield CL, Haiqi H, Lowry VK, Kogut MH (2003) Differential nitric oxide production by chicken immune cells. *Dev Comp Immunol* 27: 603-610
- Criscuolo F, Chastel O, Gabrielsen GW, Le Maho Y (2002b) Circulating prolactin in a capital incubator : the Common Eider *Somateria mollissima*. *Gen Comp Endocrinol* 125: 399-409
- Criscuolo F, Gabrielsen GW, Gendner JP, Le Maho Y (2002a) Recess behaviour and body mass regulation during extended incubation in Common Eider (*Somateria mollissima*). *J Avian Biol* 33: 83-88
- Demas GE, Chefer V, Talan MI, Nelson RJ (1997) Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *Am J Physiol* 273: R1631-R1637

Demas GE, Drazen DL, Nelson RJ (2003) Reductions in total body fat decrease humoral immunity. *Proc R Soc Lond B* 270: 905-911

Demas GE, Sakaria S (2005) Leptin regulates energetic tradeoffs between body fat and humoral immunity. *Proc R Soc Lond B* 272: 1845-1850

Eraud C, Duriez, O, Chastel, O, Faivre B (2005) The energetic cost of humoral immunity in the Collared Dove, *Streptopelia decaocto*: is the magnitude sufficient to force energy-based trade-offs? *Funct Ecol* 19: 110-118

Faggioni R, Feingold KR, Grunfeld C (2001) Leptin regulation of the immune response and the immuno-deficiency of malnutrition. *FASEB J* 15: 2565-2571

Gross WG, Siegel PB, Hall W, Domermuth CH, DuBoise RT (1980) Production and persistence of antibodies in chicken to sheep erythrocytes. 2. Resistance to infectious diseases. *Poult Sci* 59: 205-210

Gullo CA, Teoh G (2004) Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunol Lett* 94: 1-10

Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54: 469-487

Hamilton WD, Zuk M (1982) Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* 218: 384-387

Hangalapura BN, Nieuwland MG, Buyse J, Kemp B, Parmentier HK (2004) Effect of duration of cold stress on plasma adrenal and thyroid hormone levels and immune responses in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poult Sci* 83: 1644-1649

Hangalapura BN, Nieuwland MGB, De Vries Reilingh G, Buyse J, Van Den Brand H, Kemp B, Parmentier HK (2005) Severe feed restriction enhances innate immunity but suppresses cellular immunity in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poult Sci* 84: 1520-1529

- Hanssen SA, Folstad I, Erikstad KE (2003a) Reduced immunocompetence and cost of reproduction in common eiders. *Oecologia* 136: 457-464
- Hanssen SA, Folstad I, Erikstad KE, Oksanen A (2003b) Costs of parasites in common eiders: effects of antiparasite treatment. *Oikos* 100: 105-111
- Hanssen SA, Hasselquist D, Folstad I, Erikstad KE (2004) Costs of immunity: immune responsiveness reduces survival in a vertebrate. *Proc R Soc Lond B* 271: 925-930
- Hanssen SA, Hasselquist D, Folstad I, Erikstad KE (2005) Cost of reproduction in a long-lived bird: incubation effort reduces immune function and future reproduction. *Proc R Soc Lond B* 272: 1039-1046
- Harvey S, Phillips JG, Rees A, Hall TR (1984) Stress and adrenal function. *J Exp Zool* 232: 633-645
- Hickman-Miller HD, Hildebrand WH (2004) The immune response under stress: the role of HSP-derived peptides. *Trends Ecol Evol* 25: 427-433
- Jarosinski KW, Ynis R, O'Connell PH, Markowski-Grimsrud CJ, Schat KA (2002) Influence of genetic resistance of the chicken and virulence of Marek's disease virus (MDV) on nitric oxide responses after MDV infection. *Avian Dis* 46: 636-649
- Keil D, Luebke R, Pruett S (2001) Quantifying the relationship between multiple immunological parameters and host resistance: probing the limits of reductionism. *J Immunol* 167: 4543-4552
- Korschgen CE (1977) Breeding stress of female Eiders in Maine. *J Wild Manage* 41 (3): 360-373
- Lillehoj HS, Li G (2004) Nitric oxide production by macrophages stimulated with coccidia sporozoites, lipopolysaccharide, or interferon- γ , and its dynamic changes in SC and TK strains of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Avian Dis* 48: 244-253

Löhmus M, Olin M, Sundström LF, Troedsson MHT, Molitor TW, El Halawani M (2004) Leptin increases T-cell immune response in birds. *Gen Comp Endocrinol* 139: 245-250

Löhmus M, Sundström LF (2004) Leptin and social environment influence the risk-taking and feeding behaviour of Asian blue quail. *Anim Behav* 68: 607-612

Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI (1998) Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394: 897-901

Lourenco GA, Dorce VA, Paermo-Neto J (2005) Haloperidol treatments increased macrophage activity in male and female rats: influence of corticosterone and prolactin serum levels. *Eur Neuropsychopharmacol* 15: 271-277

Love OP, Chin EH, Wynne-Edwards KE, Williams TD (2005) Stress hormones: a link between maternal condition and sex-biased reproductive investment. *Am Nat* 166 (6): 751-766

MacColl ADC, Hatchwela BJ (2003) Heritability of parental effort in a passerine bird. *Evolution* 57 (9): 2191-2195

MacDonald J, Galley HF, Webster NR (2003) Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth* 90: 221-232

Nordling D, Andersson M, Zohari S, Gustafsson L (1998) Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proc R Soc Lond B* 265: 1291-1298

Norris K, Evans MR (2000) Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav Ecol* 11: 19-26

Råberg L, Grahn M, Hasselquist D, Svensson E (1998) On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proc R Soc Lond B* 265: 1637-1641

Ricart-Jané D, Llobera M, Lopez-Tejero MD (2002) Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide* 6: 178-185

Ricklefs RE (2000) Density dependence, evolutionary optimization, and the diversification of avian life histories. *Condor* 102: 9-22

Rodriguez AB, Terron MP, Duran J, Ortega E, Barriga C (2001) Physiological concentrations of melatonin and corticosterone affect phagocytosis and oxidative metabolism of ring dove heterophils. *J Pineal Res* 31: 31-38

Roitt IM, Brostoff J, Male DK (1998) *Immunology*. London, Mosby

Salman H, Bergman M, Bessler H, Alexandrova S, Straussberg R, Zahavi I, Djaldetti M (1998) Effect of three days starvation on the phagocytic activity of rat peritoneal macrophages. *Acta Haematol* 100 (1): 17-21

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

Svensson E, Råberg L, Koch C, Hasselquist D (1998) Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Funct Ecol* 12: 912-919

Tieleman BI, Williams JB, Ricklefs RE, Klasing KC (2005) Constitutive innate immunity is a component of the pace-of-life syndrome in tropical birds. *Proc R Soc Lond B* 272: 1715-1720

Tosi MF (2005) Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 116: 241-249

Verhulst S, Riedstra B, Wiersma P (2005) Brood size and immunity costs in zebra finches *Taeniopygia guttata*. *J Avian Biol* 36: 22-30

Viney ME, Riley EM, Buchanan KL (2005) Optimal immune responses: immunocompetence revisited. *Trends Ecol Evol* 20 (12): 665-669

von Schantz T, Bensch S, Grahn M, Hasselquist D, Wittzell H (1999) Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proc R Soc Lond B* 266: 1-12

Yoccoz NG, Erikstad KE, Bustnes JO, Hanssen SA, Tveraa T (2002) Cost of reproduction in common eiders (*Somateria mollissima*): an assessment of relationships between reproductive effort and future survival and reproduction based on observational and experimental studies. *J Appl Stat* 29: 57-64

Zuk M, Johnsen TS (1998) Seasonal changes in the relationship between ornamentation and immune response in red jungle fowl. *Proc R Soc Lond B* 265: 1631-1635

TABLES

Table 1. Profiles of female eiders according to their body condition. Body condition was calculated by dividing female initial body mass by (tarsus length)³. Females having an index ≤ 8.80 or > 8.80 were classified as in bad or good body condition, respectively. Values are means \pm SE.

	Group 1: females in good body condition	Group 2: females in bad body condition	U-test	P
Initial body mass (g)	2018 \pm 23, N=25	1990 \pm 24, N=26	-0.48	0.63
Initial clutch size (eggs)	4.00 \pm 0.13, N=25	4.11 \pm 0.13, N=26	-0.50	0.62
Tarsus length (cm)	6.00 \pm 0.03, N=25	6.22 \pm 0.02, N=26	-4.48	<0.0001
Wing length (cm)	29.04 \pm 0.10, N=25	29.19 \pm 0.13, N=26	-0.73	0.47
Time of sampling (days)	16.64 \pm 1.11, N=25	19.19 \pm 1.03, N=26	-1.65	0.10
Body mass at sampling (g)	1643 \pm 34, N=25	1559 \pm 28, N=26	-1.87	0.06
Body condition index	9.33 \pm 0.09, N=25	8.28 \pm 0.09, N=26	-6.12	<0.0001
NO1 (μM)	112.45 \pm 13.29, N=25	101.42 \pm 8.72, N=26	-0.56	0.58
NO2 (μM)	192.47 \pm 17.79, N=25	166.31 \pm 7.69, N=26	-0.96	0.34
Innate immune response (%)	93.34 \pm 15.17, N=25	86.06 \pm 14.68, N=26	-0.09	0.92
Corticosterone (ng.ml⁻¹)	20.17 \pm 1.63, N=25	36.91 \pm 8.79, N=26	-2.50	0.01

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Nitric oxide levels before LPS injection (NO1) in female eiders versus incubation length and according to their initial body condition: good (●) or bad (▽). LPS, lipopolysaccharides.

Figure 2. Relationship between nitric oxide levels before LPS injection (NO1) and innate immune response (%) in incubating female eiders according to their initial body condition: good (●) or bad (▽).

Figure 3. Relationship between body condition index (mass/tarsus length³) and nitric oxide levels after LPS injection (NO2) in incubating female eiders. Females having an index ≤ 8.80 or > 8.80 were classified as in bad (▽) or good (●) initial body condition, respectively. LPS, lipopolysaccharides.

Figure 4. Relationship between corticosterone levels and innate immune response (%) in incubating female eiders according to their initial body condition: good (●) or bad (▽).

Figure 5. Relationship between corticosterone levels and nitric oxide levels after LPS injection (NO2) in incubating female eiders according to their initial body condition: good (●) or bad (▽). LPS, lipopolysaccharides.

FIGURE 1.

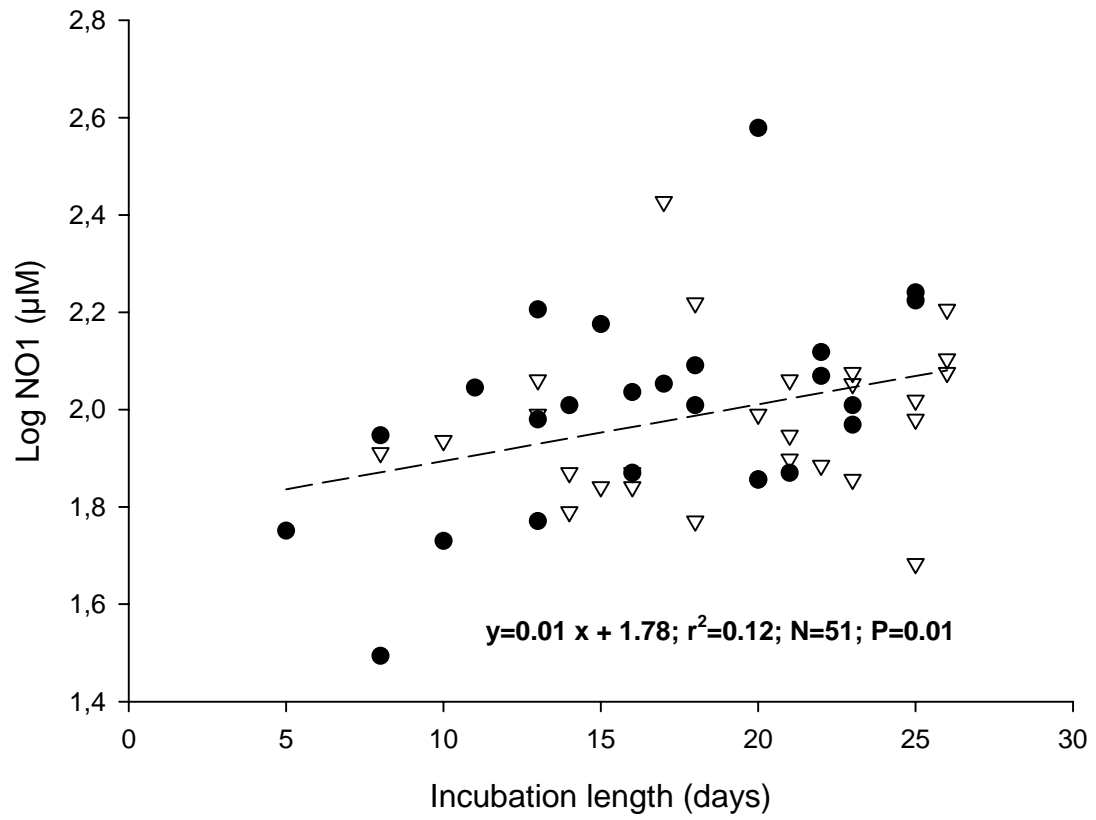


FIGURE 2.

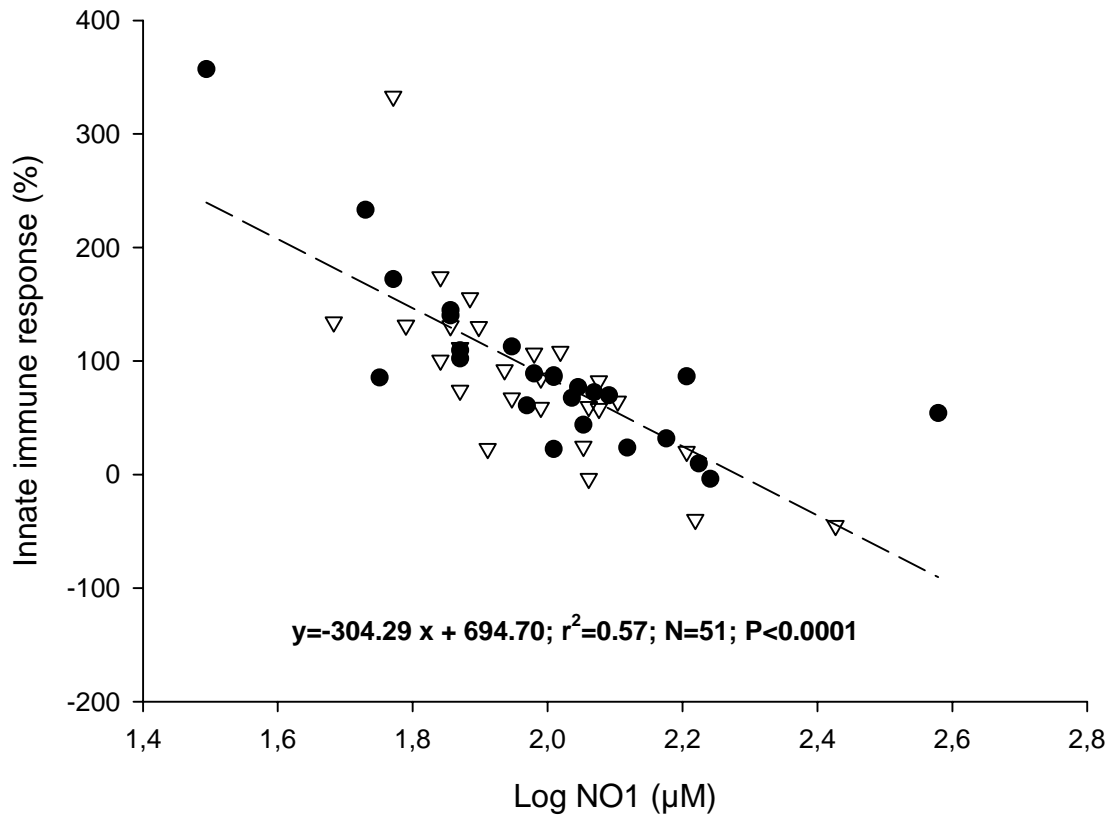


FIGURE 4.

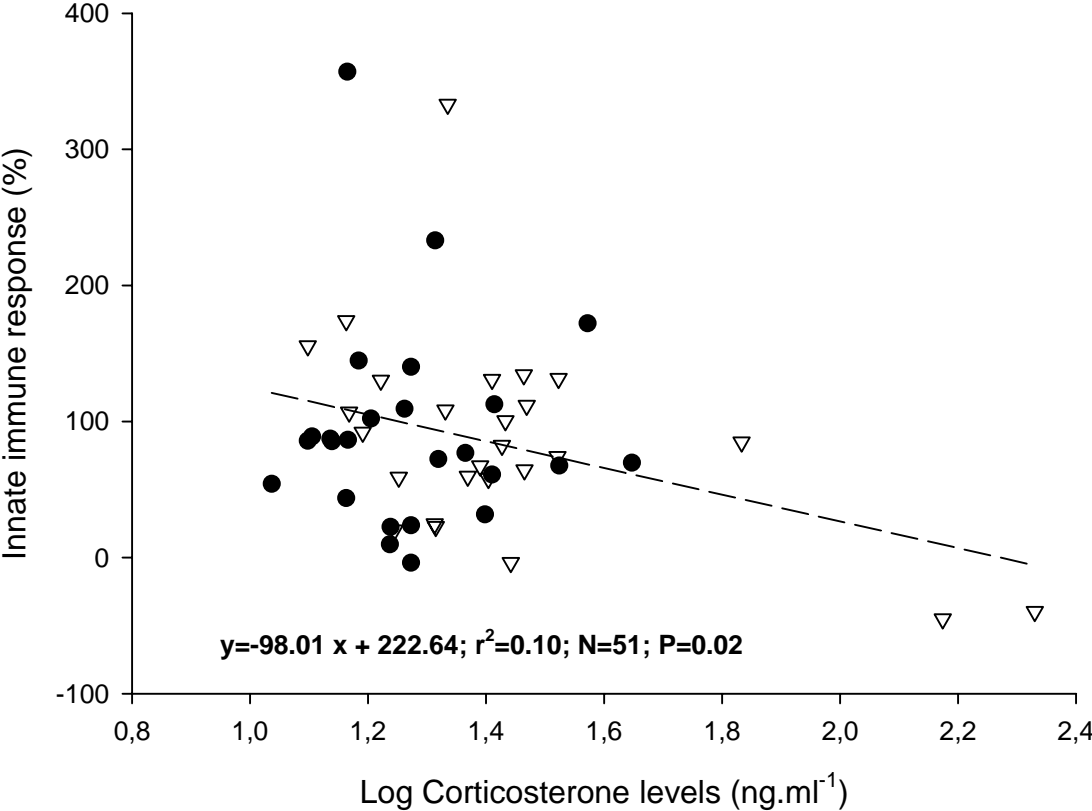
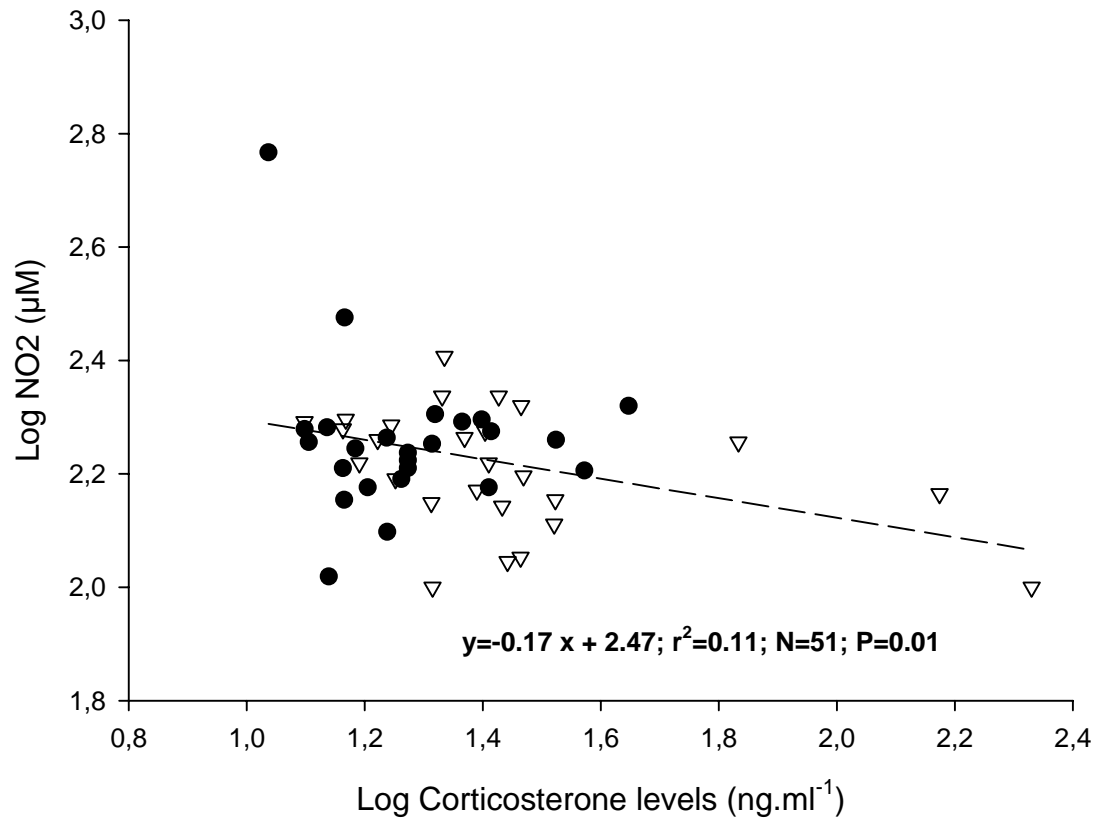
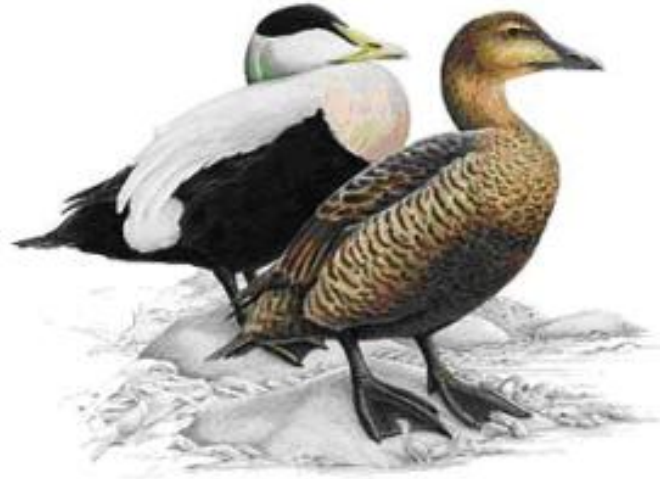


FIGURE 5.



