

Thèse pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg
Discipline : Science du Vivant

Spécialité : Physiologie et Biologie des Organismes – Populations - Interactions

Présentée et soutenue publiquement le 26 septembre 2011 par

Aude ERBRECH

Maturation morpho-fonctionnelle de l'appareil locomoteur chez le poussin de Manchot Royal



JURY

- M. Jean-Patrice Robin** CR, CNRS, Strasbourg (Directeur de thèse)
- M. Vivian de Buffrénil** MCU, MNHN, Paris (Directeur de thèse)
- M. Jean-Louis Gendrault** PU, Université de Strasbourg (Rapporteur interne)
- Mme. Elisabeth Baéza** IR, INRA, Tours (Rapporteur externe)
- M. Yann Voituron** PU, Université de Lyon 1 (Rapporteur externe)
- M. Yves Cherel** DR, CNRS, Chizé (Examineur)
- M. Jean-Marc Martrette** MCU-PH, Université Nancy (Membre invité)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Baéza, M. Gendrault, M. Voituron et M. Cherel d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci également à Stéphane Blanc de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein du département d'Écologie, Physiologie et Éthologie de l'IPHC.

Merci à Marie Trabalon de m'avoir permis d'effectuer les deux premières années de ma thèse dans son équipe à Nancy.

Je remercie également Jean-Patrice Robin de m'avoir encadrée durant ces 4 années de thèse. Merci pour tes nombreux conseils et ta rigueur scientifique.

Merci à Vivan de Buffrénil pour son aide et son soutien. Merci de m'avoir fait partager tes connaissances sur l'os.

Un grand merci à Jean-Marc Martrette, sans qui cette thèse n'aurait pu être réalisée. Merci de ton soutien et de la confiance que tu m'as accordée en me confiant des enseignements à la faculté d'Odontologie de Nancy.

J'adresse toute ma gratitude à Yvon Le Maho pour son soutien et son aide dans la rédaction de ce manuscrit.

Merci également à Nathalie Guérin pour son travail sur le terrain et sans qui ces données n'auraient pu être récoltées.

Je tiens également à remercier Jacqueline, Martine et Guy pour le fonctionnement administratif du laboratoire. Merci à Brigitte pour son efficacité dans la recherche d'article et à Yannick pour son aide en informatique.

Merci aux étudiants, Émilie, Yan, Alvaro et tout particulièrement Johann qui m'ont aidé dans l'avancement des travaux de cette thèse.

Merci à Pierre et Magalie pour leur aide dans les broyages des muscles.

Merci à Jean-Charles, Joëlle, Christiane, Christine et Stéphane, la petite troupe nancéenne avec qui j'ai passé de bons moments.

Un grand merci à Odile, Hélène, Yan et François pour leur soutien sans faille pendant les moments difficiles.

Merci Fabielle pour tes conseils avisés, ta gentillesse et ta disponibilité.

Un merci tout particulier à Caroline Gilbert. Merci pour ton aide durant les deux années passées à Nancy, ta motivation et ta force de caractère et tout et tout...

Merci aussi à toi Florian, mon voisin de bureau, pour ta gentillesse, ton dynamisme et ton esprit critique.

Merci à tous mes collègues et amies Camille, Magalie, Sophie, Caroline, Carole pour les nombreuses discussions autour d'un café et tous les moments de rire.

Merci à Alexandre qui a toujours été là pour moi. Merci pour tout son amour, son soutien, sa patience durant toutes ces années. Et finalement un grand merci à ma mère, Jean-Paul et mes grands-parents qui m'ont toujours soutenu et sans qui tout ça n'aurait pas été possible.

A ma mère et mes grands parents

Articles et Communications

Articles :

Erbrech A., Robin J-P., Guérin N., Groscolas R., Caroline Gilbert and Martrette J-M. (2011) Differential muscular myosin heavy chain expression of the pectoral and pelvic girdles during early growth in the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) chick. *The Journal of Experimental Biology* **214**, 1829-1835.

Erbrech A., Guérin N., Verrier D., J-M. Martrette, Geiger S., Groscolas R. and Robin J-P. Differential development of the pectoral and pelvic girdles in early growth of king penguin chicks (*Aptenodytes patagonicus*) (en préparation).

Communications :

Erbrech A., Guérin N., Verrier D., Gaudin C., Groscolas R. and Robin J-P. (2008). Communication orale. Muscular developmental asynchrony in the early phase of growth in the king penguin chick. XXth International Congress of Zoology. Paris (France) 26-29 Août.

Erbrech A., Martrette J-M., Guérin N., Verrier D., Trabalon M., Groscolas R. and Robin J-P. (2009). Communication affichée. Myosin heavy chains expression in the pectoral and pelvic muscles during the early phase of growth in the king penguin chick, *Aptenodytes patagonicus*. VIIth Conference of the European Ornithologists' Union. Zurich (Suisse) 21-26 Août.

Erbrech A., Bourgeois J., Guérin N., Martrette J-M., Groscolas R. and Robin J-P. (2011). Communication affichée. Effect of winter food shortage on the muscular development in king penguin chicks, *Aptenodytes patagonicus*. VIIIth Conference of the European Ornithologists' Union. Riga (Lettonie) 27-30 Août.

Sommaire

| | | |
|-----------|--|---------------|
| I | Introduction | - 1 - |
| | I. Contexte général | - 4 - |
| | II. Modes de développement post embryonnaire chez les oiseaux | - 5 - |
| | 1) Ontogénèse chez les oiseaux altriciaux..... | - 7 - |
| | 2) Ontogénèse chez les oiseaux précoces..... | - 8 - |
| | 3) La locomotion | - 8 - |
| | III. Tissus musculaire et osseux : implication dans la fonction de locomotion | - 9 - |
| | 1) Le muscle strié squelettique..... | - 9 - |
| | 1.1 Structure des fibres musculaires..... | - 9 - |
| | 1.2 La contraction musculaire | - 10 - |
| | 1.3 Propriétés contractiles des fibres musculaires..... | - 11 - |
| | 1.3.1 Caractéristiques fonctionnelles | - 11 - |
| | 1.3.2 Caractéristiques métaboliques des fibres | - 13 - |
| | 1.4 La thermogénèse | - 15 - |
| | 1.5 Ontogénèse et développement du tissu musculaire..... | - 16 - |
| | 2) Le tissu osseux | - 17 - |
| | 2.1 Anatomie et organisation des os longs..... | - 17 - |
| | 2.1.1 Le tissu osseux compact..... | - 18 - |
| | 2.1.2 Le tissu osseux spongieux..... | - 18 - |
| | 2.2 Microanatomie des os longs : reflet du mode de vie..... | - 18 - |
| | 2.3 La croissance des os longs appendiculaires | - 20 - |
| | IV. Croissance et contraintes énergétiques | - 21 - |
| | V. Modèle d'étude : le poussin de manchot royal | - 22 - |
| II | Méthodologie | - 27 - |
| | I. Site d'étude | - 28 - |
| | II. Collecte des échantillons | - 28 - |
| | III. Prélèvements | - 29 - |
| | 1) Les muscles striés squelettiques et os longs étudiés | - 29 - |
| | 2) Procédure de prélèvement..... | - 31 - |

| | |
|---|--------------|
| IV. Détermination de la teneur en lipides et de la quantité de protéines | 32 - |
| 1) Préparation des échantillons | 32 - |
| 2) Dosage des lipides par la méthode modifiée de Folch..... | 32 - |
| 3) Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl | 34 - |
| V. Typologie des fibres musculaires : Histoenzymologie | 35 - |
| 1) La myosine – ATPase | 36 - |
| 2) La succino-déshydrogénase | 37 - |
| 3) Analyse des coupes histologiques..... | 38 - |
| VI. Étude de la composition en isoformes de chaînes lourdes de la myosine | 38 - |
| 1) Extraction de la myosine..... | 38 - |
| 2) Préparation des échantillons | 39 - |
| 3) Préparation des gels d'électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) | 39 - |
| 4) Révélation et lecture des isoformes de chaînes lourdes de myosine | 41 - |
| VII. Étude de la microanatomie du tissu osseux | 42 - |
| 1) Préparation des lames minces | 42 - |
| 2) Analyses morphométriques..... | 43 - |
| III Études expérimentales | 45 - |
| Partie I : Développement musculaire chez le poussin de manchot royal de l'éclosion à l'émancipation | 46 - |
| Partie II : Impact de l'hiver sur le développement musculaire chez le poussin de manchot royal | 71 - |
| Partie III : Développement ontogénétique de la microanatomie des os longs chez le poussin de manchot royal | 107 - |
| Partie IV : Discussion générale et perspectives | 127 - |
| 1) Développement de l'appareil locomoteur pendant la croissance du poussin..... | 129 - |
| 1.1 De l'éclosion à l'émancipation..... | 129 - |
| 1.2 De l'émancipation à la fin de la première phase de croissance..... | 134 - |
| 1.3 Impact de l'hiver austral..... | 138 - |
| 2) Effet de l'environnement sur le mode de développement du poussin | 141 - |
| 3) Perspectives..... | 142 - |
| Bibliographie | 146 - |

I Introduction

Introduction

Un des principes fondamentaux de la théorie des traits d'histoire de vie réside en l'existence de compromis. En effet, la quantité d'énergie dont les êtres vivants disposent constitue une ressource limitée devant être partagée entre les différentes fonctions biologiques. Ainsi chaque organisme doit faire face à des compromis entre maintien, croissance, survie, reproduction et la combinaison de traits qui sera la plus adaptée aux contraintes écologiques sera sélectionnée.