ARTICLE III



Bourgeon, S., Martínez, J., Criscuolo, F., Le Maho, Y., Raclot, T.

2006

Fasting-induced changes of immunological and stress indicators in breeding female eiders.

General and Comparative Endocrinology 147 (3): 336-342

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Fasting-induced changes of immunological and stress indicators in breeding female eiders

Sophie Bourgeon, Javier Martínez, François Criscuolo, Yvon Le Maho, Thierry Raclot

General and Comparative Endocrinology, 2006, Vol.147, Pages 336–342

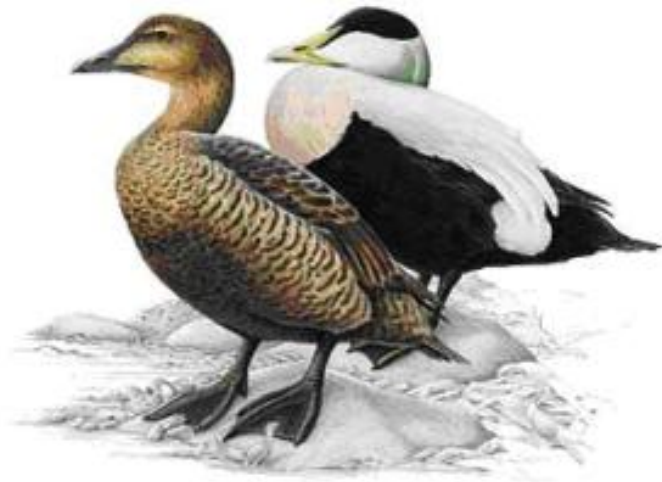
Pages 336 à 342 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://dx.doi.org/10.1016/j.yggen.2006.02.006>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

ARTICLE IV



Bourgeon, S., Raclot, T.

Triiodothyronine suppresses humoral immunity but not T-cell-mediated immune response in incubating female eiders (*Somateria mollissima*).

Soumis

Triiodothyronine suppresses humoral immunity but not T-cell-mediated immune response in incubating female eiders (*Somateria mollissima*).

Sophie Bourgeon and Thierry Raclot

*Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), Département Ecologie, Physiologie et Ethologie (DEPE), UMR 7178 CNRS-ULP,
23 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex 2, France*

Running title: Triiodothyronine and acquired immunity in eiders

Address for correspondence:

Sophie Bourgeon

IPHC, Département Ecologie, Physiologie et Ethologie, UMR 7178 CNRS-ULP,

23 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex 2, France

Tel: (33) 3.88.10.69.15

Fax: (33) 3.88.10.69.06

e-mail: sophie.bourgeon@c-strasbourg.fr

ABSTRACT

Immunity is believed to share limited resources with other physiological functions and this may partly account for the fitness costs of reproduction. Previous studies have shown that the acquired immunity of female common eiders (*Somateria mollissima*) is suppressed during the incubation fast. To save energy, triiodothyronine (T_3) is adaptively decreased during fasting in most bird species. However, the relationship between thyroid hormones and the immune system is not fully understood. The current study aimed to determine the endocrine mechanisms that underlie immunosuppression in incubating female eiders. To this end we assessed the effects of exogenous T_3 on both components of the acquired immune system in 42 free-ranging incubating birds. Half of the females were implanted with T_3 pellets, while the other half sham implanted served as control. We measured variations in the immunoglobulin index, the T-cell-mediated immune response, body mass, and plasma parameters in both groups before and after manipulation. T_3 levels in implanted females were 4 times higher and mass loss was 40 % greater than in control females. Implanted females also showed an 18 % decrease in the immunoglobulin index, while the T-cell-mediated immune response was not significantly affected by the treatment. Finally, the treatment did not induce any significant changes in corticosterone levels. Our study shows that exogenous T_3 decreased only one component of the acquired immune system. We suggest that the immunosuppressive effect of T_3 could be mediated by its effects on body fat reserves, possibly via leptin. Further experiments are required to determine 1) the relationship between adiposity and immune function, 2) the adaptive significance of immunosuppression during incubation in eiders.

Key-words: Acquired immunity; Birds; Body fat reserves; Fasting; Thyroid hormones

INTRODUCTION

Life-history theory predicts a trade-off between an organism's current reproductive effort and its future survival and reproductive success, where an increased reproductive effort could be deleterious to adult survival (Williams, 1966; Stearns, 1992). One potential mechanism whereby current reproductive effort may incur long-term reproductive costs is through a resource shift away from the immune system (Gustafsson et al., 1994; Sheldon and Verhulst, 1996; Råberg et al., 1998). Acquired immunity consists of two components (Roitt et al., 1998): humoral immunity (mediated by B-lymphocytes) and cell-mediated immunity (mediated by T-lymphocytes). Previous studies have shown that the acquired immunity of female common eiders (*Somateria mollissima*) is suppressed during the incubation fast (Hanssen et al., 2004; Bourgeon et al., in press) while its experimental activation has strong negative effects on the fitness of female eiders (Hanssen et al., 2004). However, Bourgeon et al. (in press) found that both components of the acquired immunity decrease independently of each other. Whatever the adaptive significance of such an immunosuppression in breeding eider ducks may be, the underlying physiological mechanisms are also largely unknown. Deerenberg et al. (1997) suggested that a reduced immunocompetence during reproduction could be related to hormonal changes.

Thermoregulation and energy metabolism are partially regulated by triiodothyronine (T_3) in mammals and birds (McNabb, 1995). While female eider ducks fast throughout incubation (Korschgen, 1977; Gabrielsen et al., 1991; Criscuolo et al., 2000), they also have to maintain a high body temperature, required for egg incubation (Criscuolo et al., 2003). Criscuolo et al. (2003) showed that T_3 levels in female eiders were maintained throughout incubation. Circulating T_3 , thermogenesis, and basal metabolic rate (BMR) were found to be positively correlated in precocial species during fasting (Sechman et al., 1989; Gabarrou et

al., 1997). Furthermore, daily energy expenditure and the T-cell-mediated immune response were negatively correlated in female pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*; Moreno et al., 2001). However, a depressed level of thyroid hormones led to a suppressed cytotoxic T-cell activity in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) (Fowles et al., 1997), while it increased the *in vitro* T-cell proliferative response to mitogenic stimulation in chickens (Williamson et al., 1990). Hence, the relationship between thyroid hormones and the immune system is far from understood (Smits et al., 2002) and remains to be clarified.

The main objective of our study was to examine the effects of increased plasma T₃ levels on both components of the acquired immunity in free-ranging female common eiders during their incubation phase. To this end, incubating females were implanted with T₃ pellets and compared to control birds. We subsequently measured variations of the female immunoglobulin index, the T-cell-mediated immune response, body mass, and plasma parameters and compared these with measurements from control birds prior to and after manipulation (i.e. implantation of T₃ pellets or sham implantation). We predicted that increased plasma T₃ levels, which will increase the energy expenditure of incubating female eiders, should have immunosuppressive effects. Implanted females should therefore show lower T-cell-mediated immune responses and/or a reduced immunoglobulin index than control birds.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in a common eider duck colony on Storholmen Island, Kongsfjorden, Svalbard Archipelago (78°55' N, 20°07' E) between June and July 2005. This breeding colony contained about 900 nests. Females laid between 1 and 6 eggs, but a clutch size of 4 to 5 eggs was most common (49.35 % and 24.62 %, respectively, N=845). Eider ducklings are precocial and are cared for by the female only. Incubation lasts between 24 and 26 days (Korschgen, 1977). All birds started their incubation between June 7 and June 13, the main laying period for the colony. Ducks that laid their eggs after this period were not considered in this study. Ambient temperatures in June and July ranged from 2 to 10°C.

Sampling protocol

Nests were checked at least every two days throughout the study period. This was done to determine initial clutch size but also to investigate the rate of egg predation and nest desertion. A clutch of eggs was considered complete when no additional egg was laid during a two-day period (Yoccoz et al., 2002). Female eiders were caught on their nests using a bamboo pole with a nylon snare. Blood was collected from the brachial vein within three minutes of capture, stored in tubes containing EDTA (an anticoagulant agent) and kept on ice until further processing. In the laboratory blood was centrifuged at 10,000 rpm for five minutes at 4°C. Plasma samples and blood cells were separately stored at -20°C and plasma was subsequently used to measure immunoglobulin, T₃, and corticosterone levels. After blood sampling, body size was recorded (wing and tarsus lengths) and birds were weighed with a portable electronic balance (± 2 g).

Experimental groups and T₃ implantation

A total of 42 females with a mean clutch size of 4 to 5 eggs (4.17 ± 0.38 eggs; mean \pm SD) were used in this study and captured on three occasions. To prevent nest desertion, we only caught birds that were already incubating for at least five days. Since both components of the acquired immunity decrease during whole incubation (Bourgeon et al., in press), we limited the present study to a relatively short time period, so that natural immunological changes occurring as the fasting is proceeding would not have confounding effects. Females were split into two experimental groups: birds with implanted T₃ pellets (N=21) and control females (N=21). Females from both groups were caught after about 10 days of incubation (9.95 ± 0.33 days, N=42; mean \pm SE). When taking the first blood sample, we also recorded body size and body mass. Before release, half of the females were implanted, while the others underwent the same procedure without actual implantation. All females were recaptured 6 to 8 days later (16.57 ± 0.42 days, N=42; mean \pm SE), when a second blood sample was taken and the PHA skin test was conducted (see below). Birds were again weighed before their release. Finally, all birds were captured 24 hours later to read the PHA skin test. Only nests which did not suffer any predation were included in our study.

T₃ pellets (100 mg, 21 day release, T-261) were purchased from Innovative Research of America (Sarasota, Florida, USA). In preliminary trials, this dose was sufficient to induce a marked increase in plasma T₃ levels, while also causing an increased loss in body mass (Bourgeon et al., unpublished observation). T₃ pellets were implanted subcutaneously at the back side of the birds' neck. For this, we shaved the skin of the concerned area and disinfected using alcohol and betadine (iodine solution). A small incision, equal to the size of the pellet was made and the implant was positioned underneath the skin. The skin was closed with a single stitch, using surgical thread. The wound was cleaned with betadine and sprayed with an aluminium powder.

T-cell-mediated immune response: PHA skin test

To evaluate the T-cell-mediated immune response, 100 μl of 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PHA (Sigma L 8754) in phosphate-buffered saline (PBS) were injected intradermally in the right wing-web. It has been shown previously that birds suffer little physiological stress from PHA injection (Merino et al., 1999). The left wing-web was injected with an equal volume of PBS as a control. The thickness of each wing-web was measured with a micrometer calliper (three readings), just prior to and 24 h after injection. The cell-mediated immune response was calculated as the difference in wing-web swelling between the mitogen-injected and control site. Since the PHA skin test could only be conducted once with each animal (a second injection would lead to a secondary immune response), we injected all birds 6 to 8 days after manipulation.

Immunoglobulin levels: ELISA test

The amount of serum immunoglobulins in avian blood has been assessed using a sensitive ELISA method. Commercial antichickens conjugate antibodies were used as reported by Martínez et al. (2003). This method has been validated in six wild avian species. Although the method has not been validated for Anseriforms, we assumed a linear cross-reactivity, despite the fact that Anseriforms have an additional immunoglobulin isotype (IgY), which is not found in other birds (Parham, 1995). We used the measurements obtained from these tests as an immunoglobulin index.

The serum dilution in eiders was determined by coating ELISA plates with serial dilutions of serum (100 μl) in carbonate-bicarbonate buffer (0.1M, pH=9.6) to investigate the linear range of the sigmoid curve. Data obtained from trials using the serum dilution nearest to the centre of its linear range were selected. To be coated, ninety-six-well ELISA plates were filled with 100 μl of diluted serum samples from female common eiders (two samples per female, diluted to 1/32000 in carbonate-bicarbonate buffer). The plates were first incubated for 1 h at 37°C

and then incubated overnight at 4°C. After washing the plates once with 200 µl of a solution of phosphate buffer saline and Tween (PBS-Tween), 100 µl of a solution containing 5% powdered milk in PBS was added. After a second incubation (1 h at 37°C) and a wash with PBS-Tween buffer, 100 µl of antichickens antibodies, diluted 1:250 (Sigma A 9046), were added and the plates were incubated for 2 h at 37°C. After three washes, the plates were finally filled with 100 µl of a solution (peroxide diluted in ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) 1:1000). Following incubation (1 h at 37°C), the plates were read using a 405 nm wavelength filter (Awareness Technology, Inc., Palm City, FL, USA).

Assessment of the T₃ and corticosterone levels

T₃ and corticosterone concentrations were determined by radioimmunoassay (RIA) in our laboratory using a ¹²⁵I RIA double antibody kit from ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, USA). The RIA for T₃ and corticosterone had an intra-assay variability of 5.1 % (N=20 duplicates) and 7.1 % (N=10 duplicates), respectively. Inter-assay variability was 7.0 % (N=59 duplicates) for T₃ and 6.5 % (N=15 duplicates) for corticosterone.

Statistical analyses

Statistical analysis was conducted with SPSS 12.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Values are means ± standard error (SE), unless otherwise indicated. Since all data were normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test, P>0.05), we used parametric tests. Repeated measure ANOVA was used to test for treatment effects on T₃ levels, body mass, corticosterone levels, and the immunoglobulin index. One-way ANOVA was used to test for the effects of the treatment on the T-cell-mediated immune response. Linear regressions were used to assess the relationships between all measured parameters.

RESULTS

Table 1 provides details about the female eiders used in this study. There was no significant difference between the two groups for any of the parameters measured (see Table 1) before manipulation. We also ensured that females from both groups were at a comparable incubation stage, when they were caught to undergo the PHA skin test (Table 1).

Effects of T₃ on body mass and corticosterone levels:

As expected, implants induced a significant increase in T₃ levels (repeated measures ANOVA: effects of repetition: $F_{1,40}=186.38$, $P<0.0001$; effects of group: $F_{1,40}=124.29$, $P<0.0001$; interaction: $F_{1,40}=150.03$, $P<0.0001$). After 6 days, T₃ levels were 4 times higher in implanted females than in control birds (Table 1). Body mass decreased significantly in T₃ implanted females (15 %), while this decrease was less pronounced in control females (9 %; repeated measures ANOVA: effects of repetition: $F_{1,40}=524.05$, $P<0.0001$; effects of group: $F_{1,40}=0.05$, $P=0.82$; interaction: $F_{1,40}=23.70$, $P<0.0001$). Consequently, body mass of T₃ females after 6 days was significantly lower than that of control females. In fact, body mass loss per day was 40 % greater in T₃ females than in control females (Table 1). However, linear regression analysis showed no significant relationship between T₃ levels and body mass, neither before nor after the treatment (Table 2). Corticosterone levels were not significantly affected by T₃ implants (repeated measures ANOVA: effects of repetition: $F_{1,40}=27.12$, $P<0.0001$; effects of group: $F_{1,40}=0.01$, $P=0.93$; interaction: $F_{1,40}=0.003$, $P=0.96$). While plasma corticosterone levels after 6 days were increased by 60 %, this increase was similar for both groups (Table 1). Again, we did not find a significant relationship between T₃ levels and plasma corticosterone, neither before nor after the treatment (Table 2). Similarly,

the relationship between corticosterone levels and body mass was not significant, neither before nor after the treatment (Table 2).

Effects of T₃ on immunoglobulin index and T-cell-mediated immune response:

Implanted females showed a similar T-cell-mediated immune response than control females (Table 1), indicating that T₃ implants had no significant effect on this parameter. Similarly, the relationship between T₃ levels after implantation and the T-cell-mediated immune response was not significant (Table 2). By contrast, the immunoglobulin index was significantly decreased in implanted females (18 %), while it actually increased by about 5 % in control females (repeated measures ANOVA: effects of repetition: $F_{1,40}=2.15$, $P=0.15$; effects of group: $F_{1,40}=0.05$, $P=0.83$; interaction: $F_{1,40}=8.17$, $P=0.007$; Fig. 1). Surprisingly, there was a significant positive relationship between T₃ levels and the immunoglobulin index only before the treatment (Table 2). This would indicate that high T₃ levels were associated with a high immunoglobulin index before the treatment but not thereafter (Fig. 2).

There was no significant relationship between the two components of the acquired immunity after hormone implantation (Table 2). Hence, the immunoglobulin index was independent of the T-cell-mediated immune response. Also, there was no significant relationship between the immunoglobulin index and plasma corticosterone levels or body mass, neither before nor after the treatment (Table 2). Furthermore, the T-cell-mediated immune response was not significantly related to neither plasma corticosterone levels, nor body mass (Table 2).

DISCUSSION

Previous studies have shown that the acquired immunity is significantly decreased during the incubation fast of female common eiders (Hanssen et al., 2004; Bourgeon et al., in press). To save energy, T_3 is adaptively decreased during fasting in most bird species (Harvey and Klandorf, 1983). This raises the question of the relationship between thyroid hormones and the immune system. Hence, the main objective of the current study was to investigate the endocrine mechanisms underlying the immunosuppression reported during fasting in incubating birds. To this end we assessed the effects of exogenous T_3 on both components of the acquired immune system in free-ranging female eider ducks.

Experimentally increased plasma T_3 levels affected only one of the two components of the acquired immunity. While the immunoglobulin index was significantly decreased in implanted females, when compared with control females, the T-cell-mediated immune response was not significantly affected by the treatment. Interestingly, while exogenous T_3 decreased the immunoglobulin index, high T_3 levels before the treatment were associated with a high immunoglobulin index. Similar to previous results (Bourgeon et al., in press), we did not find a significant relationship between both components of the acquired immunity. This supports the view that variations in one component are not necessarily a reliable indicator of changes in the other, as suggested by Norris and Evans (2000). In the present study, the immunoglobulin index was more sensitive to T_3 treatment than was the T-cell-mediated immune response. This is in accordance with previous results (Bourgeon et al., in press), which showed that, for the same time period, the immunoglobulin index decreases two times faster than the T-cell-mediated immune response in incubating eiders. We can therefore not exclude the possibility that effects of T_3 on the T-cell-mediated immune response might require more time and/or higher T_3 concentrations.

The treatment did not induce any significant changes in corticosterone levels. After 6 days, corticosterone levels in T₃ implanted females were similar to that of control females. Glucocorticoids, which are secreted during stressful activities, are an essential component of the endogenous immunoregulatory network (Apanius, 1998). Furthermore, Råberg et al. (1998) suggested that corticosterone reduces the adaptive immune function. However, since corticosterone levels in our study were not affected by the treatment, the observed decrease in the immunoglobulin index might be mediated by T₃, independently of corticosterone. Indeed, we did not find a significant relationship between corticosterone levels and the immunoglobulin index or the T-cell-mediated immune response, neither before, nor after the treatment. This is in agreement with results from an earlier study (Bourgeon et al., in press), which found that plasma corticosterone levels did not vary throughout the incubation period of female eiders.

T₃ partially regulates thermoregulation and energy metabolism in mammals and birds (McNabb, 1995). Accordingly, T₃ implanted females in our study lost significantly more weight than did control females. Norris and Evans (2000) proposed that immunocompetence may be fixed by the BMR, which is determined by energy reserves. Such a view on the relationship between energy metabolism and immunocompetence is supported by the existence of nutritional and endocrine factors that regulate both of these processes (Apanius, 1998). Since eider ducks do not feed during incubation, limited resources might be allocated for the reconstitution of tissues affected by gluconeogenesis, and, therefore be unavailable for the maintenance of immunity (Saino et al., 2002). Moreover, adipose tissue is no longer regarded only as a fat store but also as an important endocrine organ, responsible for the synthesis and secretion of several hormones and proteins (Ahima and Flier, 2000). It has recently been described as an active participant in the regulation of essential and prominent body processes, such as immune homeostasis (Matarese and La Cava, 2004). Some adipose

humoral signals are generated in proportion to fat stores and act on feedback control systems to influence food intake and energy expenditure (Matarese and La Cava, 2004). This latter fact raises the question of the hormonal control of the immune system by body reserves (Demas and Sakaria, 2005). The peptide hormone leptin is secreted primarily by adipose tissue and has been shown to enhance a variety of immunological parameters in mammals (Lord et al., 1998; Faggioni et al., 2001) and birds (Löhms et al., 2004). Since circulating levels of leptin are generally proportional to the amount of body fat (Löhms and Sundström, 2004; Matarese et al., 2005), decreases in body fat stores may affect immunity via changes in endocrine signalling (Demas and Sakaria, 2005). Exogenous administration of T_3 is likely to increase BMR, further depleting body energy stores. Consequently, leptin levels might be lowered in T_3 implanted birds, when compared with the controls. While the effects induced by leptin might favour survival under hostile conditions, concomitant starvation leads to immunosuppression and impaired fertility, because energy-consuming processes are switched off by leptin (Matarese and La Cava, 2004). The immunosuppressive effect of exogenous T_3 could therefore be mediated by leptin. For an examination of the role of this hormone in the immune function of fasting eiders, direct manipulation of leptin concentrations would be helpful (Löhms et al., 2004). In addition, since we found that an experimentally induced increase in the utilization of body reserves led to immunosuppression, it seems likely that immunocompetence is related to the amount of body fat available. Initial body condition and the subsequent utilization of endogenous reserves might therefore determine the observed variations in immune functioning throughout incubation. Females with a good initial body condition would be less prone to suffer immunosuppression during incubation than females with a bad initial body condition.

While the main goal of our study was to investigate the physiological mechanisms underlying immunosuppression in breeding eiders, it might also provide evidence regarding

its adaptive significance. Two hypotheses, which are not mutually exclusive, have been proposed to explain the immunosuppression observed during breeding. The immunopathology-avoidance hypothesis states that during heavy physical workloads, such as encountered during reproduction, the risk of an autoimmune response increases (Råberg et al., 1998). To decrease the risk of auto immunopathology, immunocompetence is down regulated. Råberg et al. (1998) suggested that such a down regulation would be mediated by corticosterone. However, in the present study we did not find a significant relationship between corticosterone levels and the T-cell-mediated immune response or the immunoglobulin index. The second hypothesis, termed the resource-limitation hypothesis, predicts that the investment in costly behaviours, such as reproduction, will reduce the amount of resources available to other systems, such as the immune system (Råberg et al., 1998). For this hypothesis to be valid, an energetic or nutritional cost associated with the maintenance and activation of the immune system is required (Råberg et al., 1998). While evidence for an energetically costly immune response is still equivocal (Råberg et al., 1998; Eraud et al., 2005; Verhulst et al., 2005), the present study shows that an increase in energy expenditure, caused by T_3 administration, had a negative effect on the females' immunoglobulin index. This would lend support to the latter hypothesis, illustrating the trade-off between one component of immunity and other resource demanding activities.

In conclusion, exogenous T_3 decreased only one component of the acquired immune function in incubating female eiders. While their immunoglobulin index was significantly decreased after T_3 administration, their T-cell-mediated immune response was not affected. Since T_3 implants did not induce changes in corticosterone concentrations, this would suggest that glucocorticoids were not involved in the observed decrease in the immunoglobulin index. Weight loss was significantly greater in T_3 implanted females than in control females. The immunosuppressive effect of T_3 might therefore be mediated by its effects on energy

expenditure and/or body fat reserves. In fact, leptin, which conveys information on energy availability, could be responsible for the observed immunosuppression in our study. Further experiments are required to shed more light onto the relationship between leptin, body condition and the immune system in incubating female eider ducks. Finally, the adaptive significance of immunosuppression during incubation in eider ducks still remains to be documented.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support for this work was provided by the Institut polaire français Paul Emile Victor (IPEV). S. Bourgeon was the recipient of a fellowship from the French MENRT during this study. This study was supported by the Norwegian Animal Research Authority and the Ethic Committee of the Institut Polaire Français Paul-Emile Victor. Permission to work on Common Eiders was granted by the Governor of Svalbard.

REFERENCES

- Ahima, R.S., Flier, J.S., 2000. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrin. Met.* 11, 327-332.
- Apanius, V., 1998. Stress and Immune Defense. *Adv. Stud. Behav.* 27, 133-153.
- Bourgeon, S., Criscuolo, F., Le Maho, Y., Raclot, T. Phytohemagglutinin response and immunoglobulin index decrease during incubation fasting in female Common Eiders. *Physiol. Biochem. Zool.*, in press.
- Criscuolo, F., Gauthier-Clerc, M., Gabrielsen, G.W., Le Maho, Y., 2000. Recess behaviour of the incubating Common Eider *Somateria mollissima*. *Polar Biol.* 23, 571-574.
- Criscuolo, F., Raclot, T., Le Maho, Y., Gabrielsen, G.W., 2003. Do T₃ levels in incubating Eiders reflect the cost of incubation among clutch sizes? *Physiol. Biochem. Zool.* 76 (2), 196-203.
- Deerenberg, C., Arpanius, V., Daan, S., Bos, N., 1997. Reproductive effort decreases antibody responsiveness. *Proc. R. Soc. B* 264, 1021-1029.
- Demas, G.E., Sakaria, S., 2005. Leptin regulates energetic tradeoffs between body fat and humoral immunity. *Proc. R. Soc. B* 272, 1845-1850.
- Eraud, C., Duriez, O., Chastel, O., Faivre, B., 2005. The energetic cost of humoral immunity in the Collared Dove, *Streptopelia decaocto*: is the magnitude sufficient to force energy-based trade-offs? *Funct. Ecol.* 19, 110-118.
- Faggioni, R., Feingold, K.R., Grunfeld, C., 2001. Leptin regulation of the immune response and the immuno-deficiency of malnutrition. *FASEB J.* 15, 2565-2571.
- Fowles, J.R., Fairbrother, A., Kervliet, N.I., 1997. Effects of induced hypo- and hyperthyroidism on immune function and plasma biochemistry in mallards (*Anas platyrhynchos*). *Comp. Biochem. Physiol.* 118 C (2), 213-220.

- Gabarrou, J.F., Duchamp, C., Williams, J., Geraert, P.A., 1997. A role for thyroid hormones in the regulation of diet-induced thermogenesis in birds. *Brit. J. Nutr.* 78, 963-973.
- Gabrielsen, G.W., Mehlum, F., Karlsen, H.E., Andresen, Ø., Parker, H., 1991. Energy cost during incubation and thermoregulation in the female Common Eider *Somateria mollissima*. *Norsk Polarinstitutt Skrifer* 195, 51-62.
- Gustafsson, L., Nordling, D., Andersson, M.S., Sheldon, B.C., Qvarnström, A., 1994. Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. *Philos. T. Roy. Soc. B* 346, 323-331.
- Hanssen, S.A., Hasselquist, D., Folstad, I., Erikstad, K.E., 2004. Costs of immunity: immune responsiveness reduces survival in a vertebrate. *Proc. R. Soc. B* 271, 925-930.
- Harvey, S., Klandorf, H., 1983. Reduced adrenocortical function and increased thyroid function in fasted and refed chickens. *J. Endocrinol.* 98, 129-135.
- Korschgen, C.E., 1977. Breeding stress of female Eiders in Maine. *J. Wildlife Manage.* 41 (3), 360-373.
- Löhmus, M., Olin, M., Sundström, L.F., Troedsson, M.H.T., Molitor, T.W., El Halawani, M., 2004. Leptin increases T-cell immune response in birds. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 245-250.
- Löhmus, M., Sundström, L.F., 2004. Leptin and social environment influence the risk-taking and feeding behaviour of Asian blue quail. *Anim. Behav.* 68, 607-612.
- Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R., Lechler, R.I., 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897-901.
- Martínez, J., Tomás, G., Merino, S., Arriero, E., Moreno, J., 2003. Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichickens antibodies. *Funct. Ecol.* 17, 700-706.

- Matarese, G., La Cava, A., 2004. The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends Immunol.* 5 (4), 193-200.
- Matarese, G., Moschos, S., Mantzoros, C.S., 2005. Leptin in immunology. *J. Immunol.* 173, 3137-3142.
- McNabb, F.M.A., 1995. Thyroid hormones, their activation, degradation and effects on metabolism. *J. Nutr.* 125, S1773-S1776.
- Merino, S., Martínez, J., Møller, A.P., Sanabria, L., De Lope, F., Perez, J., Rodriguez-Caabeiro, F., 1999. Phytohaemagglutinin injection assay and physiological stress in nestling house martins. *Anim. Behav.* 58, 219-222.
- Moreno, J., Sanz, J.J., Merino, S., Arriero, E., 2001. Daily energy expenditure and cell-mediated immunity in pied flycatchers while feeding nestlings: interaction with moult. *Oecologia* 129 (4), 492-497.
- Norris, K., Evans, M.R., 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav. Ecol.* 11, 19-26.
- Parham, P., 1995. The duck's dilemma. *Nature* 374, 16-17.
- Råberg, L., Grahn, M., Hasselquist, D., Svensson, E., 1998. On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proc. R. Soc. B* 265, 1637-1641.
- Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K., 1998. *Immunology*. London, Mosby.
- Saino, N., Incagli, M., Martinelli, R., Møller, A.P., 2002. Immune response of male barn swallows in relation to parental effort, corticosterone plasma levels, and sexual ornamentation. *Behav. Ecol.* 13, 169-174.
- Sechman, A., Niezgoda, J., Soboconski, R., 1989. The relationship between basal metabolic rate (BMR) and concentrations of plasma thyroid hormones in fasting cockerels. *Folia Biol.-Prague* 37, 83-90.

- Sheldon, B.C., Verhulst, S., 1996. Ecological immunology: costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 11 (8), 317-321.
- Smits, J.E., Fernie, K.J., Bortolotti, G.R., Marchant, T.A., 2002. Thyroid hormone suppression and cell-mediated immunomodulation in American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to PCBs. *Arch. Environ. Con. Tox.* 43, 338-344.
- Stearns, S.C., 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford.
- Verhulst, S., Riedstra, B., Wiersma, P., 2005. Brood size and immunity costs in zebra finches *Taeniopygia guttata*. *J. Avian Biol.* 36, 22-30.
- Williams, G.C., 1966. Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *Am. Nat.* 100, 687-690.
- Williamson, R.A., Davison, T.F., Payne, L.N., 1990. Effects of thyroid hormones on humoral and cell-mediated immune responses in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Dev. Comp. Immunol.* 14, 305-318.
- Yoccoz, N.G., Erikstad, K.E., Bustnes, J.O., Hanssen, S.A., Tveraa, T., 2002. Costs of reproduction in common eiders (*Somateria mollissima*): an assessment of relationships between reproduction based on observational and experimental studies. *J. Appl. Stat.* 29 (1-4), 57-64.

TABLES

Table 1. Profiles for both experimental groups of free-ranging incubating female eiders, before and after implantation of T₃ pellets. Control animals were sham implanted. Values are means ± SE.

Before implantation	Group 1: T ₃ females (N=21)	Group 2: Control females (N=21)	T-test	P
Initial clutch size (eggs)	4.19 ± 0.09	4.14 ± 0.08	0.40	0.69
Tarsus length (cm)	6.15 ± 0.03	6.08 ± 0.04	1.57	0.12
Wing length (cm)	29.30 ± 0.11	29.00 ± 0.16	1.56	0.12
Incubation stage at sampling (days)	10.09 ± 0.49	9.81 ± 0.45	0.43	0.67
Body mass at sampling (g)	1836 ± 31	1784 ± 28	1.25	0.13
Immunoglobulin index (absorbance units)	0.85 ± 0.04	0.78 ± 0.04	1.51	0.25
Triiodothyronine (pg.ml⁻¹)	12.26 ± 0.74	10.14 ± 0.89	1.84	0.07
Corticosterone (ng.ml⁻¹)	12.17 ± 1.30	11.94 ± 1.01	0.14	0.89

After implantation	Group 1: T ₃ females (N=21)	Group 2: Control females (N=21)	T-test	P
Incubation stage at sampling (days)	17.14 ± 0.60	16.00 ± 0.56	1.38	0.17
Body mass at sampling (g)	1590 ± 29	1624 ± 27	-0.87	0.39
Body mass loss per day (g)	35.62 ± 1.72	25.62 ± 1.44	4.46	<0.0001
Immunoglobulin index (absorbance units)	0.72 ± 0.04	0.82 ± 0.04	-1.63	0.11
T-cell-mediated immune response (mm)	0.98 ± 0.11	0.92 ± 0.11	0.42	0.68
Triiodothyronine (pg.ml⁻¹)	44.76 ± 2.25	11.90 ± 1.28	12.68	<0.0001
Corticosterone (ng.ml⁻¹)	19.45 ± 1.84	19.38 ± 1.82	0.03	0.98

Table 2. Results for linear regressions between immune parameters, body mass, T₃, and corticosterone levels in free-ranging incubating female eiders.

Before implantation	Body mass (g)	Immunoglobulin index (absorbance units)	Triiodothyronine (pg.ml ⁻¹)	Corticosterone (ng.ml ⁻¹)
Body mass (g)	-	F _{1,41} =2.16, P=0.15	F _{1,41} =2.90, P=0.10	F _{1,41} =0.69, P=0.41
Immunoglobulin index (absorbance units)		-	F _{1,41} =9.91, P=0.003	F _{1,41} =0.52, P=0.47
Triiodothyronine (pg.ml ⁻¹)			-	F _{1,41} =0.65, P=0.43

After implantation	Body mass (g)	Immunoglobulin index (absorbance units)	T-cell-mediated immune response (mm)	Triiodothyronine (pg.ml ⁻¹)	Corticosterone (ng.ml ⁻¹)
Body mass (g)	-	F _{1,41} =0.01, P=0.91	F _{1,41} =0.20, P=0.66	F _{1,41} =0.35, P=0.56	F _{1,41} =0.05, P=0.82
Immunoglobulin index (absorbance units)		-	F _{1,41} =0.35, P=0.56	F _{1,41} =1.03, P=0.31	F _{1,41} =1.11, P=0.30
T-cell-mediated immune response (mm)			-	F _{1,41} =0.38, P=0.54	F _{1,41} =0.72, P=0.40
Triiodothyronine (pg.ml ⁻¹)				-	F _{1,41} =0.01, P=0.92

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effects of T₃ administration on the immunoglobulin index in free-ranging incubating female eiders. Shown is the immunoglobulin index of T₃ implanted (▨) and control females (□) before and after manipulation. Values are mean ± SE. T₃, triiodothyronine. Lower case a and b indicate a significant difference between groups (LSD post-hoc tests).

Figure 2. Relationship between T₃ level and the immunoglobulin index in free-ranging incubating female eiders before implantation. T₃, triiodothyronine.

FIGURE 1.

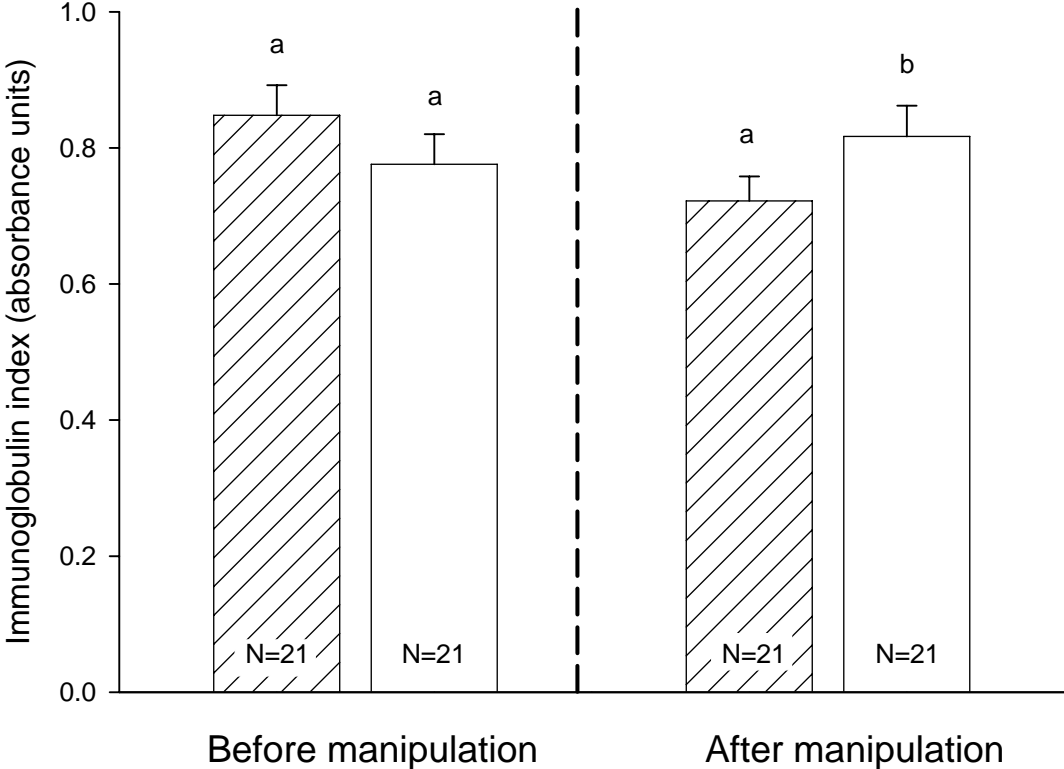
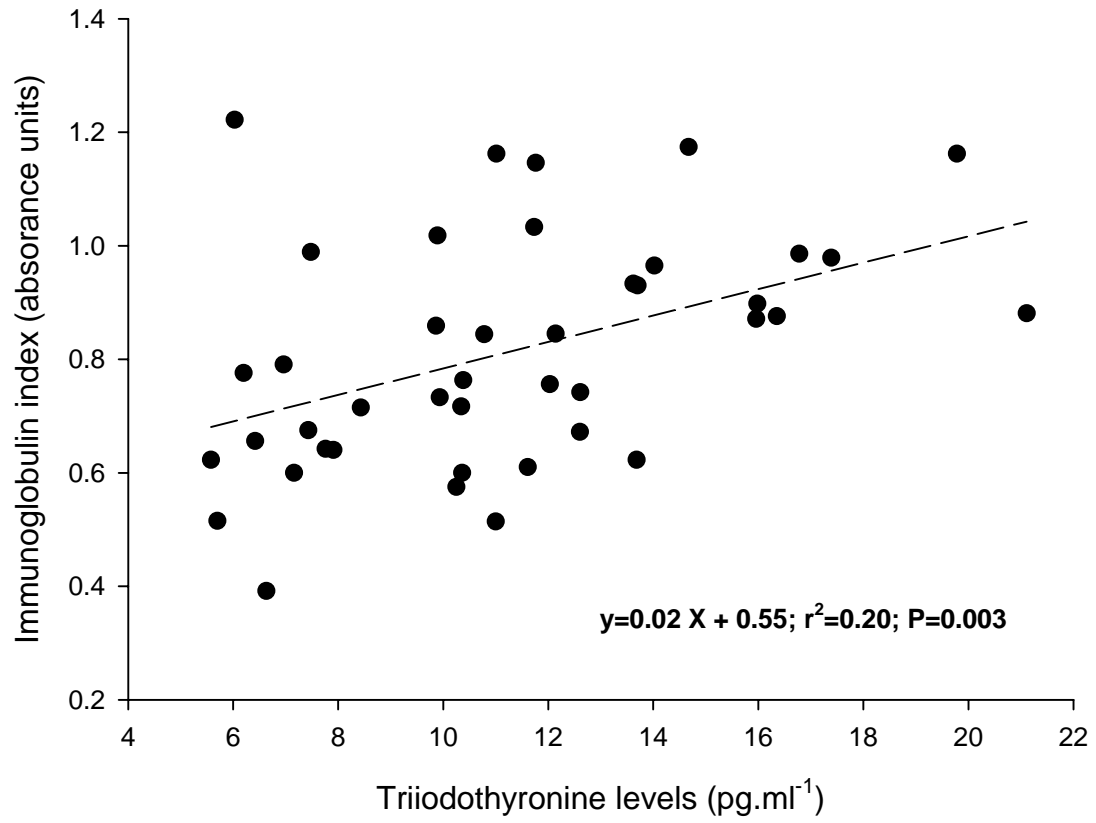
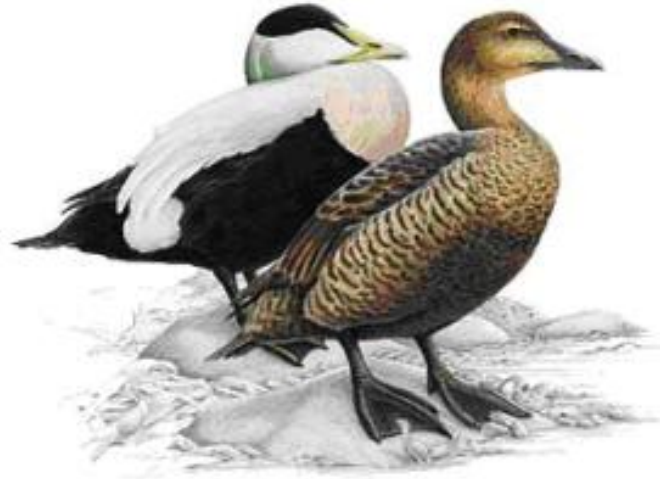


FIGURE 2.



ARTICLE V



Bourgeon, S., Raclot, T.

Corticosterone selectively modifies components of the acquired immunity in
female eiders during incubation.