La notion de compromis énergétique s'exprime dès la naissance, le développement post natal représentant le premier challenge dans la vie d'un individu. En effet, cette phase constitue une étape critique durant laquelle le jeune animal devra passer le plus rapidement d'un état particulièrement vulnérable à un stade de maturité suffisant pour assurer survie et reproduction. Ainsi différentes fonctions importantes qui ne sont pas encore totalement fonctionnelles à la naissance dans la plupart des cas, comme la thermorégulation ou encore les capacités locomotrices, vont devoir se mettre en place. La croissance post-embryonnaire se traduit alors par un développement structural et pondéral plus ou moins rapide faisant intervenir la maturation de divers tissus comme les os et les muscles.

Chez les oiseaux, le degré de maturité du poussin à l'éclosion est très variable selon les espèces, ce qui influence toute la phase de développement post-embryonnaire en termes de durée et d'investissement parental. Chez les espèces dites précoces (Anatidés ou encore Galliformes), le développement avancé des tissus de la ceinture pelvienne permet aux jeunes oiseaux d'acquérir très rapidement une locomotion terrestre efficace qui leur confère immédiatement une première forme d'indépendance, bien avant de pouvoir voler. A l'opposé, les poussins altriciaux tel que les Passériformes, sont beaucoup moins développés. Totalement dépendant des soins parentaux, les jeunes n'acquerront leur autonomie qu'après le développement des ceintures pectorale et pelvienne.

Afin de répondre aux contraintes nutritionnelles imposées pendant la croissance, l'élevage des jeunes coïncide généralement avec la saison de plus forte disponibilité alimentaire. Cependant, le développement du poussin peut être influencé par des conditions environnementales surtout lorsque la période d'élevage est longue et que la saison estivale ne suffit pas pour atteindre l'émancipation totale. Dans une telle situation, il existe peu d'informations permettant de comprendre les compromis d'allocation d'énergie qui vont s'établir pour assurer la survie et la croissance du jeune lorsque les apports alimentaires sont insuffisants à certaines périodes de son élevage.

Dans ce contexte, le poussin de manchot royal est un modèle animal atypique pour l'étude de ces stratégies. En effet, cet oiseau marin a un cycle de développement exceptionnellement long pour un oiseau (un an) et sa croissance est interrompue par une période de restriction alimentaire sévère pendant les 4 mois de l'hiver austral. Ainsi, la croissance du poussin se divise en 3 phases : une première phase de croissance staturale et pondérale rapide suivie d'une période d'arrêt de croissance liée à la sous-alimentation hivernale puis une seconde phase de croissance pondérale précédant la mue et le départ de la colonie. Le manchot royal étant une espèce semi-altricial, l'oisillon est totalement dépendant des parents à l'éclosion. Mais la mise en place rapide de la thermorégulation et de la locomotion terrestre permet au poussin d'acquérir une première forme d'indépendance avant l'hiver. Le développement des membres postérieurs est indispensable au jeune manchot afin, en autres, d'échapper aux prédateurs et de supporter l'accumulation d'importantes réserves lipidiques qui seront utilisées pendant l'hiver. Cependant, on peut se demander si le développement de la ceinture pectorale sera aussi rapide sachant que l'animal est confronté à une longue période de restriction alimentaire avant de passer quelques mois plus tard d'une locomotion exclusivement terrestre à celle de nageur-plongeur. Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé une étude comparative du développement des ceintures pelvienne (marche) et pectorale (nage) tout au long du cycle de croissance du poussin. Ce travail a été abordé en trois parties.

Dans un premier temps, nous avons étudié la cinétique de développement des deux ceintures au cours des deux premiers mois de vie du poussin. Cette période représente le temps nécessaire à l'émancipation thermique du jeune manchot ainsi qu'à l'acquisition d'une locomotion terrestre efficace. Compte tenu des contraintes locomotrices imposées pour la survie de l'oisillon, cette partie va nous permettre de déterminer si le développement des membres postérieurs sera privilégié au détriment des membres antérieurs. Nous avons ensuite abordé la question de l'évolution de la croissance des ceintures pectorale et pelvienne de l'émancipation du poussin jusqu'à la fin de la première phase de croissance. Ainsi on a cherché à déterminer quelle est la dynamique de développement des muscles sachant que l'accumulation de réserves lipidiques avant l'hiver est un élément primordial pour la survie du jeune manchot. Et finalement nous avons déterminé l'impact de l'hiver sur les ceintures pelvienne et pectorale des poussins.

I. Contexte général

La sélection naturelle est un processus d'optimisation tendant à maximiser la valeur sélective (*fitness*) des organismes en privilégiant pour les générations futures la contribution génotypique de l'individu le mieux adapté à son environnement (Hamilton, 1964 ; Daan et Tinbergen, 1997). Cette pression sélective contribue au développement de stratégies adaptatives correspondant à un ensemble de caractéristiques morphologiques, physiologiques et comportementales. Ainsi, chaque stratégie correspond à une combinaison de traits de vie majeurs exprimée par un génotype et susceptible d'être favorisée par la sélection naturelle dans un contexte écologique donné (Stearns, 1976). Dans ce cadre, la théorie des traits d'histoire de vie cherche à expliquer les variations observées parmi ces caractères. Elle se base spécifiquement sur des traits impliqués dans la reproduction et la survie des organismes tels que la taille à la naissance, la taille et l'âge à la maturité sexuelle, le nombre de descendants produits, leur capacité à survivre, etc. (Stearns, 1992 ; Roff, 2002). Un des principes fondamentaux de la théorie des traits d'histoire de vie réside en l'existence de compromis ou *trade-off* (Cole, 1954; Stearns, 1992 ; Roff, 1992). En effet, la quantité d'énergie dont les êtres vivants disposent est une ressource limitée qui doit être partagée entre les différentes fonctions biologiques. En conséquence, toute augmentation de l'énergie allouée à un de ces traits se fera au dépend des autres (Williams, 1966). Ainsi, chaque organisme doit faire face à des compromis entre maintien, croissance, survie et reproduction, et la combinaison de traits qui est la mieux adaptée aux conditions écologiques ambiantes sera privilégiée par la sélection naturelle. Ce concept de compromis est donc un outil très important pour la compréhension des processus évolutifs (Cole, 1954 ; Stearns, 1992 ; Roff, 1992).

La notion de compromis énergétique s'exprime dès la naissance. En effet, le développement post natal représente un premier challenge dans la vie d'un individu. Cette phase constitue une étape critique où le jeune animal doit passer le plus rapidement possible d'un état particulièrement vulnérable à un stade de maturité suffisant pour assurer survie et reproduction

(Schew et Ricklefs, 1998). Dans la plupart des cas, différentes fonctions non matures ou pas encore totalement fonctionnelles à la naissance vont donc devoir se développer afin que le jeune animal puisse acquérir son autonomie (Ricklefs, 1973). Parmi ces fonctions, la locomotion apparaît comme primordiale pour échapper aux prédateurs, trouver des ressources alimentaires ou encore un partenaire sexuel. Durant la période de croissance, le juvénile est généralement alimenté de manière fréquente et soutenue (Ricklefs, 1979a). La croissance post-embryonnaire se traduit alors par un développement structural et pondéral relativement rapide (Case, 1978 ; Ricklefs, 1973) faisant intervenir la maturation de divers tissus comme les os (De Margerie *et al.*, 2004 ; Bennett, 2006) et les muscles (Helmi et Cracraft, 1977 ; Olson, 2001). Chez les espèces aviaires, la vitesse de développement est en moyenne deux fois plus rapide que chez les mammifères de même taille. De manière générale, il a été montré, chez les oiseaux, que le déroulement de la croissance se distingue par une phase de croissance rapide après l'éclosion suivi d'un ralentissement lorsque le poussin approche de la taille adulte. (Ricklefs, 1979a). La période d'élevage peut être cependant très variable selon la taille et la longévité de l'espèce. De plus, la fréquence, la qualité ainsi que la durée des soins parentaux envers les oisillons varient selon l'état de dépendance du poussin à l'éclosion (Ricklefs, 1979a).

II. Modes de développement post embryonnaire chez les oiseaux

À l'éclosion, l'état d'avancement du développement des poussins peut être très différent selon les espèces. Ainsi, plusieurs critères, comme la présence d'un duvet, l'ouverture des yeux, la mobilité du poussin, le nourrissage autonome ou non, l'intensité des soins parentaux, ont servi à définir différents modes de développement post-embryonnaire (Nice, 1962 ; Starck and Ricklefs, 1998) :

Ainsi, les poussins qualifiés de **précoces** (ou **nidifuges**) ont un duvet et les yeux ouverts dès l'éclosion. Ils sont, par ailleurs, capables d'assurer une thermorégulation ainsi qu'une locomotion efficace dès les premiers jours suivant la naissance ; quatre échelons ont été définis en fonction du degré d'attention parentale (apport alimentaire et/ou protection contre les prédateurs). Les mégapodes (Mégapodidés) constituent un cas extrême chez lequel les jeunes peuvent vivre indépendamment de leurs parents dès leur naissance. Chez les canards ou les oies (Anatidés) les oisillons se nourrissent seuls mais restent avec leurs parents pour se protéger d'éventuels prédateurs. Les cailles ou les poules (Gallinacés) protègent également leurs petits et les initient en plus à la recherche alimentaire. Les grèbes (Podicipedidés) nourrissent leurs poussins pendant 1 à 2 semaines après l'éclosion. Les oisillons dont le mode de développement est dit **semi-précoce** sont, comme le groupe précédent, couverts de duvet et ont les yeux ouverts à la naissance. Cependant, les jeunes oiseaux restent dans le nid où ils sont nourris par leurs parents jusqu'à l'envol. C'est le cas des goélands et des sternes (Laridées).

À l'opposé, les poussins dit **altriciaux** (ou **nidicoles**), sont typiquement représentés par les passereaux (Passériformes). Ils sont dépourvus de duvet, ont les yeux fermés à la naissance et sont nourris et couvés par les parents. Un type de développement **semi-altricial** a également été défini. Ce groupe correspond à des poussins dotés d'un duvet plus ou moins développé à l'éclosion. Dans cette catégorie, les oisillons peuvent avoir les yeux ouverts comme chez les hérons (Ardéidés) et les faucons (Falconidés), ou fermés dans le cas des chouettes (Strigidés). Dans tous les cas, ces oisillons sont totalement dépendants des soins parentaux et restent dans leur nid jusqu'à l'envol.

Ainsi, les différents degrés de maturité de l'oisillon à la naissance ont permis de classer les oiseaux en plusieurs catégories allant des espèces précoces (nidifuges) aux altriciaux (nidicoles) (Figure 1). Ces deux grandes catégories sont notamment caractérisées par des disparités dans le développement des capacités thermorégulatrice et locomotrice ce qui peut

influencer à la fois le déroulement de la croissance post-natale et l'investissement parental (présence au nid et recherche alimentaire).



Figure 1 : Exemples d'oisillons avec des états de développement différents à la naissance. De gauche à droite : poussin précoce, canard colvert (*Anas platyrhynchos*) ; poussin semi-altricial, manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) ; poussin altricial, le bulbul à ventre rouge (*Pycnonotus cafer*).

1) Ontogénèse chez les oiseaux altriciaux

À l'éclosion, les oisillons altriciaux sont généralement de petite taille et dépourvus de duvet (Ricklefs, 1973, 1979a). Ils sont incapables d'assurer une thermogénèse de régulation efficace et ont une mobilité quasi nulle. Cet état de dépendance reflète l'immaturation des tissus notamment musculaires et osseux au niveau des ceintures pectorale et pelvienne. Les poussins sont ainsi totalement dépendants des soins parentaux et restent dans le nid. Couvés et régulièrement nourris, les oisillons investissent une part importante de leur budget énergétique au développement quasi simultané des différents tissus et fonctions. Ils quittent leur nid après l'acquisition de l'homéothermie et lorsque les types de locomotion terrestre et aérienne (ou subaquatique) sont fonctionnels. Après l'envol, les soins apportés par les parents relèvent uniquement de l'apprentissage dans la recherche alimentaire.

2) Ontogénèse chez les oiseaux précoces

Chez les poussins nidifuges, la présence d'un duvet isolant et la maturation des mécanismes de thermorégulation sont suffisantes pour que les oisillons puissent garder leur température interne constante (40°C) (Nichelmann et Tzschentke, 2002). Par ailleurs, la maturation précoce des tissus musculaires de la ceinture pelvienne leur permet d'acquérir très rapidement après la naissance une locomotion bipède relativement efficace. Les muscles de la ceinture pectorale ne sont pas encore assez développés pour assurer une fonction locomotrice (vol aérien ou subaquatique). Ils deviennent donc fonctionnels plus tardivement. Ricklefs (1979b) a ainsi montré que la Sterne pierregarin (*Sterna hirundo*), est capable de se déplacer sur terre dès la naissance mais ne peut sembler-il voler qu'au bout de 28 jours. Ce mode de développement permet aux poussins précoces d'acquérir rapidement une première forme d'autonomie relative. Cependant, selon Ricklefs (1973, 1979a), le taux de croissance est corrélé négativement à la précocité du développement fonctionnel. Ainsi, la croissance des espèces précoces est en moyenne 3 à 4 fois plus lente que celle des espèces altriciales de même masse à l'âge adulte (Ricklefs, 1979a).

3) La locomotion

Parmi les grandes fonctions biologiques assurées par un organisme, la locomotion apparaît comme primordiale pour la survie de nombreuses espèces animales. En effet, le déplacement physique permet d'échapper à d'éventuels prédateurs, de coloniser un nouveau milieu, de chercher des ressources alimentaires et de rencontrer un partenaire sexuel. Cette fonctionnalité implique plusieurs types de tissus dont le tissu musculaire strié squelettique et le tissu osseux.

III. Tissus musculaire et osseux : implication dans la fonction de locomotion

1) Le muscle strié squelettique

Le muscle squelettique est constitué de gros faisceaux de fibres musculaires entourés par un tissu conjonctif appelé **épimysium**. Chaque faisceau musculaire est délimité par une enveloppe conjonctive très vascularisée (**pérимysium**) et regroupe un ensemble de fibres musculaires elles-mêmes limitées par une mince gaine de tissu conjonctif nommée **endomysium** (Barbut, 2002).

1.1 Structure des fibres musculaires

La fibre musculaire est une cellule plurinucléée, allongée et caractérisée par un appareil contractile constitué de myofibrilles qui s'étendent sur toute la longueur de la cellule. Chaque myofibrille est composée de **myofilaments épais** issus de l'assemblage de protéines contractiles appelées **myosine**, et de **myofilaments fins** constitués de protéines telles que l'**actine**, la **tropomyosine** et la **troponine** (Campbell et Smith, 2002). Ces deux types de myofilaments s'interpénètrent dans le sens longitudinal formant des striations périodiques caractérisées par l'alternance de bandes sombres A (Anisotropes) et de bandes claires I (Isotropes) (Beaumont *et al.*, 2004) (Figure 2). La bande A est formée par l'interpénétration des deux types de myofilaments sauf au niveau de la zone centrale de la bande (strie H) où les filaments de myosine sont les seuls présents. La bande I ne comporte que des myofilaments fins et la partie centrale est marquée par une strie Z. L'espace compris entre deux stries Z consécutives constitue l'unité structurale fondamentale du muscle, le **sarcomère**.

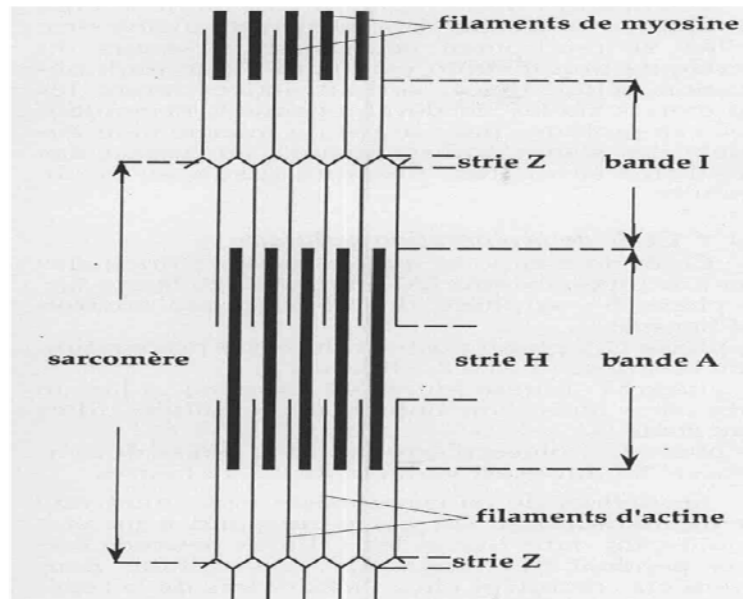


Figure 2 : Structure des fibres musculaires d'après Robelin (1990).