Soumis

Corticosterone selectively modifies components of the acquired immunity in female eiders during incubation

Sophie Bourgeon* and Thierry Raclot

*Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), Département Ecologie, Physiologie et Ethologie (DEPE), UMR 7178 CNRS-ULP,
23 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex 2, France*

Running title: Corticosterone and immunity in birds

*To whom correspondence should be addressed:

Phone: (33) 3.88.10.69.15

Fax: (33) 3.88.10.69.06

E-mail: sophie.bourgeon@c-strasbourg.fr

SUMMARY

Immunity is hypothesized to share limited resources with other physiological functions and this may partly account for the fitness costs of reproduction. Previous studies have shown that the acquired immunity of female common eider ducks (*Somateria mollissima*) is suppressed during their incubation fast. Corticosterone was proposed to be an underlying physiological mechanism for such immunosuppression. Therefore, the current study aimed to assess the effects of exogenous corticosterone on both components of the acquired immunity in captive eiders. To this end, females were implanted with corticosterone pellets at different stages of their incubation fast. We measured variations in the immunoglobulin index, T-cell-mediated immune response, body mass and corticosterone levels in these females and compared them with those of control females prior to and after manipulation (i.e. corticosterone pellet implantation). To mimic corticosterone effects on body mass, we experimentally extended fasting duration in a group of females termed 'late fasters'. Implanted females had corticosterone levels 6 times higher and a mass loss 35 % greater than control females. Corticosterone levels in 'late fasters' were similar to those in control females but body mass was 8 % lower in the former. The decrease in the immunoglobulin index of implanted females was twice as high as in control females, while the T-cell-mediated immune response was not significantly affected by the treatment. We found a decrease in the T-cell-mediated immune response only in 'late fasters' (by 140 %), while the immunoglobulin index was not lower in this group than in corticosterone implanted or control females. Our study shows that in incubating eiders, exogenous corticosterone decreased only one of the components of the acquired immune system. We suggest that the immunosuppressive effect of corticosterone could be mediated through its effects on body reserves. Further experiments are required to determine the relationship between body condition and immune system in fasting birds.

Key-words: Birds; Body reserves; Fasting; Glucocorticoids; Immunosuppression

INTRODUCTION

Life-history theory assumes that a major trade-off occurs between reproduction and survival, so that the costs associated with a given reproductive effort might have a deleterious impact on adult survival and future reproduction (Williams, 1966; Stearns, 1992). A potential mechanism mediating such a trade-off could be the shifting of resources away from the immune system (Gustafsson et al., 1994; Sheldon and Verhulst, 1996; Råberg et al., 1998). Acquired immunity can be classified into humoral immunity (mediated by B-lymphocytes) and cell-mediated immunity (mediated by T-lymphocytes) (Roitt et al., 1998). Previous studies have shown that the acquired immunity of female common eiders (*Somateria mollissima*) is suppressed during the incubation fast (Hanssen et al., 2004; Bourgeon et al., in press), while its experimental activation has strong negative effects on the fitness of female eiders (Hanssen et al., 2004). Whatever the adaptive significance of such an immunosuppression in breeding eider ducks may be, the underlying physiological mechanisms still remain unknown. A link between reduced immunocompetence during reproduction and hormonal changes has been proposed (see Deerenberg et al., 1997).

Glucocorticoids are an essential component of the endogenous immunoregulatory network, while also being associated with stress. Hence, these hormones establish a close endocrine link between immunocompetence and stress (Apanius, 1998). Råberg et al. (1998) hypothesized that corticosterone, secreted during stressful activities, reduces the acquired immune function. However, while the T-cell-mediated immune response was suppressed by elevated corticosterone levels in non-breeding New-Jersey house sparrows (*Passer domesticus*; Martin II et al., 2005), it did not significantly covary with corticosterone concentrations in breeding barn swallows (*Hirundo rustica*; Saino et al., 2002). Similarly, Bourgeon et al. (in press) found that in female common eiders both components of the

acquired immunity decreased independently of plasma corticosterone levels, which itself did not vary significantly over the incubation period. However, depending on conditions during the breeding season, eiders complete their incubation either by using lipids as their major source of energy or by shifting toward protein utilization (Hollmén et al., 2001). This implies that incubating female eiders can enter phase III of fasting (see Le Maho et al., 1981; 1983). In several bird species (Le Maho et al., 1981; Cherel et al., 1988; Lindgård et al., 1992), fasting is characterized by a long period of protein sparing and preferential mobilization of fat stores (phase II), which is followed by a period of increased net protein catabolism (phase III). While phase II is characterized by the maintenance of low plasma levels of corticosterone, phase III of fasting is associated with an increase in plasma corticosterone levels. Such an elevation could be responsible for the increase in protein catabolism (proteolysis), because corticosterone is known to mobilize peripheral calorie stores for glucose production and energy utilization (Robin et al., 1998).

Our main objective in this study was to examine the effects of increased plasma corticosterone levels on both components of the acquired immunity in wild female common eiders at different stages of their incubation fast. To this end, female eiders, nesting in the high arctic, were implanted with corticosterone pellets both at the beginning and at the end of incubation. Subsequently, variations of female immunoglobulin index, T-cell-mediated immune response, body mass, and plasma corticosterone were measured and compared with those in control birds prior to and after manipulation. To mimic corticosterone effects on body mass, fasting duration in a group of females (termed 'late fasters') was experimentally extended. Body mass loss in these females was therefore increased, while corticosterone levels remained unaltered (birds remained in phase II and did not reach phase III). This allowed us to discriminate the effects of increased body mass loss on the acquired immunity from those of elevated corticosterone levels. We predicted that an increased plasma

corticosterone level, which increases proteolysis during the female fast, should have immunosuppressive effects. Implanted females should therefore show T-cell-mediated immune responses and/or an immunoglobulin index lower than in control females but similar to that of 'late fasters'.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in a common eider colony on Prins Heinrich Island, Kongsfjorden, Svalbard Archipelago (78°55' N, 20°07' E) between June and July 2005. The breeding colony in the study site contained about 105 nests. Females in the study area laid between one and five eggs, but a clutch size of three to four eggs was most common (20 % and 61 %, respectively, N=105). Eider ducklings are precocial and are cared for by the female only. Incubation lasts between 24 and 26 days (Korschgen, 1977). All birds started their incubation between June 07 and June 15, the main laying period for the colony. Ducks that laid their eggs after this period were not considered in this study. Ambient temperatures in June and July ranged from 2 to 10°C.

Sampling protocol

Nests were checked at least every second day throughout the study period. This was done to determine initial clutch size but also to investigate the rate of egg predation and nest desertion. A clutch of eggs was considered complete when no additional egg was laid during a two-day period (Yoccoz et al., 2002). Females which suffered partial egg predation were excluded from this study. Female eiders were caught on their nests using a bamboo pole with a nylon snare. Blood was collected from the brachial vein within three minutes of capture. It was stored in tubes containing EDTA (an anticoagulant agent) and kept on ice until being

centrifuged in the laboratory (at 10,000 rpm, for five minutes, at 4°C). Plasma samples and blood cells were separately stored at -20°C and plasma was subsequently used to measure immunoglobulin and corticosterone levels. After blood sampling, body size was recorded (wing and tarsus lengths) and birds were weighed with a portable electronic balance (± 2 g).

Experimental groups and corticosterone implantation

A total of 36 females with mean clutch sizes of three to four eggs (3.69 ± 0.47 eggs, $N=36$) (mean \pm SD) was used in this study. Freely incubating females were classified into two experimental groups: corticosterone ($N=18$) and control females ($N=18$). Since previous results have shown that both components of the acquired immune system are decreased during incubation in eider ducks (Bourgeon et al., in press), females from both groups were caught during the first part of incubation (10.64 ± 0.62 days, $N=22$) (mean \pm SE) (11 females from each group) and near the end of incubation (20.07 ± 0.24 days, $N=14$) (7 females from each group). After capture, a blood sample was taken, and body size and mass were recorded. Half of the females were then implanted with corticosterone pellets (see below), while the others underwent the same procedure without actual implantation. Birds were held in cages for the following 5 days at ambient temperatures, with snow given as fresh water *ad libitum*. Four days after the treatment (18.31 ± 0.87 days into their incubation, $N=36$) (mean \pm SE), another blood sample was taken, a PHA skin test conducted (see below), and body mass determined. Birds were released 24 hours later, after the PHA skin test had been read. Additionally, in a group termed 'late fasters', which consisted of 7 captive females with mean clutch sizes from two to five eggs (3.43 ± 1.40 eggs, $N=7$) (mean \pm SD), fasting duration was experimentally extended. Birds remained in phase II of fasting during experimentation and never entered into phase III. This protocol allowed to discriminate the effects of increased body mass loss on the acquired immunity from those of elevated corticosterone levels. To this

end, we caught 7 females that had been incubating eggs for at least 23 days (24.86 ± 0.40 days, N=7) (mean \pm SE), i.e. eggs were close to hatching. We took a blood sample and recorded body size and mass. Females were then held in captivity for five days (29.86 ± 0.40 days into their incubation, N=7) (mean \pm SE), at which point a further blood sample was taken, a PHA skin test performed (see below), and body mass recorded. Females were released 24 hours after this, when the PHA skin test had been read.

Corticosterone pellets (100 mg, 21 day release, G-111) were obtained from Innovative Research of America (Sarasota, Florida, USA). The implants slowly release the hormone which enters the bloodstream. In preliminary trials we found that this dose was sufficient to induce marked increases in the level of plasma corticosterone and accelerate body mass loss as early as two days after the start of treatment (S. Bourgeon et al., unpublished data). For the implantation of the corticosterone pellets we followed the recommendations of the manufacturer. Briefly, a small patch of skin at the back side of the birds' neck was shaved and disinfected using alcohol and betadine (iodine solution). A small incision equal to the size of the pellet was made and the implant was inserted underneath the skin. The skin was closed with a single stitch, using surgical thread. The wound was cleaned with betadine and sprayed with an aluminium powder. The surgical procedure required less than 10 minutes. Control animals underwent the identical procedure, without actual insertion of a pellet.

T-cell-mediated immune response: PHA skin test

For this test we challenged one wing-web with the mitogenic phytohemagglutinin (PHA), while the other wing-web (control) was injected with phosphate buffered saline (PBS). Briefly, 100 μ l of 5 mg.ml⁻¹ PHA (Sigma L 8754) in PBS were injected intradermally into the right wing-web, while the left wing-web was injected with an equal volume of PBS. This procedure was shown to induce little physiological stress in birds (Merino et al., 1999).

Injection sites on the wing-web were measured with a micrometer calliper (three readings) just before and 24 h after injection with PHA or PBS. The T-cell-mediated immune response was taken as the difference between the two wing-web swellings. Injecting the same bird twice would imply measuring a secondary immune response. Hence, we only conducted one skin test per bird, after 4 days of treatment.

Immunoglobulin levels: ELISA test

A sensitive ELISA method was used to determine the amount of serum immunoglobulins in eider duck blood. This method using commercial anti-chicken antibodies has so far been validated in six wild avian species (Martinez et al., 2003). Despite the fact that Anseriforms have an additional immunoglobulin isotype (IgY), which is not found in other birds (Parham, 1995), we assumed linear cross-reactivity. Accordingly, the values obtained were used as an immunoglobulin index.

To determine the linear range of the sigmoid curve, ELISA plates were coated with serial dilutions of serum (100 µl) in carbonate–bicarbonate buffer (0.1 M, pH = 9.6) and incubated overnight at 4°C. We selected the data obtained from trials using the serum dilution nearest to the centre of its linear range. ELISA plates were then coated with 100 µl of diluted serum samples from female eiders (two samples per female diluted to 1/32000 in carbonate-bicarbonate buffer) and incubated for 1 h at 37°C. After a second incubation overnight at 4°C, the plates were washed with a solution (200 µl) of phosphate buffer saline and Tween (PBS-Tween), and a diluent (100 µl), containing 5% powdered milk in PBS was added. Following incubation for 1 h at 37°C, the plates were washed with PBS-Tween buffer. 100 µl of anti-chicken conjugate (Sigma A 9046) was added at 1:250 and the plates were incubated for 2 h at 37°C. After three washes, the plates were filled with 100 µl of a solution consisting of 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) and concentrated hydrogen

peroxide diluted to 1:1000. Following incubation for 1 h at 37°C, absorbance was measured at 405 nm using a plate spectrophotometer (Awareness Technology, Inc., Palm City, FL 34991, USA).

Assessment of the corticosterone levels

Corticosterone concentrations were determined by radioimmunoassay (RIA) in our laboratory using an ¹²⁵I RIA double antibody kit from ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, USA). The corticosterone RIA had an intra-assay variability of 7.1 % (N=10 duplicates) and an inter-assay variability of 6.5 % (N=15 duplicates).

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with SPSS 12.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Values are means ± standard error (SE), unless otherwise indicated. Corticosterone levels were not normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test, P<0.05). Hence, data were log transformed to meet parametric assumptions, before parametric tests were used. Repeated measures two-way ANOVA was used to test for the effects of the treatment and incubation stage on corticosterone levels, body mass and immunoglobulin index. Two-way ANOVA was used to test for the effects of the treatment and incubation stage on the T-cell-mediated immune response. Linear regression analysis was used to assess the relationships between all parameters measured.

RESULTS

Tables 1 and 2 provide details for the female eider ducks (before and after implantation) sampled during the first part and near the end of their incubation period, respectively. Initial

clutch size, tarsus and wing lengths, days of incubation, body mass, immunoglobulin index and corticosterone levels were not significantly different between the experimental and control group before manipulation (i.e. corticosterone pellet implantation) at both incubation stages.

Effects of corticosterone implants on body mass:

As expected, implants induced a significant increase in corticosterone levels (repeated measures two-way ANOVA: effects of repetition: $F_{1,32}=65.95$, $P<0.0001$; effects of group: $F_{1,32}=54.16$, $P<0.0001$; effects of incubation stage: $F_{1,32}=0.06$, $P=0.81$; interaction: $F_{1,32}=0.73$, $P=0.40$). Four days after implantation, corticosterone levels in implanted birds were 6 times higher than in control females, independent of incubation stage. Moreover, corticosterone levels in 'late fasters' were far below the levels of implanted females. In fact, they were not significantly different from the levels in control females sampled at the end of their incubation period (repeated measures one-way ANOVA: effects of repetition: $F_{1,18}=15.81$, $P=0.001$; effects of group: $F_{2,18}=8.36$, $P=0.003$). Body mass in corticosterone implanted females was significantly decreased by 18 %, while it only decreased by 12 % in control females (repeated measures two-way ANOVA: effects of repetition: $F_{1,32}=1191.35$, $P<0.0001$; effects of group: $F_{1,32}=30.46$, $P<0.0001$; effects of incubation stage: $F_{1,32}=0.10$, $P=0.33$; interaction: $F_{1,32}=0.78$, $P=0.38$). Four days after implantation, implanted females were significantly lighter than control females (by 8 %), independent of the incubation stage. In fact, body mass loss per day in implanted females was 35 % higher than in control females, regardless of the incubation stage (two-way ANOVA: effects of group: $F_{1,32}=25.89$, $P<0.0001$; effects of incubation stage: $F_{1,32}=1.29$, $P=0.26$; interaction: $F_{1,32}=0.01$, $P=0.92$). Corticosterone levels in birds during early incubation were negatively related to body mass only after the implantation (Table 3), when high corticosterone levels were associated with low body mass values. However, there

was no significant relationship between these parameters in birds near the end of their incubation period, neither before nor after implantation (Table 4). Finally, body mass of 'late fasters' was not significantly different from that of implanted females but was significantly lower than in control females sampled at the end of their incubation (8 %; Table 2) (repeated measures one-way ANOVA: effects of repetition: $F_{1,18}=707.63$, $P<0.0001$; effects of group: $F_{2,18}=10.89$, $P=0.001$).

Effects of corticosterone on the T-cell-mediated immune response and immunoglobulin index:

Corticosterone implants had no significant effect on the T-cell-mediated immune response (two-way ANOVA: effects of group: $F_{1,32}=2.49$, $P=0.12$; effects of incubation stage: $F_{1,32}=2.94$, $P=0.10$; interaction: $F_{1,32}=0.003$, $P=0.95$; Fig. 1). Responses in implanted females were similar to that of control females, independent of the incubation stage. However, the immune response in 'late fasters' was significantly reduced when compared with implanted and control females at the end of their incubation (114 % and 172 %, respectively) (one-way ANOVA: effects of group: $F_{2,18}=9.39$, $P=0.002$; Fig. 1). There was no relationship between the T-cell-mediated immune response and plasma corticosterone levels at any stage (Tables 3 and 4). However, there was a positive significant relationship between the T-cell-mediated immune response and body mass but only during early incubation (Tables 3 and 4), so that the immune response was stronger in heavier females.

After four days, the immunoglobulin index in implanted females was significantly decreased by 83 and 50 %, when sampled during early and late incubation, respectively. The corresponding decline in immunoglobulin index of control females was only 33 % and 34 % (repeated measures two-way ANOVA: effects of repetition: $F_{1,32}=105.10$, $P<0.0001$; effects of group: $F_{1,32}=7.34$, $P=0.01$; effects of incubation stage: $F_{1,32}=7.14$, $P=0.01$; interaction:

$F_{1,32}=2.77$, $P=0.11$; Fig. 2), indicating that corticosterone pellet implantation had a negative effect on the female immunoglobulin index. This effect was stronger when implantation occurred during early incubation rather than during late incubation. The immunoglobulin index in 'late fasters' was not significantly different from that of implanted or control females sampled near the end of their incubation (repeated measures one-way ANOVA: effects of repetition: $F_{1,18}=78.15$, $P<0.0001$; effects of group: $F_{2,18}=0.74$, $P=0.49$; Fig. 2). We found no relationship between the immunoglobulin index and plasma corticosterone levels, neither before nor after the treatment during early incubation. The same held true for the period after implantation, when birds were near the end of incubation. By contrast, both parameters were negatively related before implantation of ducks that were near the end of the incubation period. High corticosterone levels were then associated with a low immunoglobulin index (Table 4; Fig. 3). Furthermore, there was no relationship between the immunoglobulin index and body mass, neither before nor after the treatment at any stage of incubation (Tables 3 and 4). Finally, we did not find a relationship between both components of the acquired immunity after hormone implantation at any stage of the eider duck incubation period (Tables 3 and 4). Hence, the immunoglobulin index was independent of the T-cell-mediated immune response.

DISCUSSION

It has previously been shown that the acquired immunity is significantly decreased during the incubation fast of female common eiders (Hanssen et al., 2004; Bourgeon et al., in press). Reduced immunocompetence during reproduction has been attributed to hormonal regulation, in particular through the action of glucocorticoids (Deerenberg et al., 1997; Råberg et al., 1998). Hence, the main objective of the current study was to investigate the potential physiological mechanisms underlying such immunosuppression. We therefore assessed the

effects of exogenous corticosterone on both components of the acquired immune system in female eiders during different stages of their incubation fast. In addition, a group of females whose fasting duration was experimentally extended was used to discriminate the effects of increased body mass loss on the acquired immunity from those of elevated corticosterone levels.

Experimentally increased plasma corticosterone levels only affected one of the two components of the acquired immunity. The immunoglobulin index in implanted females was significantly decreased when compared with that of control females. This response was strongest when birds were implanted at the beginning of their incubation fast. However, the T-cell-mediated immune response was not significantly affected by the treatment. Paradoxically, there was no significant relationship between plasma corticosterone levels and immunoglobulin index after the implantation at any incubation stage. By contrast, before the treatment in ducks that were near the end of their incubation, high corticosterone levels seemed to be associated with a low immunoglobulin index. Similar to an earlier investigation (Bourgeon et al., in press), we did not find a significant relationship between both components of the acquired immunity. This lends support to the view that variations in one component of the acquired immunity are not necessarily a reliable indicator of changes in the other (Norris and Evans, 2000). In fact, in the present study, the immunoglobulin index seemed to be more sensitive to corticosterone treatment than the T-cell-mediated immune response. In control females, the immunoglobulin index significantly decreased throughout incubation, while the T-cell-mediated immune response did not vary significantly. This would seem to contrast with the finding of a previous investigation (Bourgeon et al., in press) reporting that both components significantly decrease throughout the incubation fast of eider ducks. In the current study, a significant decrease in the T-cell-mediated immune response was only observed in 'late fasters', while their immunoglobulin index was not lower than that

of corticosterone implanted or control females. Implanted females significantly lost more weight than control females, which is consistent with the observation by Cherel et al. (1988) that high levels of corticosterone increase proteolysis in fasting birds. In a preliminary study on captive female eiders, high doses of exogenous corticosterone, administered for a few days, induced a rise in plasma levels of uric acid, indicating protein breakdown (Criscuolo et al., 2005). Corticosterone levels of 'late fasters' in the current study were similar to that of control females but body mass was 8 % lower in the former. Hence, the T-cell-mediated immune response appears to be more sensitive to body mass loss than to elevated levels of corticosterone, supporting the view of an indirect effect of corticosterone on this immune parameter. Accordingly, in the present study we found a positive relationship between body mass and T-cell-mediated immune response, where the response was stronger in females with a greater body mass. By contrast, the immunoglobulin index appears to be more sensitive to high corticosterone levels than to body mass loss. Nevertheless, corticosterone levels and body mass were negatively related in the current study, so that high levels of corticosterone were associated with low body mass. Our results agree with previous findings from breeding black-legged kittiwakes (*Rissa tridactyla*), where high corticosterone levels were associated with a marked decline in body condition (Kitaysky et al., 1999). In this context, it would be interesting for future studies 1) to experimentally extend the fasting duration of eiders until they reach phase III of fasting or 2) to find free-ranging birds which spontaneously shift from lipid to protein utilization, so that the effects of both elevated corticosterone levels and decreased body mass on the acquired immunity can be examined.

The present study showed that an increasing body mass loss, caused either by corticosterone administration, or by an experimental extension of fasting duration, had negative effects on the females' acquired immunity. While the former affected the birds' immunoglobulin index, the latter affected their T-cell-mediated immune response. This result

lends support to the resource-limitation hypothesis which predicts that investment in costly behaviours, such as reproduction, reduces the amount of resources available to other systems, such as the immune system (Råberg et al., 1998). However, evidence for an energetically costly immune response is still equivocal (Råberg et al., 1998; Eraud et al., 2005; Verhulst et al., 2005). Corticosterone was proposed to regulate immunosuppression in incubating fasting birds (Deerenberg et al., 1997; Råberg et al., 1998; Saino et al., 2003). However, during fasting corticosterone should be maintained at low levels to avoid metabolism disorders, such as protein catabolism (Cherel et al., 1988). In the current study we did not find marked variations in corticosterone levels during the incubation period of control and ‘late fasting’ females. However, ‘late fasters’ had a lower T-cell-mediated immune responses than corticosterone implanted or control females. This would support the view that fasting duration and/or body composition (see below) might be relevant parameters for immunosuppression. Another possible explanation for the observed pattern could be that corticosterone and body mass loss have opposing effects on the T-cell-mediated immune response. This would imply that corticosterone has immunostimulating properties to counteract the effects of body reserve depletion in ‘late fasters’, which is in marked contrast with data from the literature.