1.2 La contraction musculaire

La contraction musculaire correspond au raccourcissement simultané de tous les sarcomères de la cellule musculaire. Ce phénomène est dû au déplacement des filaments d'actine et il est induit par l'activité de l'ATPase localisée au niveau des myosines (Guth et Samaha, 1972). Principale protéine constitutive des myofibrilles (Bandman, 1999), la myosine est une molécule composée de deux chaînes lourdes (environ 200 kDa chacune) et de quatre chaînes légères (environ 20 kDa chacune). Chaque chaîne lourde est porteuse d'une tête globulaire N-terminale enzymatique à activité ATPasique permettant de convertir en mouvement l'énergie libérée par hydrolyse de l'Adénosine Tri-Phosphate.

Le glissement des filaments d'actine entre les filaments de myosine s'effectue selon plusieurs phases successives.

La contraction musculaire est initiée par la libération des ions calcium stockés dans le **réticulum sarcoplasmique**. La liaison du calcium sur la troponine C induit la libération du site de liaison actine-myosine. La tête de myosine se fixe ensuite à l'actine, formant ainsi un complexe

d'acto-myosine. Cette interaction est de courte durée puisque la fixation d'une molécule d'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) sur le site ATPasique de la myosine provoque le détachement de la tête de myosine sur l'actine. L'hydrolyse de l'ATP en Adénosine Di-Phosphate (ADP) et Pi crée un changement de position de la tête de myosine et induit la fixation myosine-ADP-Pi sur l'actine. Le départ du phosphate (Pi) remet la tête de myosine en position initiale ce qui déplace le filament d'actine. L'ADP se détache à son tour et est remplacé par une autre molécule d'ATP permettant de commencer un nouveau cycle.

Le relâchement musculaire est obtenu par un pompage actif des ions calcium vers la lumière du réticulum sarcoplasmique par des ATPases calcium-dépendantes.

1.3 Propriétés contractiles des fibres musculaires

Le muscle strié squelettique présente une grande variabilité de caractéristiques fonctionnelles, comme sa vitesse de contraction, son type de métabolisme énergétique et sa résistance à la fatigue (Talesara et Goldspink, 1978 ; Pette et Staron, 1990). Cette hétérogénéité est issue d'une diversité physiologique, biochimique et morphologique au sein des cellules musculaires (Bacou et Vigneron, 1988).

1.3.1 Caractéristiques fonctionnelles

La vitesse de contraction des fibres corrélée à l'activité ATPasique dépend directement de la nature des molécules de myosine (Pette et Staron, 1990 ; Reiser *et al.*, 1996). On peut ainsi distinguer des fibres musculaires dites rapides (type II) et lentes (type I) qui se différencient par leur composition en chaîne lourde de myosine (myosine heavy chain, MyHC). Chez les mammifères adultes, grâce à des techniques de séparation par électrophorèse, les fibres rapides ont été classées en trois sous-populations de fibres, de type II (types IIA, IIB et IIX)

correspondant respectivement aux isoformes de MyHC IIa, IIb et IIx (Janmot et d'Albis, 1994). Chaque population est caractérisée par une vitesse maximale de contraction que l'on classe par ordre croissant : $I < IIa < IIx < IIb$ (Von Lengerken *et al.*, 2002). Concernant les oiseaux, il est plus difficile de faire correspondre une isoforme à un type de fibre musculaire mature. En effet, bien que la plupart des fibres de type II et I contiennent respectivement des isoformes de MyHC rapides et lentes, Crow et Stockdale (1986) ont montré chez le poulet l'existence de deux isoformes, l'une lente (SM2) et l'autre rapide (embryonnaire 3) dans des fibres musculaires de type lent. Cette hétérogénéité en isoforme de MyHC peut engendrer un large spectre de propriétés contractiles au sein même des fibres classées II et I. Les fibres rapides ne présentent pas non plus le même profil d'expression en isoformes de MyHC selon le type de muscle où elles sont localisées (Bandman et Rosser, 2000). Cette diversité résulte de la capacité des fibres rapides à exprimer des isoformes de MyHC développementales dans un muscle mature (Crow et Stockdale, 1986 ; Tidyman *et al.*, 1997). Par exemple, chez le poulet les fibres matures du muscle pectoral contiennent uniquement l'isoforme adulte (Shear *et al.*, 1988 ; Tidyman *et al.*, 1997) tandis que les fibres rapides des muscles gastrocnémien et biceps brachial expriment respectivement l'isoforme néonatale (Tidyman *et al.*, 1997) et embryonnaire 3 (Bandman et Bennet, 1988 ; Tidyman *et al.*, 1997).

Par ailleurs, l'existence d'un gradient d'expression des MyHCs a été mis en évidence sur la longueur d'une même fibre rapide (Rosser *et al.*, 1995 ; Bartnik *et al.*, 1999). En effet, dans les muscles pectoraux de poulet et de pigeon adultes, la proportion d'isoformes développementales (embryonnaire et néonatale) est plus élevée aux extrémités des cellules musculaires que dans leur partie centrale.

Une étude, menée par Lowey *et al.* (1993) sur des fibres musculaires isolées, a permis de mettre en évidence les caractéristiques contractiles de ses différents isoformes. Ainsi les formes adulte et néonatale présentent des vitesses de contraction supérieures à celles de la forme embryonnaire.

1.3.2 Caractéristiques métaboliques des fibres

Le métabolisme énergétique des cellules musculaires est également un facteur déterminant de la fonction contractile des fibres, notamment au niveau de l'endurance (Robelin, 1990). Ainsi, afin de produire l'énergie libre (ATP) nécessaire à l'activité musculaire, les fibres utilisent différents substrats présents dans la cellule musculaire (glycogène, lactate) ou provenant de la circulation sanguine (glucose, acide gras, triglycérides, corps cétoniques). L'utilisation de ces nutriments énergétiques peut emprunter **deux voies métaboliques** distinctes à savoir **glycolytique** (anaérobie) ou **oxydative** (aérobie) (Hocquette *et al.*, 2000). En condition anaérobie, la glycolyse est un processus très rapide permettant de faire face à une demande brusque en énergie, lors d'un sprint par exemple. Cependant, la production d'énergie très réduite (3 moles d'ATP par mole de glucose) et l'accumulation de l'acide lactique ne permettent pas de satisfaire une demande énergétique pendant un effort prolongé. En condition aérobie, la dégradation du glucose, des acides gras et de certains acides aminés par la voie du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire produit une plus grande quantité d'énergie (38 moles d'ATP par mole de glucose), même si ce processus se déroule plus lentement que la glycolyse. Trois catégories de fibres ont été définies d'après leur métabolisme: oxydatives, oxydo-glycolytiques et glycolytiques.

Ce deuxième critère associé aux propriétés contractiles définies précédemment, permet de caractériser les cellules musculaires de manière plus précise (Tableau 1) (Von Lengerken *et al.*, 2002). Les fibres lentes (type I) possèdent un métabolisme oxydatif et sont également nommées SO pour « Slow Oxidative ». Le groupe de fibres rapides (type II) est constitué de fibres oxydo-glycolytiques (ou FOG pour Fast Oxidative-Glycolytic) et glycolytiques (FG pour Fast Glycolytic) qui correspondent respectivement aux types IIA/IIX et IIB chez les mammifères. Chez les espèces aviaires, à l'exception des fibres IIX qui n'ont pas été décrites dans le muscle squelettique, on retrouve la même classification en types de fibres que chez les mammifères

(Bandman et Rosser, 2000). La différence de vitesse de contraction entre ces deux types de fibre observée par Sokoloff *et al.* (1998) dans le muscle pectoral du pigeon résulterait également d'une variation de composition en isoformes de MyHC entre ces deux types de fibres (Rosser *et al.*, 1998).

Finalement, la typologie des fibres au sein d'un muscle strié squelettique peut dépendre de ses fonctions motrices (Rosser *et al.*, 1996). Ceci est particulièrement vrai chez les oiseaux où le muscle pectoral, représentant en moyenne 1/6^{ème} de la masse corporelle, assure la locomotion aérienne (vol battu, vol plané) et/ou aquatique (Rosser *et al.*, 1996 ; Ponganis *et al.*, 1997 ; Kovacs et Meyers, 2000). La grande variabilité de composition en fibres dans ce muscle correspond aux diverses propriétés métaboliques et contractiles requises pour les différentes variétés de vol (Torrella *et al.*, 1998). Chez le poulet domestique, les muscles pectoraux ne sont composés que de fibres rapides de type FG capables d'accomplir à très court terme des séries de contractions rapides et puissantes (Smith *et al.*, 1993). À l'opposé, les muscles pectoraux des oiseaux de petite taille telles que les Passériformes (moineau, fauvette) sont composés de fibres rapides FOG certes moins puissantes et rapides que les FG mais, en raison de leur meilleure résistance à la fatigue, sont capables de soutenir un effort plus prolongé (Rosser *et al.*, 1996). Dans la plupart des cas, le muscle peut contenir plusieurs types de fibres (Talesara et Goldspink, 1978). Le muscle pectoral, par exemple, possède une faible proportion de fibres de type FG parmi les FOG. Ceci permet, chez des oiseaux massifs comme le canard ou le pigeon, d'assurer des contractions brèves et puissantes pendant le décollage (Rosser et George, 1986). Quant aux muscles des pattes (comme le gastrocnémien), la présence d'une population de fibres lentes ayant une grande résistance à la fatigue musculaire traduit le rôle de ces muscles dans le maintien de la posture (McFarland et Meyers, 2008).

| | Fibre lente | Fibres rapides | |
|--|--------------|-----------------------|----------------|
| | Type I ou SO | Types IIA ou FOG | Type IIB ou FG |
| Vitesse de contraction | lente | rapide | très rapide |
| Endurance (résistance à l'effort) | forte | moyenne | faible |
| Teneur en lipides | très élevée | élevée | élevée |
| Teneur en glycogène | élevée | élevée | élevée |
| Densité mitochondriale | élevée | élevée | faible |
| Métabolisme énergétique | oxydatif | oxydatif/glycolytique | glycolytique |

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types des fibres musculaires d'après Von Lengerken *et al.*, 2002.

1.4 La thermogénèse

Outre son rôle dans la locomotion, le tissu musculaire strié squelettique est également impliqué dans certains processus de thermorégulation chez les endothermes (Teulier, 2010).

La thermorégulation avec frisson semble être le principal mode de production de chaleur des oiseaux (Dawson, 1975 ; Hohtola et Stevens, 1986). Ce mécanisme correspond aux contractions asynchrones des muscles squelettiques antagonistes qui n'entraînent aucun mouvement locomoteur (Teulier, 2010). Pendant ces contractions, les interactions actine-myosine ainsi que le pompage du calcium dans le réticulum sarcoplasmique induisent une augmentation de la consommation en ATP. Afin de répondre à cette demande accrue en énergie, l'activité ATP synthase s'intensifie dans les mitochondries, mais cette énergie généralement utilisée pour

fournir un travail mécanique se dissipe en grande partie sous forme de chaleur (Block, 1994). Ce processus sollicite généralement les fibres musculaires oxydatives (type SO et FOG), qui sont résistantes à la fatigue (Choi *et al.*, 1993). Les fibres à métabolisme glycolytique, moins efficace en production d'énergie, semblent n'être recrutées qu'en cas d'extrême nécessité (Aulie et Toien, 1988).

Une thermorégulation sans frisson a par ailleurs été mise en évidence chez certaines espèces d'oiseaux telles que le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) et le canard de Barbarie (*Cairina moschata*) (Duchamp *et al.*, 1991 ; Duchamp et Barré, 1992). Indépendant de la contraction musculaire, ce mécanisme résulterait d'un découplage de la phosphorylation oxydative des mitochondries induit par une fuite protonique au profit d'une production calorifique.

1.5 Ontogénèse et développement du tissu musculaire

Chez la plupart des espèces, le nombre de fibres musculaires ne varie plus après l'éclosion (Smith, 1963 ; Fauconneau, 1996). Du point de vue morphologique, le développement post-natal du tissu musculaire se traduit en fait par l'élongation et l'augmentation du diamètre des fibres musculaires résultant respectivement de l'addition de sarcomères et de myofibrilles (Williams et Goldspink, 1978). Ce développement morphologique est également accompagné d'un phénomène de maturation provenant de l'augmentation de l'activité enzymatique des fibres musculaires (Choi *et al.*, 1993 ; Rosser *et al.*, 1998) ainsi que de l'expression de différents isoformes de myosine développementales (Bandman et Rosser, 2000). En effet, des études menées sur le poulet ont permis d'identifier l'expression de cinq isoformes différents dans les fibres rapides du muscle pectoral (Bandman et Rosser, 2000), dont l'isoforme nommé Cvent s'exprimant uniquement pendant la période initiale de la myogenèse (Sweeny *et al.*, 1989 ; Bisha et Baden, 1991). Les fibres musculaires rapides expriment en premier lieu des formes dites embryonnaires (emb 1, 2 et 3), puis néonatale et enfin adulte. Toutefois, parmi l'ensemble des

muscles étudiés, le muscle pectoral semble être le seul à exprimer uniquement l'isoforme adulte à maturité (Tidyman *et al.*, 1997).

2) Le tissu osseux

L'os est un tissu constitué majoritairement d'une phase minérale contenant des cristaux d'hydroxy-apatite (phosphate de calcium cristallisé) (De Margerie, 2004). On trouve également une phase organique composée essentiellement de fibres de collagène et d'autres protéines. L'os est un tissu en constant renouvellement. Ce remodelage permanent s'effectue grâce à l'activité conjointe des ostéoblastes et des ostéoclastes qui assurent respectivement la formation et la résorption du tissu osseux.

2.1 Anatomie et organisation des os longs

Les os longs peuvent être subdivisés en plusieurs régions anatomiques. La diaphyse ou corps osseux, est la partie médiane de l'os (De Margerie, 2004). De forme cylindrique, la diaphyse renferme un canal central médullaire contenant soit de la moelle rouge (synthèse des cellules sanguines), soit de la moelle jaune (réserves adipeuses). À chaque extrémité de l'os, on trouve les épiphyses formant les têtes articulaires tandis que les métaphyses assurent la liaison entre diaphyse et épiphyses (Figure 3a). Dans une coupe transversale réalisée au niveau de la diaphyse d'un os long, on peut observer une couronne d'os compacte (ou cortex) délimitant une zone interne d'os spongieux (zone médullaire) (Figure 3b).

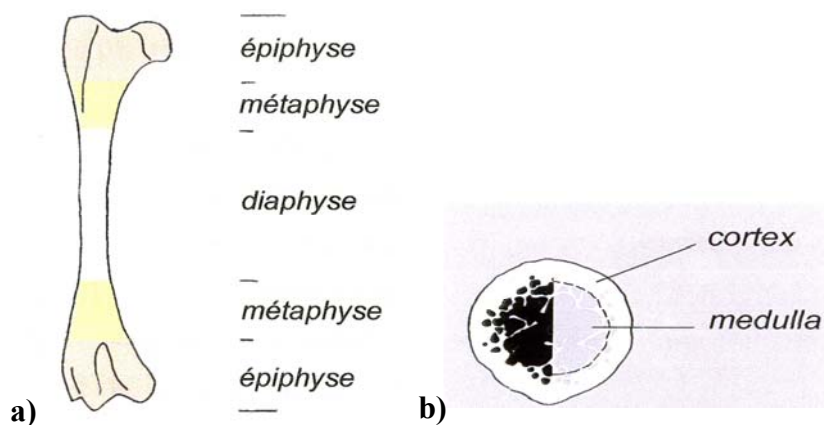


Figure 3 : Subdivision anatomique d'un os long (a), subdivision radiale d'une coupe transversale diaphysaire (b) (d'après De Margerie, 2004).

2.1.1 Le tissu osseux compact

L'os compact est constitué d'ostéones formés de lamelles osseuses cylindriques disposées concentriquement autour du canal de Havers (Toppets *et al.*, 2004). Entre les lamelles se situent les ostéoplastes contenant le corps cellulaire des ostéocytes. Les canaux de Havers sont orientés selon le grand axe de l'os ; ils communiquent entre eux par de fins canaux transversaux ou obliques (canaux de Volkmann) qui contiennent des éléments vasculo-nerveux.

2.1.2 Le tissu osseux spongieux

L'os spongieux est localisé dans la zone interne de l'os long. Il est formé par des trabécules de tissu osseux, ramifiés et anastomosés, délimitant un labyrinthe d'espaces inter communicants occupés par de la moelle osseuse et des vaisseaux (Toppets *et al.*, 2004).

2.2 Microanatomie des os longs : reflet du mode de vie

La répartition radiaire des zones corticale et médullaire peut être très variable selon l'os étudié mais elle reflète également le milieu de vie ainsi que la locomotion de l'animal.

En étudiant la microanatomie des os longs appendiculaires des espèces aviaires, Habib et Ruff (2008) ont pu mettre en évidence une distribution différente de ces structures entre les oiseaux effectuant un déplacement majoritaire aérien et ceux qui pratiquent une locomotion aquatique (Figure 4). Ainsi, pour les oiseaux adaptés au vol, le squelette présente un allègement généralisé se traduisant par la présence d'une cavité médullaire libre dépourvue d'os spongieux entourée d'une corticale particulièrement fine (Cubo et Casinos, 2000 ; Dumont, 2010). À l'opposé, les espèces aviaires ayant un mode de vie plutôt aquatique présentent des os appendiculaires beaucoup plus compacts (Habib et Ruff, 2008). L'épaississement de la zone corticale et la diminution du volume de la zone médullaire induisent une augmentation de la masse du squelette encore appelé pachyostose. Ce phénomène, déjà bien connu chez certains mammifères tels que les Siréniens (lamantins et dugongs) (De Buffrénil et Schoevaert, 1989 ; De Buffrénil *et al.*, 2010), est interprété comme constituant une adaptation à la nage subaquatique. En effet, l'augmentation de la densité du squelette semble jouer un rôle de lest afin d'optimiser l'activité de plongée. De plus, l'eau étant beaucoup plus dense que l'air (environ 850 fois), l'épaisseur de la zone corticale induirait une meilleure résistance du tissu osseux par rapport aux forces appliquées pendant la plongée (Habib et Ruff, 2008).