Other aspects of immunosuppression, namely humoral immunity, could be mediated by factors related to fuel utilization or body mass loss. Such a relationship between energy storage/mobilization and immunocompetence might plausibly be mediated through nutritional and/or endocrine factors (Apanius, 1998). Since female eiders fast throughout incubation, critical resources might be allocated to tissues that require gluconeogenesis and, hence, be unavailable for the immune system (Saino et al., 2002). Exogenous administration of corticosterone is likely to increase proteolysis. Consequently, lean body mass will be decreased, while the energy stored as lipids within the body will be spared. Hence, for the same final body mass, adiposity of ‘late fasters’ should be lower than for corticosterone

implanted females. This was reported to be the case in dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*; Gray et al., 1990). Currently, adipose tissue is perceived as an active participant in the regulation of essential and prominent body processes such as immune homeostasis (Matarese and La Cava, 2004). This raises the question of how body reserves might control the immune system (Demas and Sakaria, 2005). Some adipose humoral signals, such as leptin, are generated in proportion to fat stores and act on feedback control systems to influence numerous biological processes (Löhmus and Sundtröm, 2004; Matarese et al., 2005). In fact, leptin is secreted primarily by adipose tissue and has been shown to enhance a variety of immunological parameters in mammals (Lord et al., 1998; Faggioni et al., 2001) and birds (Löhmus et al., 2004). Consequently, leptin levels might be lower in ‘late fasters’ when compared with corticosterone implanted eiders. To gain further insight into the role that leptin plays for the immune system of fasting birds, plasma measurements of leptin and manipulation of its circulating concentrations would be useful.

In conclusion, exogenous corticosterone decreased only one component of the acquired immune system in incubating female eider ducks. While the treatment significantly decreased their immunoglobulin index, their T-cell-mediated immune response was not affected. Implanted females lost significantly more weight than control birds. Females, whose fasting duration was experimentally extended, increasing body mass loss, displayed lower T-cell-mediated immune responses than implanted females, while their corticosterone levels remained at baseline values. Consequently, the immunosuppressive effect of corticosterone appears to be mediated by its effect on body reserves, which have been shown to play an important role in the regulation of the immune system. For example, leptin, which conveys information on energy availability, could be involved in the observed immunosuppression. Further experiments are required to determine the relationship between body condition and immune function in incubating female eiders. Our results raise the question of the

physiological mechanisms which can explain the effects of corticosterone on the immune response. Furthermore, could it be that depending on its concentration, this hormone is able to trigger different responses, as has already been reported in the context of foraging behaviour (Wingfield et al., 1998).

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support for this study was provided by the Institut polaire français Paul Emile Victor (IPEV) and through a fellowship from the French MENRT to S. Bourgeon. The study was approved by the Norwegian Animal Research Authority and the Ethic Committee of the Institut Polaire Français Paul-Emile Victor. Permission to work on Common Eiders was also granted by the Governor of Svalbard.

REFERENCES

- Apanius, V.** (1998) Stress and Immune Defense. *Adv. Stud. Behav.* **27**, 133-153.
- Bourgeon, S., Criscuolo, F., Le Maho, Y. and Raclot, T.** Phytohemagglutinin response and immunoglobulin index decrease during incubation fasting in female Common Eiders. *Physiol. Biochem. Zool.*, in press.
- Cherel, Y., Robin, J-P., Walch, O., Karmann, H., Netchitailo, P. and Le Maho, Y.** (1988) Fasting in king penguins I. Hormonal and metabolic changes during breeding. *Am. J. Physiol.* **254**, R170-R177.
- Criscuolo, F., Chatsel, O., Berile, F., Gabrielsen, G.W., Le Maho, Y. and Raclot, T.** (2005) Corticosterone alone does not trigger a short term behavioural shift in incubating female common eiders *Somateria mollissima*, but does modify long term reproductive success. *J. Avian Biol.* **36**, 306-312.
- Deerenberg C., Arpanius, V., Daan, S. and Bos, N.** (1997) Reproductive effort decreases antibody responsiveness. *Proc. R. Soc. B* **264**, 1021- 1029.
- Demas, G.E. and Sakaria, S.** (2005) Leptin regulates energetic tradeoffs between body fat and humoral immunity. *Proc. R. Soc. B* **272**, 1845-1850.
- Eraud, C., Duriez, O., Chastel, O. and Faivre, B.** (2005) The energetic cost of humoral immunity in the Collared Dove, *Streptopelia decaocto*: is the magnitude sufficient to force energy-based trade-offs? *Funct. Ecol.* **19**, 110-118.
- Faggioni, R., Feingold, K.R. and Grunfeld, C.** (2001) Leptin regulation of the immune response and the immuno-deficiency of malnutrition. *FASEB J.* **15**, 2565-2571.
- Gray, J.M., Yarian, Y. and Ramenofsky, M.** (1990) Corticosterone, foraging behavior, and metabolism in Dark-Eyed Juncos, *Junco hyemalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **79**, 375-384.

- Gustafsson, L., Nordling, D., Andersson, M.S., Sheldon, B.C. and Qvarnström, A.** (1994) Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. *Philos. T. Roy. Soc. B* **346**, 323-331.
- Hanssen, S.A., Hasselquist, D., Folstad, I. and Erikstad, K.J.** (2004) Costs of immunity: immune responsiveness reduces survival in a vertebrate. *Proc. Roy. Soc. B* **271**, 925-930.
- Hollmén, T., Franson, J.C., Hario, M., Sankari, S., Kilpi, M. and Lindström, K.** (2001) Use of serum biochemistry to evaluate nutritional status and health of incubating Common Eiders (*Somateria mollissima*) in Finland. *Physiol. Biochem. Zool.* **74** (3), 333-342.
- Kitaysky, A.S., Wingfield, J.C. and Piatt, J.F.** (1999) Dynamics of food availability, body condition and physiological response in breeding black-legged kittiwakes. *Funct. Ecol.* **13**, 577-585.
- Korschgen, C.E.** (1977) Breeding stress of female Eiders in Maine. *J. Wildlife Manage.* **41** (3), 360-373.
- Le Maho, Y.** (1983) Metabolic adaptations to long-term fasting in Antarctic penguins and domestic geese. *J. Therm. Biol.* **8**, 91-96.
- Le Maho, Y., Vu Van Kha, H., Koubi, H., Dewasmes, G., Girard, J., Ferre, P. and Cagnard, M.** (1981) Body composition, energy expenditure, and plasma metabolites in long-term fasting geese. *Am. J. Physiol.* **241**, E342-E354.
- Lindgård, K., Stokkan, K. A., Le Maho, Y. and Groscolas, R.** (1992) Protein utilization during starvation in fat and lean Svalbard ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*). *J. Comp. Physiol. B.* **162**, 607-613.

- Löhmus, M., Olin, M., Sundström, L.F., Troedsson, M.H.T., Molitor, T.W. and El Halawani, M.** (2004) Leptin increases T-cell immune response in birds. *Gen. Comp. Endocrinol.* **139**, 245-250.
- Löhmus, M. and Sundström, L.F.** (2004) Leptin and social environment influence the risk-taking and feeding behaviour of Asian blue quail. *Anim. Behav.* **68**, 607-612.
- Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R. and Lechler, R.I.** (1998) Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* **394**, 897-901.
- Martin II, L.B., Gilliam, J., Han, P., Lee, K. and Wilelski, M.** (2005) Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical House Sparrows, *Passer domesticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **140**, 126-135.
- Martinez, J., Tomás, G., Merino, S., Arriero, E. and Moreno, J.** (2003) Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichickens antibodies. *Funct. Ecol.* **17**, 700-706.
- Matarese, G. and La Cava, A.** (2004) The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends Immunol.* **25** (4), 193-200.
- Matarese, G., Moschos, S. and Mantzoros, C.S.** (2005) Leptin in immunology. *J. Immunol.* **173**, 3137-3142.
- Merino, S., Martinez, J., Møller, A.P., Sanabria, L., De Lope, F., Perez, J. and Rodriguez-Caabeiro, F.** (1999) Phytohaemagglutinin injection assay and physiological stress in nestling house martins. *Anim. Behav.* **58**, 219-222.
- Norris, K. and Evans, M.R.** (2000) Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav. Ecol.* **11** (1), 19-26.
- Parham, P.** (1995) The duck's dilemma. *Nature* **374**, 16-17.

- Råberg, L., Grahn, M., Hasselquist, D. and Svensson, E.** (1998) On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proc. Roy. Soc. B* **265**, 1637-1641.
- Robin, J-P., Boucontet, L., Chillet, P. and Groscolas, R.** (1998) Behavioral changes in fasting emperor penguins: evidence for a "refeeding signal" linked to a metabolic shift. *Am. J. Physiol.* **274**, R746-R753.
- Roitt I.M., Brostoff, J. and Male, D.K.** (1998) Immunology. Mosby, London.
- Saino N., Incagli, M., Martinelli, R. and Møller, A.P.** (2002) Immune response of male barn swallows in relation to parental effort, corticosterone plasma levels, and sexual ornamentation. *Behav. Ecol.* **13**, 169-174.
- Saino, N., Suffritti, C., Martinelli, R., Rubolini, D. and Møller, A.P.** (2003) Immune response covaries with corticosterone plasma levels under experimentally stressful conditions in nestling barn swallows (*Hirundo rustica*). *Behav. Ecol.* **14** (3), 318-325.
- Sheldon, B.C. and Verhulst, S.** (1996) Ecological immunology: costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* **11** (8), 317-321.
- Stearns, S.C.** (1992) The evolution of life histories. Oxford University Press, Oxford.
- Verhulst, S., Riedstra, B. and Wiersma, P.** (2005) Brood size and immunity costs in zebra finches *Taeniopygia guttata*. *J. Avian Biol.* **36**, 22-30.
- Williams, G.C.** (1966) Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *Am. Nat.* **100**, 687-690.
- Wingfield, J.C., Maney, D.L., Breuner, C.W., Jacobs, J.D., Lynn, S., Ramenofsky, M. and Richardson, R.D.** (1998) Ecological bases of hormone-behavior interactions: the "emergency life history stage." *Am. Zool.* **38**, 191-206.
- Yoccoz, N.G., Erikstad, K.E., Bustnes, J.O., Hanssen, S.A. and Tveraa, T.** (2002) Costs of reproduction in common eiders (*Somateria mollissima*): an assessment of relationships

between reproduction based on observational and experimental studies. *J. Appl. Stat.*
29 (1-4), 57-64.

Table 1. Profiles for both experimental groups of captive female eiders (corticosterone and control group) which were sampled during their early phase of incubation. ‘Time of sampling’ indicates incubation stage. Values are means \pm SE. Lower case a and b indicate a significant difference between groups (T-tests).

Before implantation	Group 1: Corticosterone females (N=11)	Group 2: Control females (N=11)
Initial clutch size (eggs)	3.82 \pm 0.12 ^a	3.54 \pm 0.16 ^a
Tarsus length (cm)	6.15 \pm 0.05 ^a	6.21 \pm 0.04 ^a
Wing length (cm)	29.14 \pm 0.15 ^a	29.45 \pm 0.17 ^a
Time of sampling (days)	10.27 \pm 0.76 ^a	11.00 \pm 1.00 ^a
Body mass at sampling (g)	1687 \pm 39 ^a	1753 \pm 34 ^a
Immunoglobulin index (absorbance units)	1.04 \pm 0.06 ^a	0.94 \pm 0.07 ^a
Corticosterone (ng.ml ⁻¹)	14.34 \pm 2.17 ^a	14.11 \pm 1.63 ^a
After implantation	Group 1: Corticosterone females (N=11)	Group 2: Control females (N=11)
Time of sampling (days)	14.27 \pm 0.76 ^a	15.00 \pm 1.00 ^a
Body mass at sampling (g)	1430 \pm 33 ^a	1575 \pm 32 ^b
Body mass loss per day (g)	55.54 \pm 2.23 ^a	40.75 \pm 2.65 ^b
Immunoglobulin index (absorbance units)	0.57 \pm 0.05 ^a	0.70 \pm 0.05 ^a
T-cell-mediated immune response (mm)	0.72 \pm 0.14 ^a	0.97 \pm 0.18 ^a
Corticosterone (ng.ml ⁻¹)	109.90 \pm 8.16 ^a	14.70 \pm 1.85 ^b

Table 2. Profiles for the three experimental groups of captive female eiders (corticosterone, control, and ‘late fasters’), which were sampled near the end of their incubation. ‘Time of sampling’ indicates incubation stage. Values are means \pm SE. Lower case a, b and c indicate a significant difference between groups (one-way ANOVA).

	Group 1: Corticosterone females (N=7)	Group 2: Control females (N=7)	Group 3: Late fasting females (N=7)
Before implantation			
Initial clutch size (eggs)	3.71 \pm 0.18 ^a	3.71 \pm 0.18 ^a	3.43 \pm 0.53 ^a
Tarsus length (cm)	6.16 \pm 0.05 ^a	6.07 \pm 0.04 ^a	6.01 \pm 0.06 ^a
Wing length (cm)	29.19 \pm 0.24 ^a	29.14 \pm 0.20 ^a	29.29 \pm 0.18 ^a
Time of sampling (days)	20.29 \pm 0.29 ^a	19.86 \pm 0.40 ^a	24.86 \pm 0.40 ^b
Body mass at sampling (g)	1549 \pm 27 ^a	1571 \pm 37 ^a	1441 \pm 36 ^b
Immunoglobulin index (absorbance units)	0.70 \pm 0.06 ^a	0.70 \pm 0.04 ^a	0.82 \pm 0.07 ^a
Corticosterone (ng.ml⁻¹)	18.36 \pm 3.09 ^a	18.35 \pm 4.45 ^a	13.26 \pm 1.99 ^a
	Group 1: Corticosterone females (N=7)	Group 2: Control females (N=7)	Group 3: Late fasting females (N=7)
After implantation			
Time of sampling (days)	24.29 \pm 0.29 ^a	23.86 \pm 0.40 ^a	29.86 \pm 0.40 ^b
Body mass at sampling (g)	1315 \pm 23 ^{a,b}	1394 \pm 36 ^a	1285 \pm 27 ^b
Body mass loss per day (g)	58.50 \pm 3.98 ^a	44.29 \pm 2.38 ^b	31.09 \pm 2.09 ^c
Immunoglobulin index (absorbance units)	0.47 \pm 0.03 ^a	0.52 \pm 0.04 ^a	0.57 \pm 0.05 ^a
T-cell-mediated immune response (mm)	1.00 \pm 0.13 ^a	1.27 \pm 0.18 ^a	0.47 \pm 0.08 ^b
Corticosterone (ng.ml⁻¹)	111.10 \pm 18.06 ^a	22.33 \pm 5.29 ^b	16.72 \pm 2.21 ^b

Table 3. Results for linear regressions between immune parameters, body mass, and corticosterone levels in captive female eiders, sampled during the first part of incubation.

Before implantation		Immunoglobulin index (absorbance units)	Corticosterone (ng.ml ⁻¹)
Body mass (g)	-	F _{1,21} =1.19, P=0.29	F _{1,21} =0.07, P=0.80
Immunoglobulin index (absorbance units)	-	-	F _{1,21} =3.99, P=0.06
Corticosterone (ng.ml ⁻¹)	-	-	-

After implantation		Immunoglobulin index (absorbance units)	T-cell-mediated immune response (mm)	Corticosterone (ng.ml ⁻¹)
Body mass (g)	-	F _{1,21} =2.37, P=0.14	F _{1,21} =5.86, P=0.02	F _{1,21} =6.80, P=0.02
Immunoglobulin index (absorbance units)	-	-	F _{1,21} =3.58, P=0.07	F _{1,21} =2.68, P=0.12
T-cell-mediated immune response (mm)	-	-	-	F _{1,21} =1.13, P=0.30
Corticosterone (ng.ml ⁻¹)	-	-	-	-

Table 4. Results for linear regressions between immune parameters, body mass, and corticosterone levels in captive female eiders, sampled near the end of incubation.

Before implantation		Immunoglobulin index (absorbance units)	Corticosterone (ng.ml ⁻¹)
Body mass (g)	-	F _{1,20} =3.00, P=0.10	F _{1,20} =0.26, P=0.61
Immunoglobulin index (absorbance units)	-	-	F _{1,20} =7.70, P=0.01
Corticosterone (ng.ml ⁻¹)	-	-	-

After implantation	Body mass (g)	Immunoglobulin index (absorbance units)	T-cell-mediated immune response (mm)	Corticosterone (ng.ml ⁻¹)
Body mass (g)	-	F _{1,20} =4.16, P=0.05	F _{1,20} =0.17, P=0.68	F _{1,20} =0.43, P=0.52
Immunoglobulin index (absorbance units)	-	-	F _{1,20} =1.16, P=0.29	F _{1,20} =2.76, P=0.11
T-cell-mediated immune response (mm)	-	-	-	F _{1,20} =1.04, P=0.32
Corticosterone (ng.ml ⁻¹)	-	-	-	-

FIGURE LEGENDS

Fig 1. Effects of treatment on wing-web swelling in female eiders: corticosterone implanted (hatched bars), sham implanted (plain bars), and 'late fasting' females (cross hatched bars). Values are means \pm SE. Lower case a and b indicate a significant difference between groups (LSD post-hoc tests).

Fig 2. Effects of treatment on immunoglobulin index before (hatched bars) and after (plain bars) manipulation in female eiders. Values are means \pm SE. Lower case a, b, c and d indicate a significant difference between groups (LSD post-hoc tests).

Fig 3. Relationship between corticosterone levels and immunoglobulin index before implantation in female eiders sampled near the end of incubation.

FIGURE 1.

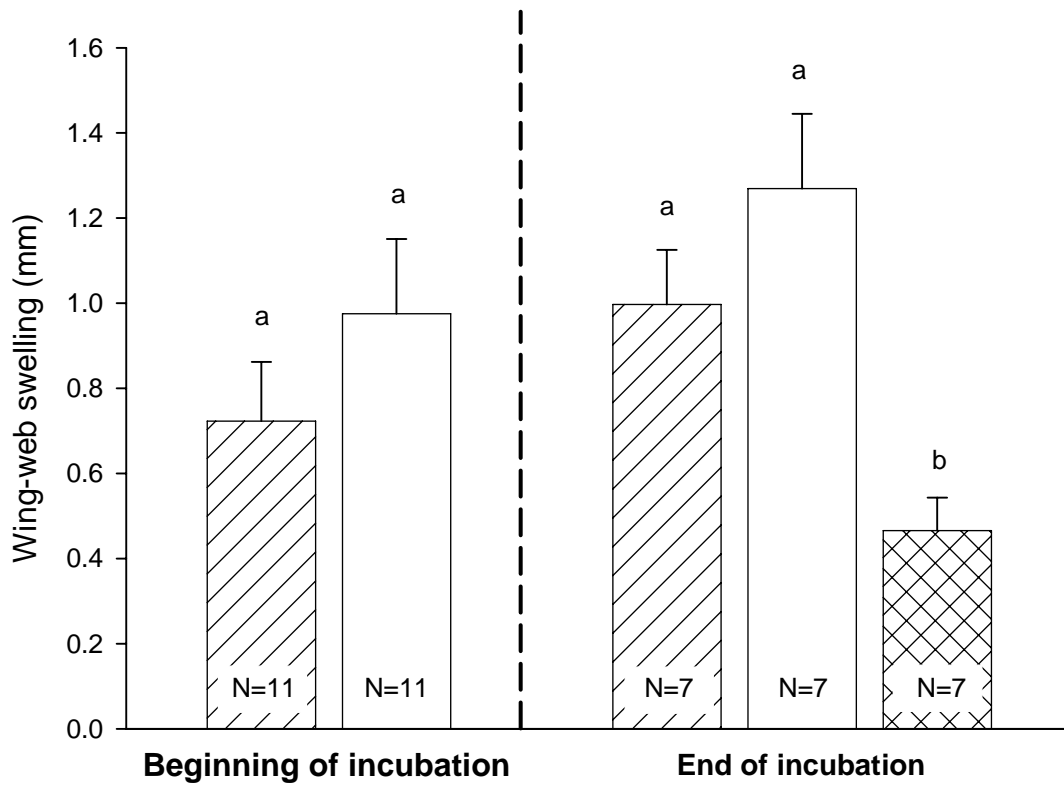


FIGURE 2.