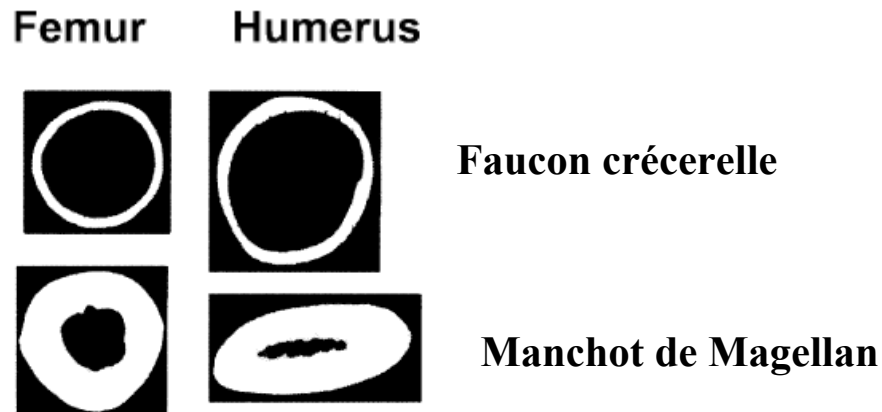


Figure 4 : Images binaires de coupes transversales de fémur et d'humérus chez deux espèces d'oiseaux ayant respectivement un mode de locomotion essentiellement aérien et aquatique : le faucon crécerelle (*Falco tinnunculus*) et le manchot de Magellan (*Spheniscus magellanicus*) (d'après Habib et Ruff, 2008).

La zone corticale est représentée en blanc et la zone médullaire au centre, en noir. Les images ne sont pas à la même échelle pour les deux espèces.

2.3 La croissance des os longs appendiculaires

La croissance du tissu osseux suit des processus différents au niveau de la longueur et du diamètre de l'os long. La croissance en longueur est dite enchondrale : une matrice cartilagineuse est synthétisée aux extrémités de l'os, au niveau des épiphyses, et est remplacée par de l'os au cours d'un processus d'ossification (Figure 5). La croissance en diamètre s'établit directement par un dépôt d'os à la surface externe de la diaphyse. Le périoste est le tissu recouvrant la partie externe des os longs et contient de nombreux ostéoblastes responsables de cette synthèse d'os. En parallèle, il se produit généralement une résorption endostéale centrifuge au niveau de la cavité médullaire permettant une régulation de l'épaisseur de la corticale.

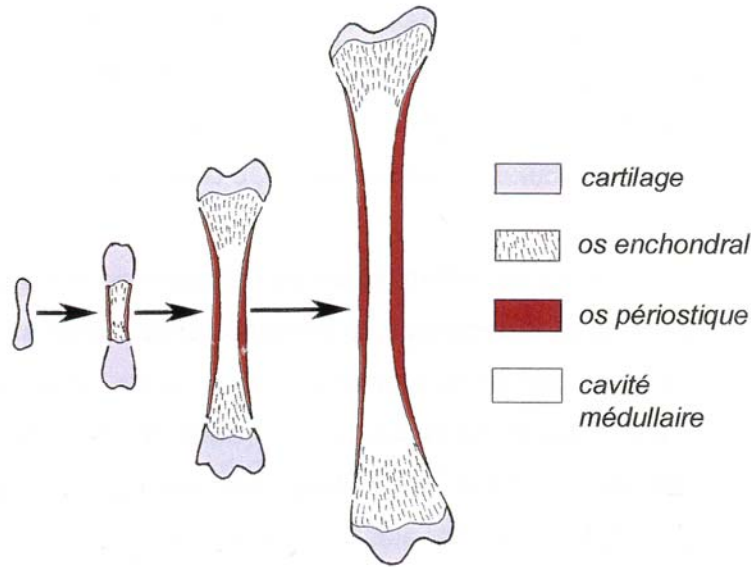


Figure 5 : Schématisation de la croissance des os longs vue en coupe longitudinale (d'après De Margerie, 2004)

IV. Croissance et contraintes énergétiques

L'approvisionnement énergétique et la qualité du régime alimentaire sont essentiels pour l'optimisation de la croissance (Martin, 1987). En effet, le développement et la maturation des différents tissus et organes induisent un investissement énergétique important et requièrent la disponibilité de certains constituants tels que les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique et au calcium pour la croissance osseuse. L'entretien des fonctions vitales attribuées au métabolisme de base est également à prendre en considération dans les dépenses énergétiques.

Afin de répondre à cette forte demande en énergie, la période d'élevage des jeunes oisillons coïncide le plus souvent avec la saison de plus forte disponibilité alimentaire (Ricklefs, 1979a). Les adultes peuvent ainsi assurer la perpétuation de l'espèce tout en veillant à leur propre survie (Groscolas, 1986). Pour le poussin, l'apport alimentaire peut néanmoins fluctuer selon différents facteurs tels que les conditions climatiques (Cherel *et al.*, 1993 ; Velando *et al.*, 1999 ; Arlettaz *et al.*, 2010), la disponibilité des proies (Barrett *et al.*, 1996), la compétition alimentaire entre poussins du même nid (Magrath, 1990 ; Ricklefs, 1993), ainsi que la qualité intrinsèque des

parents (Lewis *et al.*, 2009). Dans ce cas, la quantité et la qualité des nutriments ingérés peuvent devenir un facteur limitant de la croissance pour des individus en développement (Heath et Randall, 1985). Face à une disponibilité alimentaire variable, les organismes doivent pouvoir moduler leur processus de développement ontogénique afin d'assurer leur pérennité. Ainsi, plusieurs études expérimentales ont mis en évidence des modifications au niveau de l'énergie allouée en réponse à une restriction alimentaire à court terme (Kitaysky, 1999 ; Moe, 2004). Certaines espèces privilégient la maturation de quelques organes indispensables à leur survie (Moe, 2004). D'autres stoppent la croissance et la maturation jusqu'à la reprise d'une alimentation plus régulière (Moe, 2004).

Lorsque la croissance des jeunes est longue, la seule saison estivale ne suffit pas toujours aux parents pour amener leurs poussins jusqu'à l'émancipation totale. Les contraintes environnementales imposées aux jeunes oiseaux sont alors beaucoup plus drastiques que dans les cas précédemment cités. Dans une telle situation, la survie des poussins suggère la mise en place de stratégies d'allocation énergétique particulières qui ne sont à ce jour pas encore bien comprises. Afin d'apporter des éléments de réponse, nous nous sommes intéressés au mode de croissance des jeunes chez une espèce sauvage, le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus* Miller, 1778) dont le poussin est soumis à une phase de restriction énergétique relativement sévère, au cours de son développement.

V. Modèle d'étude : le poussin de manchot royal

Le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) est un oiseau marin qui vit dans la zone subantarctique, ses territoires de reproduction se situant principalement entre 45° et 58° Sud, de la Patagonie à la Nouvelle-Zélande. De nombreuses colonies sont présentes en Géorgie du Sud et dans les archipels de Kerguelen et de Crozet (Stonehouse, 1960 ; Barrat, 1976). Incapable de voler, les manchots royaux se nourrissent exclusivement en mer et ne retournent à terre que pour

renouveler leur plumage et se reproduire. Ils débutent leur cycle de reproduction en été mais, du fait de leur grande taille et de la courte période d'abondance alimentaire estivale, ces oiseaux ne peuvent pas achever l'élevage des poussins pendant la période estivale (Jouventin et Lagarde, 1995). Il se poursuit alors pendant l'hiver austral, période au cours de laquelle les poussins peuvent être soumis à une restriction alimentaire sévère de plusieurs mois (Cherel *et al.*, 1988).

Le poussin de manchot royal constitue ainsi un modèle atypique pour l'étude des stratégies de croissance mises en place pour faire face aux contraintes nutritionnelles et environnementales imposées au cours du développement.

Le cycle de reproduction du manchot royal

- Formation des couples, ponte et incubation

Les couples se forment rapidement après leur arrivée à terre, en novembre-décembre pour les plus précoces et jusqu'à janvier-février pour les plus tardifs. Deux semaines plus tard, la femelle pond un œuf unique qui est directement transmis au mâle pour la première période de couvaison. Le mâle couve alors l'œuf sur ses pattes, dans un repli de peau abdominal (poche incubatrice) pendant que la femelle se réalimente en mer (Barrat, 1976). Durant toute la phase d'incubation, qui s'étale de 52 à 53 jours en moyenne, les deux parents assurent chacun leur tour la couvaison par intervalle de 10 à 15 jours (Weimerskirch *et al.*, 1992)

- Élevage du poussin

La période d'éclosion démarre en janvier (Stonehouse, 1960). Les poussins sont alors qualifiés de précoces ou de tardifs en fonction de leur date de naissance (avant ou après la deuxième semaine de février). Le manchot royal étant une espèce semi-altricielle, le poussin est pratiquement nu à la naissance (Stonehouse, 1960 ; Barrat, 1976 ; Verrier, 2003). Incapable d'assurer le maintien de sa température corporelle et de se tenir debout, le poussin est donc totalement dépendant de ses parents. Mâle et femelle vont ainsi se relayer auprès de leur poussin

en alternant périodes de couvaision à terre et voyages alimentaires en mer. Le poussin est maintenu au chaud sous la poche incubatrice de son parent et est nourri de manière fréquente et soutenue. Dès 2 semaines, la maturation des mécanismes de thermorégulation accompagnée du développement d'un duvet permet au poussin de sortir fréquemment de la poche incubatrice. L'oisillon commence alors à se tenir régulièrement debout et entreprend déjà quelques déplacements autour de son parent. À l'âge d'un mois environ (31 ± 5 jours d'après Weimerskirch *et al.*, 1992), le jeune manchot, thermiquement émancipé, est laissé seul dans la colonie pendant les voyages alimentaires des deux parents. Le poussin, capable de se déplacer à terre, se rassemble alors avec ses congénères du même âge pour former des crèches. Celles-ci offrent aux jeunes oiseaux à la fois une protection contre les prédateurs (Pétrels géants) (Stonehouse, 1960) et une protection thermique, surtout en cas d'intempéries (Barrat, 1976 ; Barré, 1976 ; Groscolas, 1990). Cette première forme d'indépendance permet aux deux parents de s'investir simultanément dans l'approvisionnement alimentaire de leur progéniture. À la fin de l'été, au mois de mai, le poussin atteint une stature quasi identique à celle d'un adulte (tarse et aileron atteignent respectivement 90% et 75-90% de leur longueur chez l'adulte, d'après Verrier, 2003). L'adiposité du poussin est également très élevée grâce au nourrissage intensif des parents (Cherel et Ridoux, 1992 ; Cherel *et al.*, 1993).

Durant l'hiver austral les poussins sont nourris au mieux une fois toutes les 5 à 6 semaines (Cherel *et al.*, 1988 ; Descamps *et al.*, 2002) et dans certains cas pas du tout (Cherel *et al.*, 1988) durant 4 à 5 mois. Malgré l'accumulation de réserves lipidiques, la diminution des apports alimentaires entraîne une perte de masse corporelle qui se traduit par une diminution des masses lipidiques et musculaires (Cherel *et al.*, 1988 ; Verrier, 2003). Cet amaigrissement peut atteindre au moins 30 à 40% selon les années.

Lorsque l'hiver se termine, à partir du mois de septembre, la reprise d'un nourrissage intensif permet aux jeunes manchots de ré-engraisser et de poursuivre leur développement

(Barrat, 1976). Au cours du printemps, les poussins perdent leur duvet brun au profit d'un plumage très semblable à celui de l'adulte. Ce processus de mue dure environ 40 jours et se termine par le premier voyage en mer où le poussin acquiert son indépendance totale et définitive.

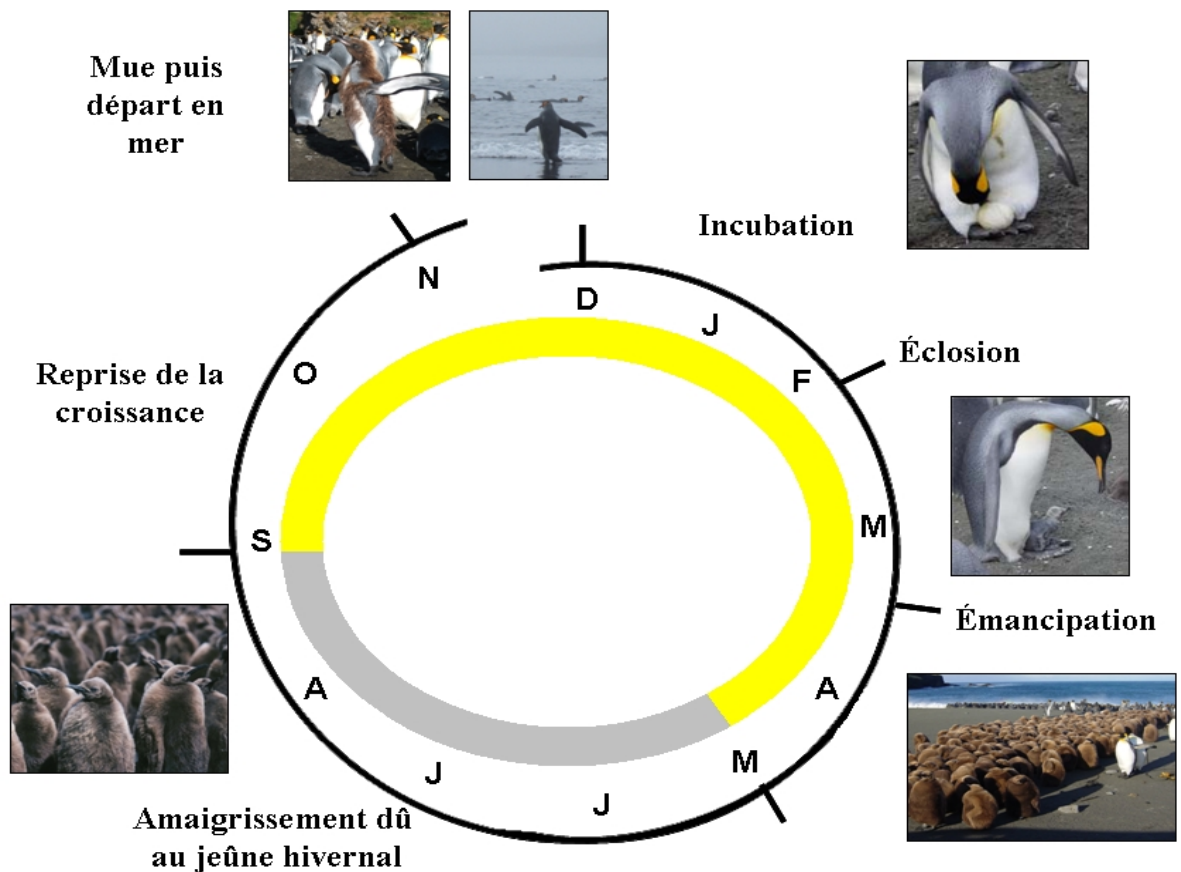


Figure 6 : Résumé du cycle de développement du poussin de manchot royal. Les saisons estivale et hivernale sont représentées respectivement en jaune et en gris (Ménard, 1998)

Le cycle de développement du poussin est de ce fait exceptionnellement long pour un oiseau (10 à 12 mois). Il peut par ailleurs être divisé en 3 phases : une phase de croissance staturale et pondérale rapide suivie d'une période d'arrêt de croissance liée à la sous-alimentation hivernale et enfin une seconde phase de croissance pondérale qui précède la mue et s'achève par l'indépendance totale du poussin avec son départ de la colonie (Figure 6).

Ce développement atypique nous amène aux questionnements suivants :

- Le manchot royal étant une espèce semi-altriciale, les fonctions locomotrices (marche et vol sub-aquatique) sont sous-développées à la naissance. La maturation des membres antérieurs et postérieurs est ainsi obligatoire pour l'émancipation totale du jeune poussin.

Cependant au cours du premier mois de vie, l'oisillon développe des mécanismes de thermorégulation ainsi qu'une locomotion exclusivement terrestre. Ceci lui permet d'obtenir une première forme d'indépendance sur terre. Dans ces conditions, quelle est la cinétique de développement de la ceinture pectorale, sachant que le jeune manchot passera d'une locomotion exclusivement terrestre à celle de nageur-plongeur 10 à 12 mois plus tard ?

- Ensuite, lorsque le poussin est devenu marcheur, l'accumulation des réserves énergétiques (essentiellement lipidiques, Groscolas, 1990) est nécessaire en prévision de l'hiver.

Dans ce cas, comment évoluent le développement respectif des ceintures pectorale et pelvienne et l'accrétion lipidique au vu de la restriction alimentaire de plusieurs mois à laquelle les poussins devront faire face ?