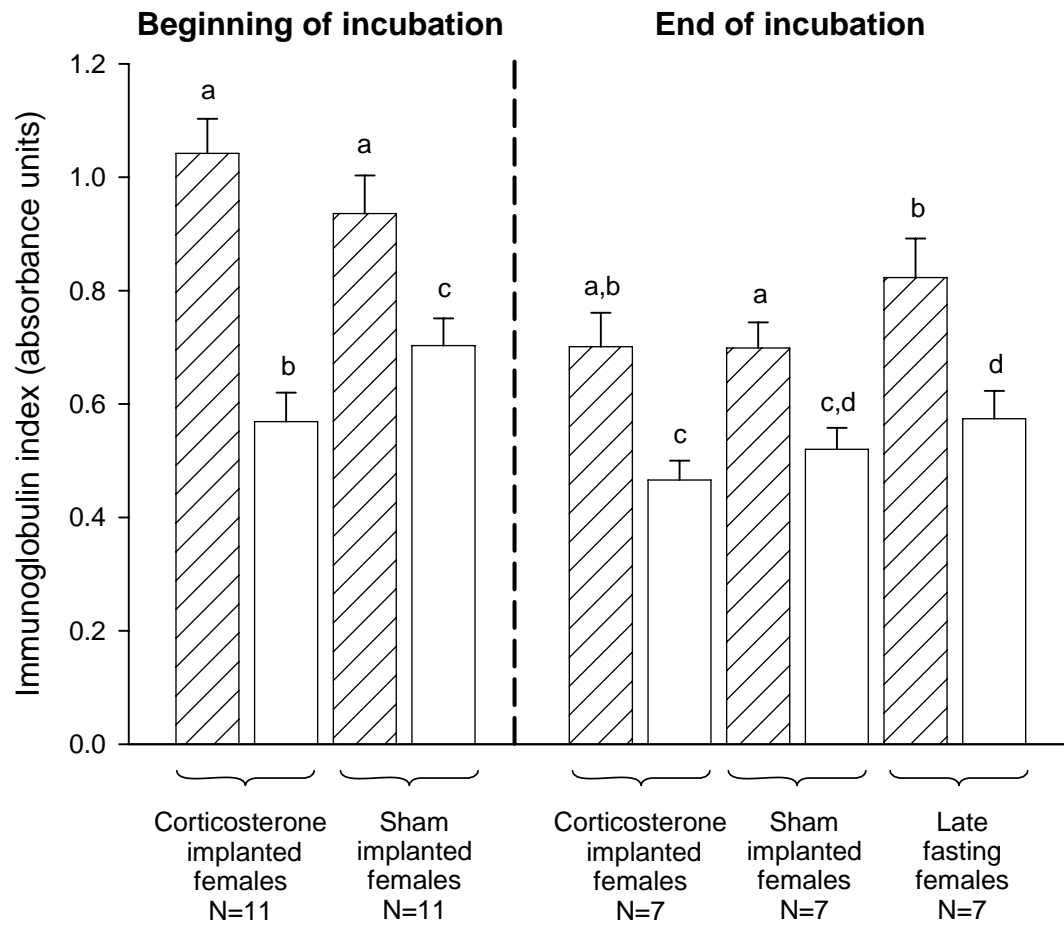
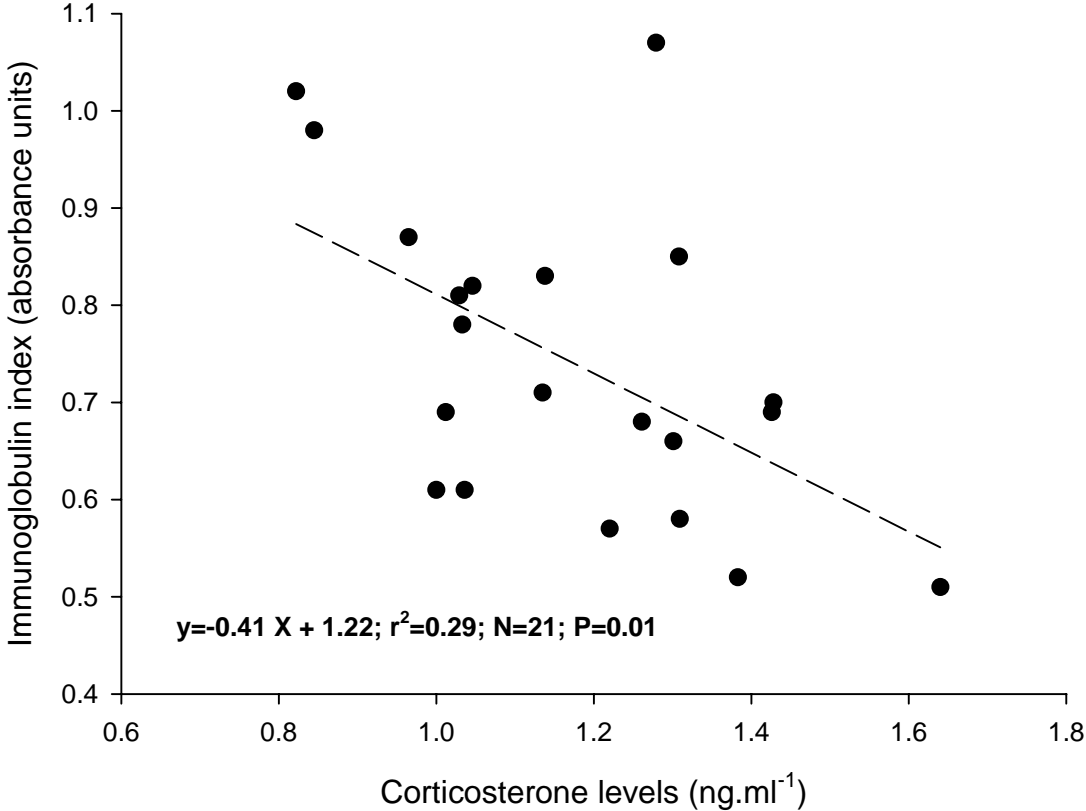
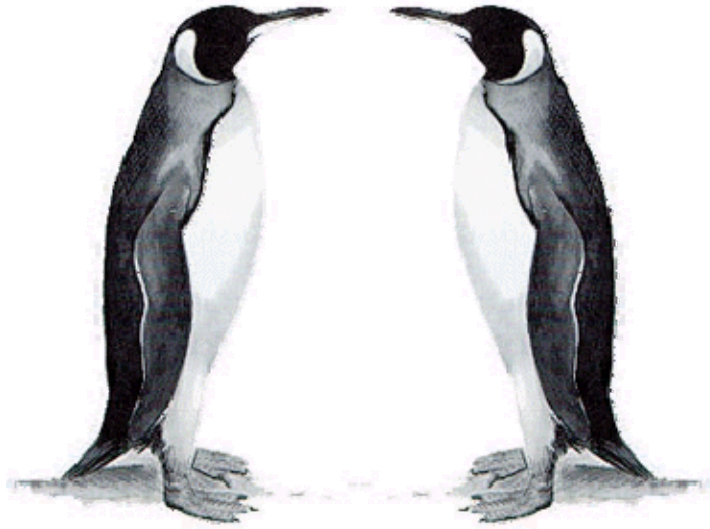


FIGURE 3.



ARTICLE VI



Bourgeon, S., Viera, V.M., Raclot, T., Groscolas, R.

Hormones and humoral immunity in king penguins during moulting and
breeding fasts.

Soumis

**HORMONES AND HUMORAL IMMUNITY IN KING PENGUINS
DURING MOULTING AND BREEDING FASTS**

Running headline: Hormones and immunity in fasting king penguins

**SOPHIE BOURGEON¹, VANESSA M. VIERA^{1,2}, THIERRY RACLOT¹ and RENE
GROSCOLAS¹**

¹ Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Département Ecologie, Physiologie et Ethologie,
UMR 7178 CNRS-ULP, 23 rue Becquerel,
F-67087 Strasbourg Cedex 02, France

² Département de Biologie, Pavillon Alexandre-Vachon, Université Laval, Sainte-Foy,
Québec, Canada, G1K 7P4

Corresponding author: Sophie Bourgeon

Phone: (33) 3.88.10.69.15, Fax: (33) 3.88.10.69.06

E-mail: sophie.bourgeon@c-strasbourg.fr

ABSTRACT

Reproduction and moult are amongst the most costly seasonal events encountered by birds and it has been suggested that a trade-off between them and immune function exists. The underlying physiological mechanisms of such a potential trade-off are still unclear, but could be mediated by changes in hormone concentrations and/or fuel utilization. In the present study, our primary aim was to assess variations in immunoglobulin levels (humoral immune function) of free-living king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) during their moult and breeding fasts in relation to the associated endocrine and metabolic states. A second objective was to determine the effect of critical energy depletion on immune function in fasting captive penguins. Throughout moult, there was a progressive increase in plasma immunoglobulins (45 %), accompanied by a 120 % increase in plasma triiodothyronine and the maintenance of high thyroxin levels. We suggest that increased immune function during moult is a mechanism to compensate for the alteration of skin, which constitutes the first barrier against pathogens. Our results also suggest that thyroid hormones have an immunostimulating effect. Breeding fast was characterized by immunoglobulin levels 30 % lower in courting than incubating males, which coincided with a peak in plasma testosterone during courting. This result supports the view that testosterone depresses immune function in penguins. Finally, intense fat and protein depletion under controlled conditions resulted in a 40 % decrease of immunoglobulin levels, while plasma concentrations of corticosterone were high. Hence, this supports the view that sustained high corticosteronemia could be immunosuppressive. We conclude that hormones might mediate trade-offs between the immune system and life-history events in king penguins.

Key-words: Immune function; Thyroid hormones; Testosterone; Corticosterone; Penguins

INTRODUCTION

The most dramatic seasonal events that birds encounter during their life are reproduction, moult and migration. Moult and breeding are both energetically costly events and it is therefore not surprising that moult-breeding overlaps are avoided in many bird species (Moreno et al. 2001). In species where an overlap does occur, individuals may be forced to decrease investments in some physiological processes to enhance others (Ricklefs and Wikelski 2002), especially when food resources are scarce. Many ecological immunologists have hypothesized that a trade-off exists between immune function on the one hand and energy, nutrients and other important resources on the other (Martin et al. 2001). For example, several bird studies have shown that some components of the immune system are adversely affected by an increased reproductive effort (Deerenberg et al. 1997; Moreno et al. 1999). By contrast, while moult is also energetically costly, it might still be associated with a greater immune response (Moreno et al. 2001; Nava et al. 2001; Sanz et al. 2004). However, a trade-off between immunity and reproduction or moult is difficult to demonstrate in species with a moult-breeding overlap (Moreno et al. 2001).

King penguins (*Aptenodytes patagonicus*) are a useful model to study such a trade-off because their moult occurs just before a new breeding attempt (Stonehouse 1960; Gauthier-Clerc et al. 2002). Moreover, king penguins feed exclusively at sea and have to stay on land for prolonged fasting periods not only during reproduction (Stonehouse 1960; Groscolas and Robin 2001), but also during moult (Cherel et al. 1994a) when their thermal insulation is compromised (Groscolas and Cherel 1992). Despite the fact that most penguins are accustomed to long fasts, the moult fast is potentially a very stressful event, pushing them to a critical energetic condition (Cherel et al. 1994a; Gauthier-Clerc et al. 2002; Green et al. 2004). It would seem intuitive that metabolic requirements for fasting and moulting are highly

conflicting (Cherel et al. 1988a). Prolonged fasting associated with breeding is characterized by protein sparing and a reduction in energy expenditure (Robin et al. 1998). Moulting, on the other hand, is associated with an intense catabolism of body protein to provide amino acids for new feather growth and an increase in energy expenditure (Groscolas and Cherel 1992; Cherel et al. 1994a). Finally, since king penguins moult and breed ashore, they are easily approachable to assess the effects of both moulting and breeding fasts on the immune function of free-living individuals.

The physiological processes underlying the trade-offs between moulting, breeding and immunity are still unclear, but they could be mediated by changes in the concentration of circulating hormones (Zuk 1996; Ricklefs and Wikelski 2002). In breeding male king penguins, blood testosterone levels are increased (Cherel et al. 1994b). While a large body of work supports the idea that testosterone suppresses the immune system (Folstad and Karter 1992), evidence for an obligate immunosuppressive effect of testosterone remains equivocal (Hasselquist et al. 1999). In moulting penguins, the level of circulating thyroxine (T_4) increases during feather synthesis, while the level of triiodothyronine (T_3) is high when birds lose their old feathers and thermogenesis is increased (Groscolas 1978; Cherel et al. 1988a). Thyroid hormones may also affect immune function (Williamson et al. 1990). For example, a positive correlation between thyroid hormone level, growth rate, and immune function was reported in chickens (Marsh et al. 1992). Finally, fasting in king penguins is characterized by a long period of protein sparing and preferential mobilization of fat stores (phase II), followed by a period of increased net protein catabolism, during which plasma corticosterone rises (phase III) (Robin et al. 1998). Corticosterone appears to regulate the large increase in body protein breakdown in king penguins (Cherel et al. 1988b). However, sustained high corticosterone levels are known to be immunosuppressive (Sapolsky et al. 2000).

The main objective of our study was to assess variations in humoral immune function in king penguins during their moulting and breeding fasts in relation to their endocrine and metabolic states. We therefore measured plasma immunoglobulins and also metabolic and endocrine parameters in birds at various stages of their moult and during reproduction. A second objective was to determine the effect of critical fat store depletion on immune function. To this end, we maintained breeding birds in captivity until they entered phase III of their fast.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The study was conducted in the breeding colony of La Baie du Marin, Possession Island, Crozet Archipelago (46°26' S, 51°52' E, South Indian Ocean) between December 2004 and January 2005. This colony, close to the Alfred Faure Station, consists of about 20 000 pairs of king penguins. Authorization to enter the colony was obtained from Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF) and all experimental procedures were approved by the Ethics Committee of the French Polar Institute (IPEV).

In the king penguin, breeding is preceded by a pre-nuptial moult which lasts for about four weeks, including three weeks of fasting ashore (Cherel et al. 1988b). Moulting takes place when birds return from a fattening up foraging trip at sea and after the chick from the previous breeding season has fledged (at the approximate age of 11 months). At the Crozet Archipelago, moulting birds can be observed in the colony from October to January. Moult is followed by a feeding trip to sea of approximately two weeks, during which birds fatten up, before they engage in another reproductive cycle. Breeding is not synchronous within the

colony, with egg laying occurring over a period of about four months during late spring and early summer (from November to February; Weimerskirch et al. 1992). Egg incubation lasts for 53 days (Stonehouse 1960), after which chicks hatch between early January and early April. During our study period (December-January) it was therefore possible to find birds at various moulting and breeding stages. Given the short time-window for blood sampling, it is unlikely that any difference in the immune status between moulting and breeding birds resulted from seasonal effects. Sample sizes for the various fasting stages are indicated in Table 1.

Moulting fast

Moulting fast was studied in birds of unknown sex. Previously banded pre-moulting penguins were checked regularly, and blood was sampled when they fed their chicks for the last time, i.e. 2-3 weeks before the onset of moult (Barrat 1976). These birds had spent less than 1 day ashore and were therefore considered to be in a post-absorptive state (i.e. not fasting). During moult, blood was sampled from free-living birds in the colony, chosen at random. We collected blood during the following three stages:

1. Beginning of the moult fast: birds still had their old plumage but new feather follicles at the basis of old feathers indicated that the synthesis of new feathers had begun (Groscolas 1978).
2. Middle of the moult fast: feather synthesis continued and new feathers emerged from under the skin (about 4-8 mm in length), while shedding of the old plumage had begun.
3. End of the moult fast: new feathers were fully grown, the old plumage was totally shed and birds were ready for their foraging trip at sea.

Fasting duration at the various phases of their moult fast was estimated from plumage condition, knowing the time-course of feather replacement (Groscolas and Cherel 1992).

Breeding fast

We studied the longest fasting period during breeding in king penguins (about 1 month), which is undertaken by the male from the point of arrival ashore for pairing, until the end of the first incubation shift. After arriving ashore, birds court, find a partner, settle on a territory and copulate. A few days after copulation, and on average 2 weeks after arrival, the female lays the single egg and leaves to feed at sea (Barrat 1976). The male takes over the first incubation shift, which lasts for about 2 weeks, before it is relieved by its partner. We sampled blood from males during three different stages of their breeding fast:

1. Beginning of the fast: males were sampled at random, when they courted with a partner, and from within a zone of the colony occupied by newly arrived birds. Birds were sexed visually based on size (males are larger and fatter than females).
2. Middle of the fast: banded males were checked daily and blood was sampled at the onset of their first incubation shift, within one day after egg laying and departure of the female.
3. End of the fast: banded males were checked daily and blood was taken within the first hour of their relief by the partner. The duration of their first incubation shift averaged 15.4 ± 1.2 days.

Captive fast

Captive fast was studied in males captured shortly after arriving ashore for breeding, and thus metabolically prepared for a long-term fast. King penguins can be sexed based on size and song, and we therefore chose eight males at random from a group of penguins resting on the beach. They were housed in pairs in wooden pens of 3 x 4 m, within the vicinity of the colony and were kept under natural climatic conditions. Birds were left undisturbed except for weighing, which occurred every 4 days. Blood was sampled at three stages: 1) at the beginning of the fast, 2) at about halfway through the fast, and 3) at the end of the fast, when

birds had been in captivity for about one month and when they entered phase III of their fast. In king penguins, this stage is associated with an increase in daily body mass loss and a body mass average of about 9.3 kg (Cherel et al. 1988b). Both criteria were used to determine the time of entrance into phase III, which, depending on the individual, occurred between 25 and 33 days after capture. Naturally breeding king penguins enter this fasting status at times and this does not endanger their survival (Robin et al. 2001). Captive birds were released on the beach immediately after the last sampling, from where they departed to sea within the following day.

Blood sampling and weighing

Birds were caught and their heads were covered with a hood to minimize stress and agitation. Blood samples (3-5 ml) were obtained from a flipper vein with a heparinized syringe and were kept at +4°C until centrifugation (within 3 hours). After centrifugation at 4500 rpm for 10 min, plasma was kept frozen at -20°C until assayed. It has been shown that the stress associated with capture and handling induces a significant increase in plasma corticosterone levels of king penguins after about 6 min (Ménard 1998). Hence, we timed the duration of blood sampling (from capture to the end of sampling), and samples obtained after more than 5 min of handling were discarded.

After blood sampling, birds were weighed to the nearest 4 g on a platform balance and the length of new feathers was checked in moulting birds.

Analysis

Uric acid. The plasma concentration of uric acid was determined as an index of the nutritional status, using an enzymatic method. In penguins, plasma uric acid, which derives from protein

catabolism, is moderately high in the post-absorptive state, low during phase II of fasting and increased during phase III (Robin et al. 1998).

Hormone assays. Plasma corticosterone, testosterone, thyroxine (T₄), and triiodothyronine (T₃) were measured by radioimmunoassay, using commercial kits from MP Biomedicals (Irvine, CA, USA), after adaptation and validation. Plasma corticosterone was used as an index of stress. Plasma T₃ and T₄ were considered as indicators of the level of energy metabolism and of moulting status, respectively. T₃ is known to increase energy expenditure (McNabb 1995; Gabarrou et al. 1997), while an increase in plasma T₄ is observed during feather synthesis in penguins (Groscolas 1978; Cherel et al. 1988b). Finally, plasma testosterone reflects gonadal activity in male birds (Cockrem and Rounce 1995).

Immunoglobulins. Martinez et al. (2003) established a method for assessing the amount of serum immunoglobulins in avian blood using a sensitive ELISA method. We adapted this method for king penguins by determining the appropriate serum dilution (1/32000). Immunoglobulin levels were expressed in units of absorbance.

Statistical analyses. Statistical analyses were conducted using SPSS 12.0.1 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Corticosterone and T₃ levels were not normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test, P<0.05) and were therefore log transformed to meet parametric assumptions. We used one-way ANOVA to examine the variations of hormones and uric acid in relation to the fasting stage. A general linear model (GLM) was used to investigate which covariates (corticosterone, T₃, T₄, and uric acid levels) could predict the variations in immunoglobulin levels (the dependent variable). When normality was not satisfied, we used non-parametric tests (Kruskall-Wallis). Spearman rank correlations were performed to

evaluate the relationship between two parameters. Finally, we ran a general linear mixed model (GLMM), which takes into account the effects of individuals, with immunoglobulin levels used as dependent variable, and testosterone, corticosterone, T₃ and uric acid levels used as fixed effects. Values are presented as means ± standard error (SE).

RESULTS

Total fasting duration was about three weeks in moulting penguins, and about one month in breeding and captive birds (Table 1). Body mass decreased significantly during all types of fast, resulting in a mass loss of 41%, 23% and 28 % in moulting, breeding and captive birds, respectively (Table 1).

Moulting fast

The moulting fast was characterized by a progressive increase in immunoglobulin levels, which were significantly elevated by 44 % at the end of the fast (one-way ANOVA: $F_{3,57}=22.9$, $P<0.0001$; Figure 1A). Plasma corticosterone levels differed significantly according to moult stage (one-way ANOVA: $F_{3,57}=3.6$, $P=0.02$; Figure 1B), being unchanged from the pre-moult stage to the middle of moult and decreasing by 25 % at the end of moult. T₃ plasma levels increased progressively throughout moult, being significantly elevated by 119 % at the end of the moult (one-way ANOVA: $F_{3,57}=10.2$, $P<0.0001$; Figure 1C). T₄ plasma levels increased significantly by about 125 % between pre-moult and the beginning of the moult. They remained elevated to about halfway through the moult, before finally declining at the end (one-way ANOVA: $F_{3,57}=25.6$, $P<0.0001$; Figure 1D). Plasma testosterone was almost undetectable during moult, except at its end (Kruskal-Wallis test: $H=15.4$, $N=57$, $P=0.001$; Figure 1E). Uric acid levels were high at the pre-moult stage,

intermediate at the beginning and middle of the moult, and low at moult completion (one-way ANOVA: $F_{3,57}=28.6$, $P<0.0001$; Figure 1F).

Despite the fact that there was a significant correlation between immunoglobulin and testosterone levels (Spearman rank correlation: $r_s=0.38$, $N=58$, $P=0.003$), we did not include testosterone in our GLM because testosterone concentrations were undetectable during most of the moult. Variations in T_3 levels alone explained changes in immunoglobulin levels throughout moult (GLM, $P<0.0001$). There was a significant positive relationship between the plasma levels of immunoglobulin and T_3 (Spearman rank correlation: $r_s=0.56$, $N=58$, $P<0.0001$; Figure 2), where high levels of T_3 were associated with high immunoglobulin levels.

Breeding fast

Courting males at the onset of their breeding fast had immunoglobulin levels 29 % lower than incubating males (middle and end of fast) (one-way ANOVA: $F_{2,59}=24.9$, $P<0.0001$; Figure 3A). In contrast, plasma testosterone levels were much higher during courting than during all the other breeding stages (Kruskal-Wallis test: $H=37.3$, $N=60$, $P<0.0001$; Figure 3E). Plasma corticosterone levels did not change significantly throughout the breeding fast (one-way ANOVA: $F_{2,59}=1.7$, $P=0.20$; Figure 3B). T_3 levels increased significantly by about 170 % at the end of the breeding fast when compared with the start and middle phase (one-way ANOVA: $F_{2,58}=43.3$, $P<0.0001$; Figure 3C). T_4 levels, by contrast, were significantly depressed by 78 % during the middle phase of the fast, when compared with start and end phase (one-way ANOVA: $F_{2,59}=23.9$, $P<0.0001$; Figure 3D). Uric acid levels decreased progressively and significantly throughout the breeding fast, reaching final levels that were 70 % lower than at breeding start (one-way ANOVA: $F_{2,59}=18.0$, $P<0.0001$; Figure 3F).

Relationships between immunoglobulin levels and corticosterone (Spearman rank correlation: $r_s=0.09$, $N=60$, $P=0.48$), T_3 (Spearman rank correlation: $r_s=0.001$, $N=59$, $P=0.99$) or T_4 levels (Spearman rank correlation: $r_s=-0.23$, $N=60$, $P=0.08$) were not significant. In contrast, we found a significant negative relationship between immunoglobulin and testosterone levels (Spearman rank correlation: $r_s=-0.66$, $N=60$, $P<0.0001$; Figure 4), where high levels of testosterone were associated with low levels of immunoglobulin.

Captive fast

Fasting in captivity was characterized by a progressive decrease in immunoglobulin levels, which were significantly decreased by about 40 % at the end of the fast, when compared with the start (ANOVA for repeated measures: $F_{2,8}=38.6$, $P<0.0001$; Figure 5A). At the end of the fast, plasma corticosterone (ANOVA for repeated measures: $F_{2,8}=9.0$, $P=0.003$; Figure 5B) and uric acid levels (ANOVA for repeated measures: $F_{2,8}=4.3$, $P=0.07$; Figure 5F) were increased when compared with the other fasting stages. Notably, corticosterone levels were 90% and uric acid levels were 170 % higher at fast completion than at the start. At the beginning and mid-point of the captive fast, plasma corticosterone levels were 3-4 fold higher in these captive birds than in freely breeding birds (T-test: $t=5.3$, $N=22$, $P<0.0001$). Although relatively high at the onset of the captive fast, plasma testosterone did not change significantly during the fast (ANOVA for repeated measures: $F_{2,7}=1.2$, $P=0.37$; Figure 5E). Similarly, we did not find significant changes in plasma T_3 (ANOVA for repeated measures: $F_{2,8}=1.5$, $P=0.35$; Figure 5C) and T_4 levels (ANOVA for repeated measures: $F_{1,8}=0.4$, $P=0.55$; Figure 5D) during captive fast.

Our GLMM revealed no significant relationship between immunoglobulin levels and any of the parameters investigated (GLMM, $P>0.05$).

DISCUSSION

In this study, we investigated the potential relationships between humoral immune function and plasma hormone profiles in king penguins confronted with three different fasts (moulting, breeding and captive fasts), each of which being associated with a specific endocrine and metabolic state.

Moulting fast

In fasting king penguins, total energy expenditure is higher during moulting than during breeding (Cherel et al. 1994a), leaving birds without fuel reserves at the end of their moult (Gauthier-Clerc et al. 2002). In addition, body proteins are mobilized massively during moult (Groscolas and Cherel 1992), as indicated by the maintenance of relatively high levels of plasma uric acid in our study. If a trade-off exists between energy and nutrient reserves on the one side and immunity on the other, a depression in immune function would be expected. Such a depression would be in agreement with observations from female pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*), where daily energy expenditure and the T-cell-mediated immune response were shown to be negatively correlated (Moreno et al. 2001). However, in male pied flycatchers elevated energetic costs during moult were accompanied by a greater immune response (Sanz et al. 2004). We found that in king penguins, moult fast was associated with a progressive increase in immunoglobulin levels of up to 40 %. This is in accordance with previous observations from juvenile and adult house sparrows (*Passer domesticus*), where moult was found to induce an increase in basophil and monocyte blood cells (Nava et al. 2001). Similarly, moulting male pied flycatchers showed an increased T-cell-mediated immune response (Moreno et al. 2001). Finally, increases in the size of organs associated with the immune system, such as the thymus gland or the spleen have been observed in some bird species during moult (Moreno et al. 2001). This hypertrophy may be the consequence of an

increased need for lymphocyte production associated with an expansion of the circulatory system. It could also be related to an increased need to avoid the infection of wounds, caused by skin ruptures from growing feather follicles (Moreno 2004). In conclusion, despite a high energy expenditure and an increase in protein catabolism during moult in king penguins, their immune function is not compromised.

The increase in immune function during moult could be an adaptive mechanism to compensate for the alteration of the skin, which constitutes the first barrier against pathogens. However, the role of potential immuno-modulators remains unclear. Here we show that the increase in plasma immunoglobulins in penguins is accompanied by a progressive increase in plasma T₃ levels, while plasma T₄ levels remain high for most of the moult fast (Fig. 1). Hence, the increase in humoral immunity in moulting king penguins could be mediated by thyroid hormones. A role for thyroid hormones in the immune function of birds has been suggested previously. In mallard ducks (*Anas platyrhynchos*), depressed thyroid hormones were associated with a suppressed cytotoxic T-cell activity (Fowles et al. 1997), while in chickens an increase in the *in vitro* T-cell proliferative response to mitogenic stimulation was observed (Williamson et al. 1990). In addition, thyroxin has been reported to cause marked enlargements of the thymus gland and an increase in the number of peripheral lymphocytes in rats (Hassman et al. 1985). As previously suggested (Smits et al. 2002), the relationship between thyroid hormones and immune system is far from being understood in birds.

Breeding fast

Several studies on birds have shown that some components of the immune system may be adversely affected by an increased reproductive effort. Although the cost of breeding has not been determined in male king penguins yet, the breeding fast does not seem to severely affect their energy status. The breeding fast in male king penguins is characterized by energy and protein sparing (Cherel et al. 1988b; Groscolas and Robin 2001), as indicated in our study

by the decrease in plasma uric acid (Fig. 3). Plasma immunoglobulins were maintained at relatively high levels during incubation (i.e. from the middle to the end of the fast), albeit at lower levels than at the end of the moult fast. This would indicate that fasting and reproductive effort in breeding male king penguins are not associated with an immunosuppression. Whether the same applies to females remains to be investigated.

The major finding of this study with respect to the breeding fast was the association of elevated plasma testosterone levels with reduced plasma immunoglobulins during courting (Fig. 3). Hence, testosterone might suppress the immune system in king penguins, as was previously suggested for other bird species (Folstad and Karter 1992). Such a suppression was demonstrated in superb fairy-wrens (*Malurus cyaneus*), where testosterone-implanted males were far less likely to mount an antibody response after immunization with sheep red blood cells, than sham-implanted or non-implanted males (Peters 2000). Hillgarth et al. (1996) suggested that a suppression of immune function in courting male birds could, among other things, prevent the production of anti-sperm antibodies.

Captivity fast

Breeding male king penguins usually remain within phase II of fasting, also indicated in our study by the maintenance of low levels of uric acid up to the point of being relieved by the female. Nevertheless, they sometimes enter into phase III, which triggers egg abandonment (Groscolas and Robin 2001). Penning breeding males until entrance into phase III, allowed us to investigate the effect of this severe energy depletion on immune function. In accordance with previous results (Cherel et al. 1988b), entrance into phase III of fasting in our birds was characterized by marked increases in the plasma level of uric acid and corticosterone. While the former indicates enhanced body protein catabolism, the latter is believed to stimulate proteolysis (Cherel et al. 1988b). Plasma concentrations of corticosterone in captive birds at the beginning of their fast was 3-4 fold higher than in free-

ranging birds during their moult and breeding fast. It is very likely that these high corticosterone levels were induced by the stress associated with captivity in our birds. By contrast, the plasma levels of testosterone and thyroid hormones did not change significantly in captive fasting birds. Thus, the 40 % decrease in plasma immunoglobulins observed throughout the captive fast and, most notably at the entrance into phase III, was probably a result of the severe energy depletion and could have been induced by hypercorticosteronemia.

Glucocorticoids, secreted during stressful activities, are an essential component of the endogenous immunoregulatory network, leading to a very close relationship between immunocompetence and the endocrine linkage of stress (Arpanius 1998). It has been suggested that corticosterone has immunosuppressive effects (Råberg et al. 1998; Sapolsky et al. 2000). Martin II et al. (2005) showed that corticosterone implants suppressed the T-cell-mediated immune response in non-breeding New Jersey house sparrows. Also, enhancement of plasma corticosterone during food restriction in chickens has been shown to coincide with a suppressed lymphocyte proliferation, suggesting stress-mediated immuno-modulating effects of food restriction (Hangalpura et al. 2005). Whether corticosterone affects immunity directly in king penguins or through modulation of proteolysis should be the subject of further investigations.

In conclusion, in king penguins moult leads to the activation of the immune system. By contrast, courtship and phase III of captive fasting in male king penguins are associated with an immunosuppression. Given the hormonal and metabolic states that characterize each fast, we suggest that in this species testosterone and corticosterone are immunosuppressive agents, while thyroid hormones are immunostimulating. Hormones might therefore mediate trade-offs between the immune system and life-history events in king penguins. Whether seasonal variation in immune function has to be taken into account for these trade-offs, and

also the evolutionary significance of these hormone-immunity relationships remain to be clarified.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Institut Polaire français Paul-Emile Victor (IPEV, programme 119 “Econergie”). Logistic support was provided by the Terres Australes et Antarctiques Françaises. S.B. was supported by a fellowship from the French MENRT. V.M.V. was supported by scholarships from the Fondation de l’Université Laval and NSERC. We thank E. Mioskowski for assistance with the analyses of samples.

REFERENCES

- Arpanius, V. 1998. Stress and Immune Defense. – *Adv. Stud. Behav.* 27: 133-153.
- Barrat, A. 1976. Quelques aspects de la biologie et de l'écologie du manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) des îles Crozet. – *Com. Nat. Fr. Rech. Ant.* 40: 9-51.
- Cherel, Y., Charassin, J-B. and Challet, E. 1994a. Energy and protein requirements for molt in the king penguin *Aptenodytes patagonicus*. – *Am. J. Physiol.* 266 (35): R1182-R1188.
- Cherel, Y., Leloup, J. and Le Maho, Y. 1988a. Fasting in king penguins. II. Hormonal and metabolic changes during molt. – *Am. J. Physiol.* 254 (23): R178-R184.
- Cherel, Y., Mauget, R., Lacroix, A. and Gilles, J. 1994b. Seasonal and fasting-related changes in circulating gonadal steroids and prolactin in king penguins, *Aptenodytes patagonicus*. – *Physiol. Zool.* 76: 1154-1173.
- Cherel, Y., Robin, J-P., Walch, O., Karmann, H., Netchitailo, P. and Le Maho, Y. 1988b. Fasting in king penguins. I. Hormonal and metabolic changes during breeding. – *Am. J. Physiol.* 254 (23): R170-R177.
- Cockrem, J.F. and Rounce, J.R. 1995. Non-invasive assessment of the annual gonadal cycle in free-living Kakapo (*Strigops habroptilus*) using fecal steroid measurements. – *Auk* 112 (1): 253-257.
- Deerenberg, C., Arpanius, V., Daan, S. and Bos, N. 1997. Reproductive effort decreases antibody responsiveness. – *Proc. R. Soc. B* 264: 1021-1029.
- Folstad, I. and Karter, A.J. 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. – *Am. Nat.* 139: 603-622.

- Fowles, J.R., Fairbrother, A. and Kervliet, N.I. 1997. Effects of induced hypo- and hyperthyroidism on immune function and plasma biochemistry in mallards (*Anas platyrhynchos*). – *Comp. Biochem. Physiol.* 118C (2): 213-220.
- Gabarrou, J.F., Duchamp, C., Williams, J. and Geraert, P.A. 1997. A role for thyroid hormones in the regulation of diet-induced thermogenesis in birds. – *Brit. J. Nutr.* 78: 963-973.
- Gauthier-Clerc, M., Le Maho, Y., Gendner, J-P. and Handrich, Y. 2002. Moulting fast and time constraint for reproduction in the king penguin. – *Polar Biol.* 25 (4): 288-295.
- Green, J.A., Butler, P.J., Woakes, A.J. and Boyd, I.L. 2004. Energetics of the moult fast in female macaroni penguins *Eudyptes chrysolophus*. – *J. Avian Biol.* 35: 153-161.
- Groscolas, R. 1978. Study of molt fasting followed by an experimental forced fasting in the Emperor Penguin *Aptenodytes forsteri*: relationship between feather growth, body weight, body temperature and plasma fuel levels. – *Comp. Biochem. Physiol.* 61A: 287-295.
- Groscolas, R. and Cherel, Y. 1992. How to molt while fasting in the cold: the metabolic and hormonal adaptations of Emperor and King penguins. – *Ornis Scand.* 23: 328-334.
- Groscolas, R. and Robin, J-P. 2001. Long-term fasting and re-feeding in penguins. – *Comp. Biochem. Physiol.* 128A: 645-655.
- Hasselquist, D., Marsh, J.A., Sherman, P.W. and Wingfield, J.C. 1999. Is avian humoral immunocompetence suppressed by testosterone? – *Behav. Ecol. Sociobiol.* 45: 167-175.
- Hassman, R., Weetman, A.P., Gunn, C., Stringer, B.M.J., Wynford-Thomas, D., Hall, R. and McGregor, A.M. 1985. The effects of hypothyroidism on autoimmune thyroiditis in rat. *Endocrinol.* 116: 1253-1258.

- Hillgarth, N., Ramenofsky, M. and Wingfield, J.C. 1996. Testosterone and sexual selection. – Behav. Ecol. 8: 108-112.
- Marsh, J.A., Johnson, B.E., Lillehij, H.S. and Scanes C.G. 1992. Effect of thyroxine and chicken growth hormone on immune function in autoimmune thyroiditis (obese) strain chickens. – Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 199: 114-122.
- Martin II, L.B., Gilliam, J., Han, P., Lee, K. and Wikelski, M. 2005. Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not in tropical house sparrows, *Passer domesticus*. – Gen. Comp. Endocrinol. 140: 126-135.
- Martin, T.E., Møller, A.P., Merino, S. and Clobert, J. 2001. Does clutch size evolve in response to parasites and immunocompetence? – PNAS 98: 2071-2076.
- Martinez, J., Tomás, G., Merino, S., Arriero, E. and Moreno, J. 2003. Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichickens antibodies. – Funct. Ecol. 17: 700-706.
- McNabb, F.M.A. 1995. Thyroid hormones, their activation, degradation and effects on metabolism. – J. Nutr. 125: S1773-S1776.
- Ménard, J-J. 1998. Conséquences hormonales et métaboliques du stress de contention chez le Manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*). – Veterinary thesis, Toulouse.
- Moreno, J. 2004. Moulting-breeding overlap and fecundity limitation in tropical birds: a link with immunity? – Ardeola 51 (2): 471-476.
- Moreno, J., Sanz, J.J. and Arriero, E. 1999. Reproductive effort and T-lymphocyte cell-mediated immunocompetence in female pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. – Proc. R. Soc. B 266: 1105-1109.

- Moreno, J., Sanz, J.J., Merino, S. and Arriero, E. 2001. Daily energy expenditure and cell-mediated immunity in pied flycatchers while feeding nestlings: interaction with moult. – *Oecologia* 129 (4): 492-497.
- Nava, M.P., Veiga, J.P. and Puerta, M. 2001. White blood cell counts in house sparrows (*Passer domesticus*) before and after moult and after testosterone treatment. – *Can. J. Zool.* 79: 145-148.
- Peters, A. 2000. Testosterone treatment is immunosuppressive in superb fairy-wrens, yet free-living males with high testosterone are more immunocompetent. – *Proc. R. Soc. B* 267: 883-889.
- Råberg, L., Grahn, M., Hasselquist, D. and Svensson, E. 1998. On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. – *Proc. R. Soc. B* 265: 1637-1641.
- Ricklefs, R.E. and Wikelski, M. 2002. The physiology/life-history nexus. – *Trends Ecol. Evol.* 17 (10): 462-468.
- Robin, J-P., Boucontet, L., Chillet, P. and Groscolas, R. 1998. Behavioral changes in fasting emperor penguins: evidence for a “refeeding signal” linked to a metabolic shift. – *Am. J. Physiol.* 274 (3): R746-R753.
- Robin, J-P., Fayolle, C., Decrock, F., Thil, M.A., Côté, S.D., Bernard, S. and Groscolas, R. 2001. Restoration of body mass in King Penguins after egg abandonment at a critical energy depletion stage: early vs late breeders. – *J. Avian Biol.* 32 (4): 303-310.
- Sanz, J.J., Moreno, J., Merino, S. and Tomás, G. 2004. A trade-off between two resource-demanding functions: post-nuptial moult and immunity during reproduction in male pied flycatchers. – *J. Anim. Ecol.* 73: 441-447.
- Sapolsky, R., Romero, L. and Munck, A. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. – *Endocr. Rev.* 21, 55-89.

- Smits, J.E., Fernie, K.J., Bortolotti, G.R. and Marchant, T.A. 2002. Thyroid hormone suppression and cell-mediated immunomodulation in American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to PCBs. – Arch. Environ. Contam. Toxicol. 43: 338-344.
- Stonehouse, B. 1960. The King Penguin *Aptenodytes patagonica* of South Georgia. I. Breeding behaviour and development. – Falk. Isl. Dep. Survey, Scient. Rep. 23: 81.
- Weimerskirch, H., Stahl, J-C. and Jouventin, P. 1992. The breeding biology and population dynamics of king penguins *Aptenodytes patagonica* on the Crozet Islands. – Ibis 137: 107-117.
- Williamson, R.A., Davison, T.F. and Payne, L.N. 1990. Effects of thyroid hormones on humoral and cell-mediated immune responses in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). – Dev. Comp. Immunol. 14: 305-318.
- Zuk, M. 1996. Disease, endocrine-immune interactions and sexual selection. – Ecology 77 (4): 1037-1042.

Table 1. Fast duration and body masses of king penguins during the moulting, breeding, and captive fast. Values are mean \pm SE. Within a fast, body mass values with different superscript letters are significantly different from each other ($P < 0.05$).

	(N)	Fasting duration (days)	Body mass (kg)
<u>A/ Moulting fast</u>			
Pre-moult	(15)	0	11.08 \pm 0.18 ^a
Beginning	(14)	1-2	15.99 \pm 0.39 ^b
Middle	(12)	8-10	13.52 \pm 0.31 ^c
End	(17)	17-22	9.38 \pm 0.27 ^d
<u>B/ Breeding fast</u>			
Beginning	(14)	0-2	12.89 \pm 0.20 ^a
Middle	(32)	12-16	11.49 \pm 0.15 ^b
End	(14)	28-33	9.90 \pm 0.11 ^c
<u>C/ Captive fast</u>			
Beginning	(8)	2-3	13.21 \pm 0.27 ^a
Middle	(8)	15-17	11.09 \pm 0.22 ^b
End	(8)	29-35	9.47 \pm 0.24 ^c

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Concentrations of plasma immunoglobulins, hormones and uric acid at various stages of the moulting fast in free-ranging king penguins. Values are means \pm SE. Different letters indicate significant differences between groups.

Figure 2. Relationship between triiodothyronine and immunoglobulin plasma levels in pre-moulting and moulting king penguins.

Figure 3. Concentrations of plasma immunoglobulins, hormones and uric acid at various stages of the breeding fast in free-ranging male king penguins. Values are means \pm SE. Different letters indicate significant differences between groups.

Figure 4. Relationship between testosterone and immunoglobulin plasma levels in breeding male king penguins.

Figure 5. Concentrations of plasma immunoglobulins, hormones and uric acid at various stages of the captive fast in male king penguins. Values are means \pm SE. Different letters indicate significant differences between groups.

FIGURE 1.

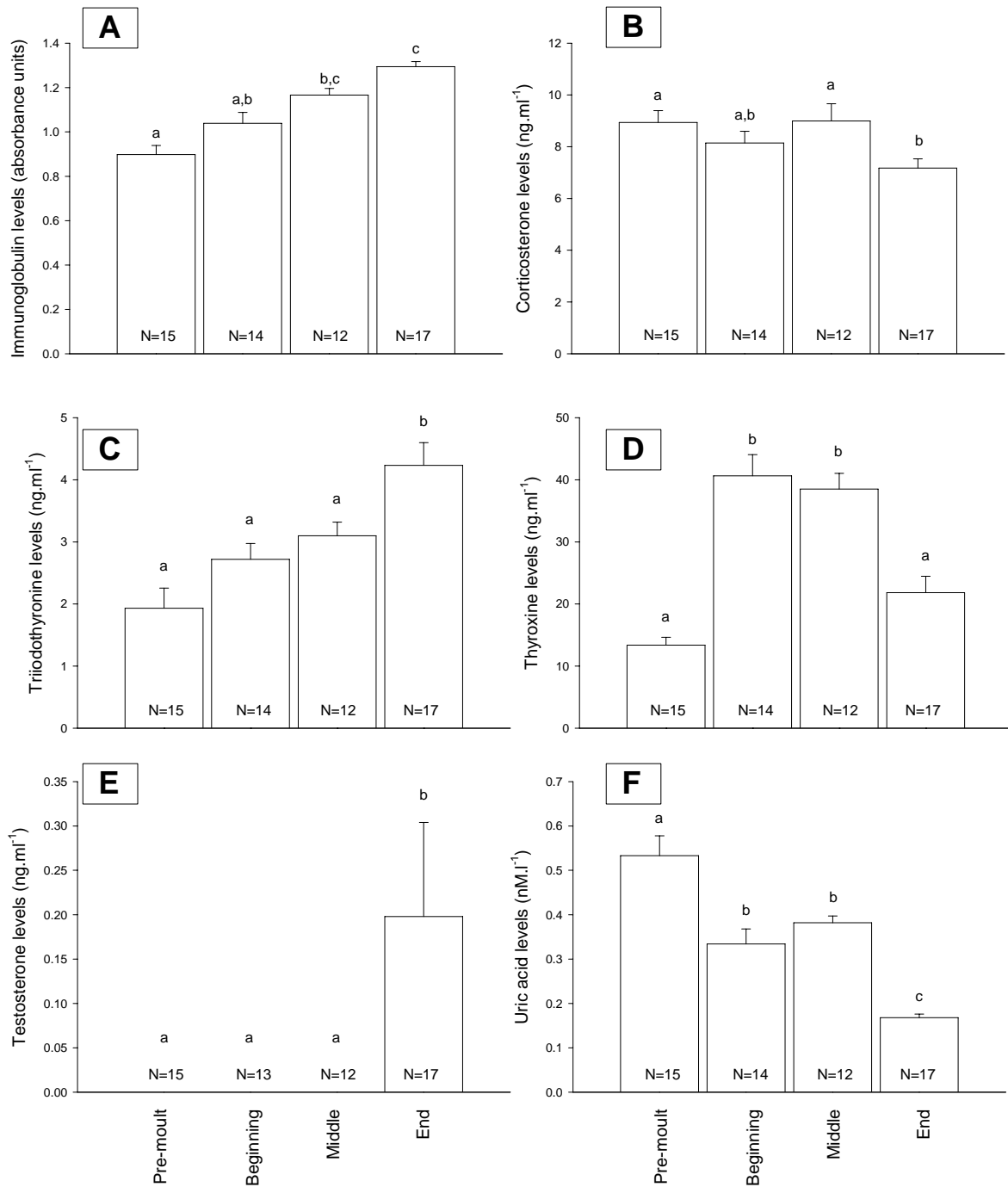


FIGURE 2.

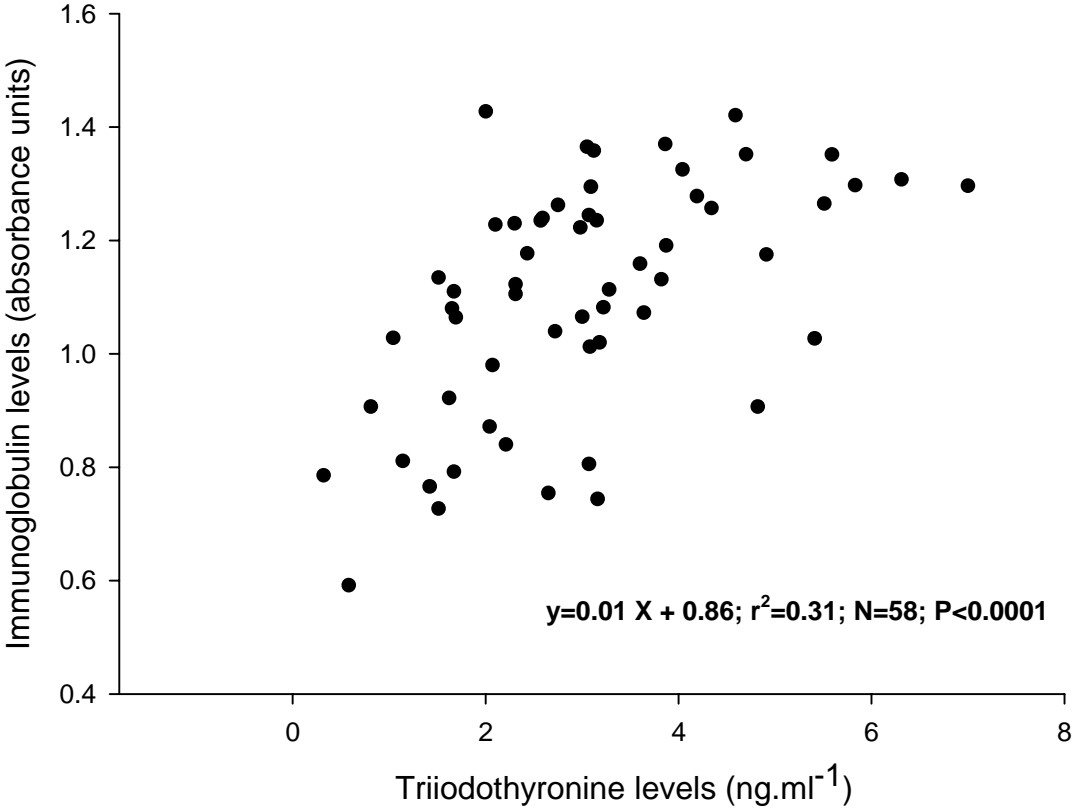


FIGURE 3.

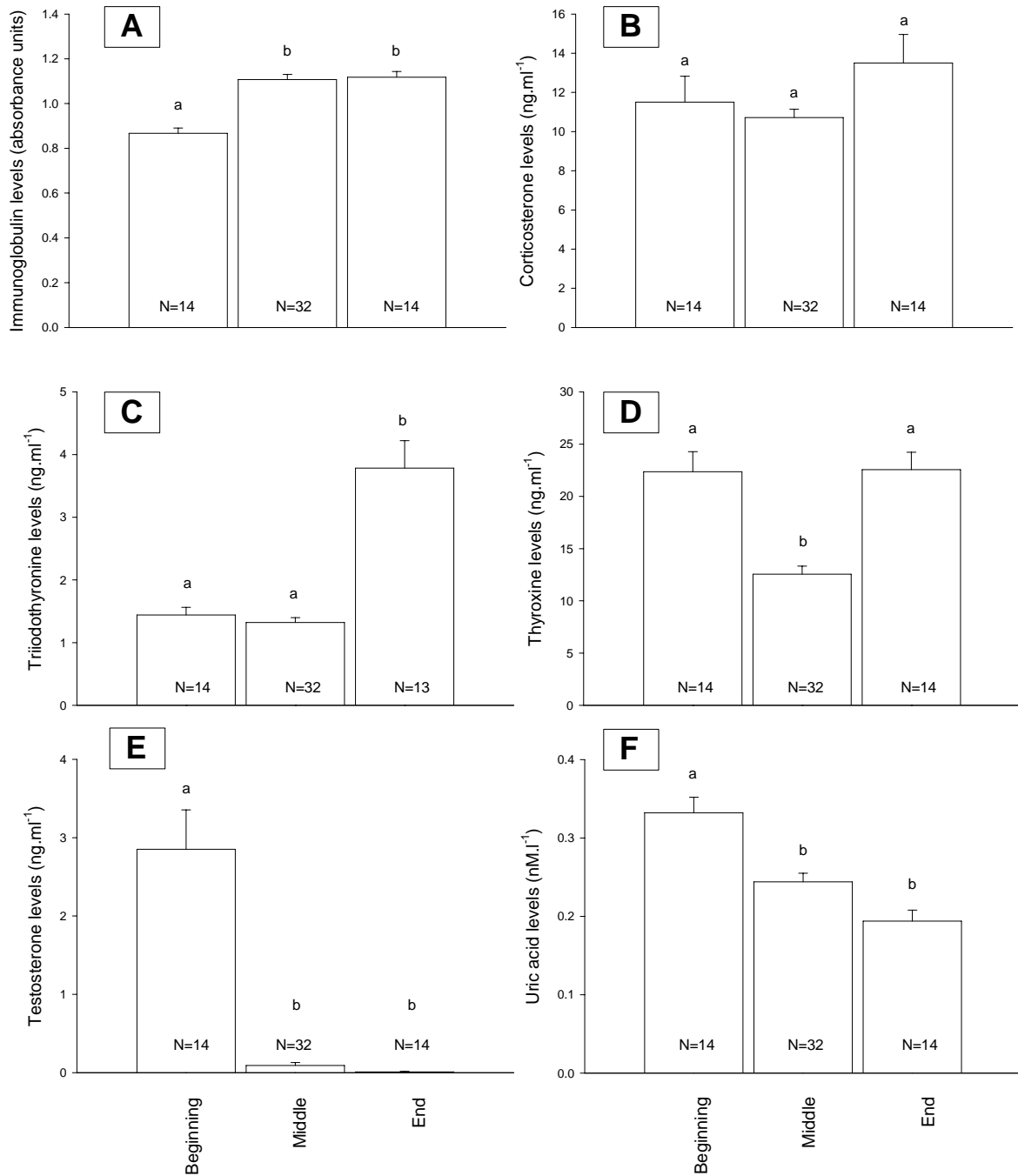


FIGURE 4.

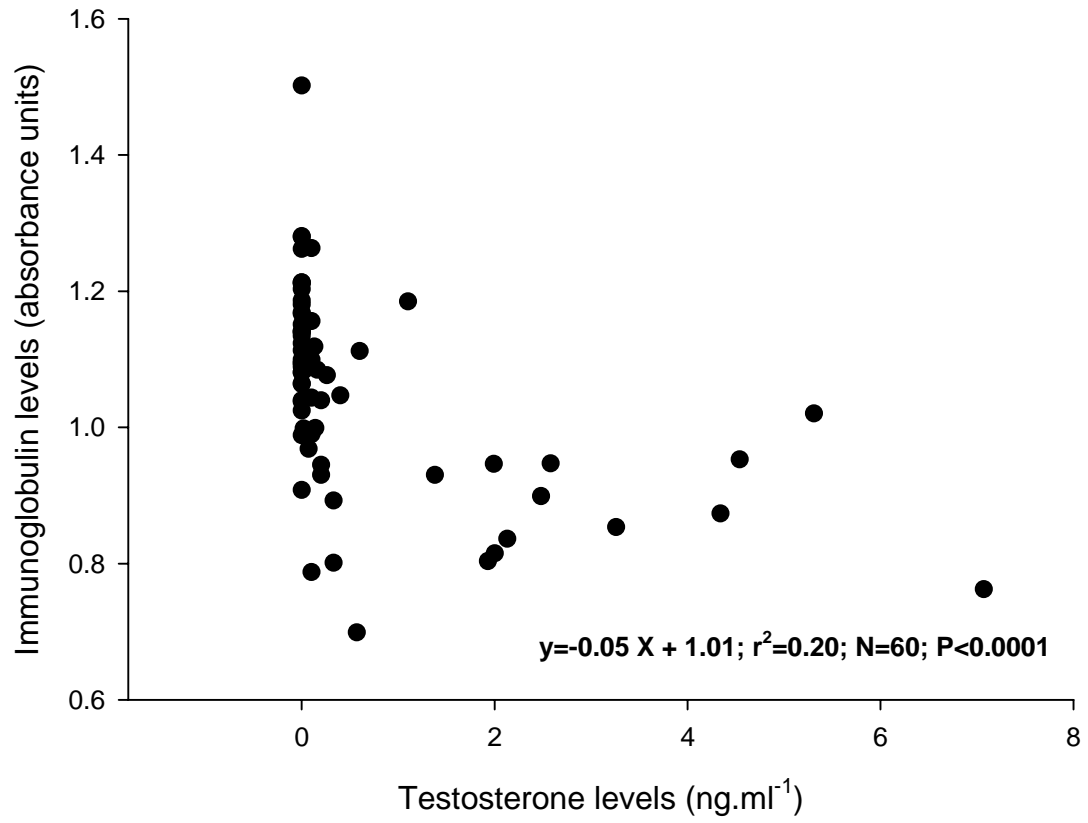
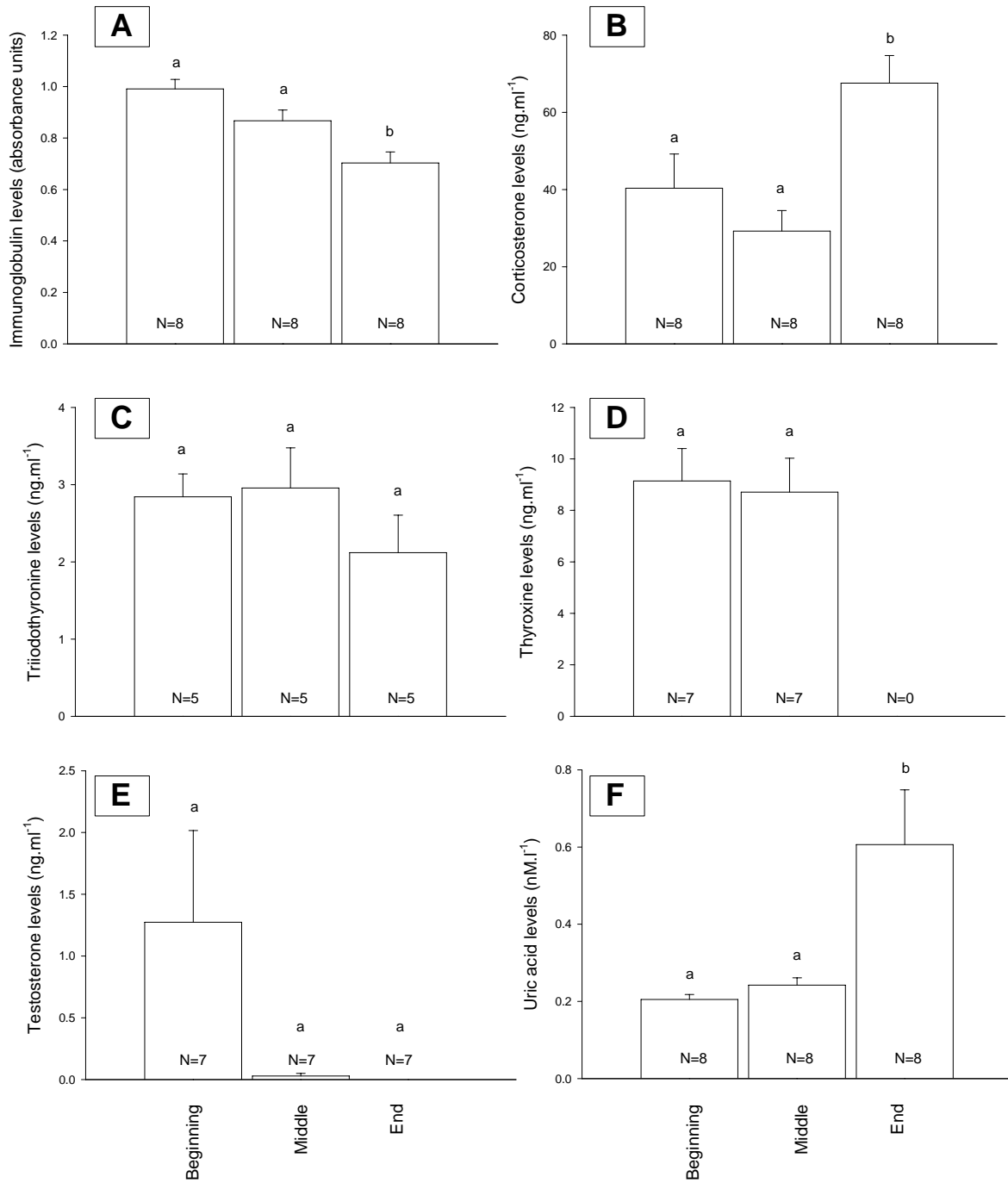
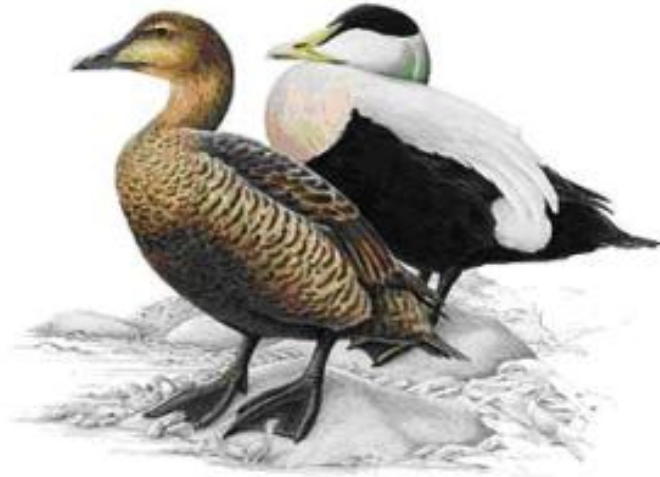


FIGURE 5.



ANNEXE

ARTICLE VII



Bourgeon, S., Criscuolo, F., Bertile, F., Raclot, T., Gabrielsen, G.W., Massemin, S.

2006

Effects of clutch sizes and incubation stage on nest desertion in the female

Common Eider *Somateria mollissima* nesting in the high Arctic.

Polar Biology 29 (5): 358-363

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Effects of clutch sizes and incubation stage on nest desertion in the female Common Eider *Somateria mollissima* nesting in the high Arctic

Sophie Bourgeon, François Criscuolo, Fabrice Bertile, Thierry Raclot, Geir Wing Gabrielsen, Sylvie Massemin

Polar Biology, 2006, Vol. 29, N°5, Pages 358-363

Pages 358 à 363 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : [http://www.springerlink.com/\(5nciw3uin1aeyn55zdczdu45\)/app/home/journal.asp?referrer=parent&backto=linkingpublicationresults,1:100450,1](http://www.springerlink.com/(5nciw3uin1aeyn55zdczdu45)/app/home/journal.asp?referrer=parent&backto=linkingpublicationresults,1:100450,1)

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Résumé

Les ressources étant en quantité limitée, la théorie des traits d'histoire de vie postule que la sélection naturelle favorise les mécanismes physiologiques qui optimisent leur allocation entre différentes activités en compétition. Ainsi, afin de maximiser leur valeur sélective, les espèces longévives doivent faire des compromis entre l'énergie allouée à la survie et à la reproduction. Le système immunitaire a notamment été identifié comme un coût potentiel de la reproduction.

Nous avons examiné les effets de l'effort reproducteur sur les trois composantes du système immunitaire chez la femelle d'eider à duvet (*Somateria mollissima*) au cours de son jeûne d'incubation. Au cours du jeûne d'incubation, nous avons observé une diminution des deux composantes de l'immunité acquise alors que la réponse immunitaire innée n'est pas altérée. Les femelles d'eider semblent donc allouer préférentiellement leurs ressources à l'effort reproducteur au détriment de l'immunité acquise. Par contre, elles semblent préserver l'intégrité de leur immunité innée.

Nous avons aussi déterminé les facteurs ultimes et proximaux sous-tendant le compromis observé entre l'effort reproducteur et l'immunocompétence. La corticostérone est supposée être le principal facteur proximal de l'immunosuppression. Cependant, nous avons montré que la corticostéronémie ne varie pas au cours du jeûne d'incubation, alors que l'expression de protéines de stress (HSP) augmente significativement. L'effet immunosuppresseur des hormones testées (corticostérone et triiodothyronine) semble imputable à leur effet négatif sur la masse corporelle. Ces résultats confortent l'existence d'un lien entre les réserves, notamment lipidiques, et le système immunitaire et sont par ailleurs en accord avec l'hypothèse d'allocation optimale des ressources. Les relations entre la condition corporelle et l'immunocompétence devront donc être étudiées lors du jeûne d'incubation d'oiseaux longévifs. Néanmoins, nos résultats ne permettent pas d'exclure l'hypothèse d'évitement de pathologies auto-immunes.

Mots-clés

Effort reproducteur; Système immunitaire; Immunité acquise; Immunité innée; Compromis; Eiders; Jeûne d'incubation; Réserves lipidiques; Corticostérone; Hormones thyroïdiennes.

Title

Immunocompetence in long-lived birds: study of the cost of reproduction during the incubation fast in female common eider ducks (*Somateria mollissima*).

Abstract

Available resources being limited, life-history theory predicts that natural selection favours the physiological mechanisms that ensure their optimal allocation between competing activities. Accordingly, to maximize their fitness, long-lived species face a trade-off between survival and reproduction. Immunity is hypothesized to share limited resources with other physiological functions and this may partly account for the fitness costs of reproduction.

We examined the effects of reproductive effort on the three components of the immune system in female common eiders (*Somateria mollissima*) during their incubation fast. During incubation fast, we observed that both components of the acquired immunity decrease significantly while innate immunity does not vary. Hence, female eiders seem to reallocate their resources from the acquired immunity to reproductive effort, while the innate immunity does not seem to be affected.

We determined both ultimate and proximate factors underlying the observed trade-off between reproductive effort and immunocompetence. Corticosterone has been suggested the main proximate factor for immunosuppression. However, we showed here that corticosteronemia does not vary during the incubation fast, while stress protein expression (HSP) increases significantly. The immunosuppressive effect of tested hormones (corticosterone and triiodothyronine) seems to be mediated by their negative effect on body mass. These results lend support to the proposed link between the immune system and body fat reserves and are also in agreement with the resource-limitation hypothesis. Further experiments are required to determine the relationship between body condition and immunocompetence during the incubation fast in long-lived birds. Nevertheless, our results do not exclude the autoimmune pathology avoidance hypothesis.

Keywords

Reproductive effort; Immune system; Acquired immunity; Innate immunity; Trade-offs ; Eiders; Incubation fast; Lipid reserves ; Corticosterone ; Thyroid hormones.