- Finalement, quelles sont les conséquences de la restriction alimentaire hivernale sur les tissus musculaires et osseux des ceintures pelviennes et pectorales ?

II Méthodologie

I. Site d'étude

Les individus utilisés pour cette étude proviennent de la colonie de manchot royal de la Baie du Marin, située sur l'île de la Possession, dans l'archipel de Crozet ($46^{\circ} 26' S$, $51^{\circ} 52' E$, Océan Indien). Avec une surface de 150 km^2 , l'île de la Possession est la plus grande île de cet archipel sub-antarctique appartenant aux Terres australes et antarctiques françaises. Elle est également la seule à posséder une base scientifique permanente, la base Alfred Faure, se trouvant au sud de la baie du Marin qui constitue l'un des seuls points de débarquement de l'île (Figure 7).



Figure 7 : Carte de l'île de la Possession et deux photos représentant la Base Alfred Faure (en haut) et le débarcadère avec la colonie de manchots royaux (en bas).

II. Collecte des échantillons

Les échantillons pour ma thèse ont été collectés dans une colonie où se reproduisent environ 25000 couples. La colonie étant proche de la base scientifique Alfred Faure, les animaux

se sont habitués à la présence humaine. Les prélèvements ont été effectués de janvier à octobre de l'année 2006 pour la plupart, mais certains échantillons osseux ont été récupérés les années antérieures (1998-2001).

Cette étude, réalisée dans le cadre du programme *Éconergie* dirigé par R. Groscolas a été financée par l'Institut Paul Emile Victor et a reçu l'accord du comité d'éthique de cet organisme.

III. Prélèvements

Les échantillons musculaires et osseux ont été collectés sur des cadavres frais de poussins (n= 110) et d'adultes (n=8) non en mue (la mort survenant au plus quelques minutes avant les prélèvements). Ces animaux, victimes de prédation par des skuas subantarctiques (*Stercorarius skua lönnerbergi*) ou des pétrels géants (*Macronectes halli* et *giganteus*), étaient localisés lors de rondes effectuées au niveau des zones périphériques de la colonie. Les prélèvements ont été effectués dans un local situé à quelques dizaines de mètres de la colonie. Les restes des cadavres ont ensuite été redéposés dans la colonie à l'endroit de leur collecte afin de limiter l'impact de ces collectes sur les populations de prédateurs.

1) Les muscles striés squelettiques et os longs étudiés

Dans cette étude nous nous sommes principalement intéressés à trois muscles de la ceinture pectorale (*Pectoralis major*, *minor* et *Scapulohuméralis caudalis*) ainsi qu'à deux muscles appartenant à la ceinture pelvienne (*Gastrocnémius latéralis* et *Iliotibialis cranialis*). Par ailleurs deux os longs appendiculaires des membres antérieurs (Fémur et Tibiotarse) et postérieurs (Humérus et Radius) ont été étudiés (Tableau 2).

| | Muscles striés squelettiques | | | Os longs |
|---------------------------|-------------------------------------|--|--|---------------------------------|
| | Nom du muscle | Localisation | Fonction (s) locomotrice (s) | |
| Ceinture pectorale | Pectoralis major | insertion entre le sternum et la crête deltoïde de l'humérus | propulsion aquatique : abaissement des ailerons | Humérus Radius |
| | Pectoralis minor | situé le long du sternum, son tendon distal passe au travers d'un foramen <i>triosseum</i> pour s'incrèrer sur la face dorsale de l'humérus | propulsion aquatique : élévation des ailerons | |
| | Scapulohumeralis caudalis | prend son origine dans la partie latéral de la scapula et s'incère au niveau de la crête bicipital de l'humérus | propulsion aquatique : élévation et rotation des ailerons | |
| Ceinture pelvienne | Iliotibialis cranialis | prend son origine au niveau de la crête dorsale de l'ilion et s'incère sur la surface médiale du tibiotalse proximal | locomotion terrestre et aquatique: flexion de la hanche et extension du genou | Fémur |
| | Gastrocnemius lateralis | prend son origine sur la surface latérale du condyle du fémur et se termine au niveau de la partie latérale du talon d'Achille | locomotion terrestre et aquatique : extension de la cheville et la flexion du genou | Tibiotalse |

Tableau 2 : tableau récapitulatif des muscles striés squelettiques et des os longs étudiés dans le cadre de ce travail. En bleu sont représentés les tissus appartenant à la ceinture pectorale et en rouge ceux appartenant à la ceinture pelvienne. La localisation anatomique ainsi que la (les) fonction(s) locomotrice(s) ont été précisées pour chaque muscle (George et Berger, 1966 ; Beresford, 1983 ; Cribier, 2003 ; Smith *et al.*, 2006).

2) Procédure de prélèvement

Chaque animal a été pesé ($\pm 0,1\text{g}$) et les longueurs de l'aile, du bec et du tarse ont été mesurées ($\pm 0,5\text{mm}$). Les 5 muscles homolatéraux gauche des ceintures pelviennes (*Gastrocnemius lateralis* et *Iliotibialis cranialis*) et pectorales (*Pectoralis major* et *minor*, *Scapulohumeralis caudalis*), ont été prélevés entiers et pesés ($\pm 0,01\text{g}$). Après la dissection, chaque muscle a immédiatement été placé dans un sac hermétique et gardé à -20°C jusqu'à l'analyse au laboratoire, en métropole. Le reste des muscles de la ceinture pelvienne a été conditionné de la même manière afin d'être disséqué en métropole. Ces prélèvements serviront à la mesure de la masse protéique totale. Un échantillon de tissu adipeux sous cutané était systématiquement récupéré au même niveau de l'abdomen pour chaque animal. Conservé à -20°C , ce prélèvement de peau permet de déterminer un indice d'adiposité (ratio entre la teneur en lipides et la quantité de protéines).

Destinées aux analyses de la typologie en fibres (histoenzymologie) et de la composition des chaînes lourdes de myosine (électrophorèse), des dissections ont été effectuées sur les muscles controlatéraux de l'animal. L'échantillonnage a été réalisé dans la partie médiane pour les deux muscles des membres postérieurs et dans la partie supérieure pour le muscle pectoral. Des prélèvements musculaires de $0,20\text{ cm}^3$, destinés à l'histoenzymologie, ont été congelés dans de l'isopentane (cryoprotecteur) à -80°C , et $\sim 200\text{mg}$ de tissu a été conservé à $+4^{\circ}\text{C}$ avant que la myosine ne soit extraite au laboratoire situé à la Base (voir technique d'extraction ci-après, point **VI. 1**)) puis maintenu à -80°C jusqu'aux analyses en métropole.

Mon travail de thèse a donc consisté à analyser ces prélèvements en laboratoire.

IV. Détermination de la teneur en lipides et de la quantité de protéines

1) Préparation des échantillons

Au laboratoire, les muscles entiers ainsi que la peau ont été lyophilisés. Cette étape permet d'éliminer l'eau contenue dans les prélèvements congelés, par sublimation, sous vide. Au cours du processus de lyophilisation, les échantillons sont pesés tous les deux à quatre jours jusqu'à stabilisation de la masse sèche. La teneur en eau correspond à la différence entre la masse fraîche et la masse sèche, déterminées à $\pm 0.01\text{g}$ ou $\pm 0.0001\text{g}$ selon la masse des échantillons. Les tissus ont ensuite été réduits en fine poudre grâce à un broyeur (Retsch ZM1). Cette étape de broyage permet d'obtenir des aliquotes représentatifs des différents organes pour les dosages.

2) Dosage des lipides par la méthode modifiée de Folch

Ce dosage, d'après la méthode gravimétrique de Folch *et al.* (1957), consiste à extraire les lipides totaux correspondant aux lipides de réserve (triglycérides) et aux lipides structuraux (phospholipides et cholestérol).

À un gramme d'échantillon ($\pm 0.1\text{ mg}$) est ajouté 1 ml d'eau distillée et 30 ml d'une solution de chloroforme/méthanol (rapport 2/1 en volume) dans un ballon à col rodé. Après un passage aux ultra-sons (≈ 30 secondes) qui provoque l'éclatement des cellules pour une meilleure solubilisation des lipides, le mélange est placé sous agitation pendant 12 heures.

Ce mélange est ensuite filtré et le filtrat est recueilli dans des tubes à centrifugation. Après un rinçage méticuleux du ballon, du filtre et de l'entonnoir avec 5 fois 2 ml de mélange chloroforme/méthanol, 8 ml de chlorure de potassium (KCl à 0,9 %) sont ajoutés et mélangés énergétiquement au filtrat. Ce mélange est ensuite centrifugé (10 minutes à 2000 rpm) pour

séparer la phase chloroformique contenant les lipides du surnageant contenant le KCl, le méthanol, les lipoprotéines et les sels minéraux. Les lipides sont en solution dans la phase chloroformique apolaire de part leur caractère hydrophobe. La phase supérieure aqueuse et polaire est éliminée par aspiration au moyen d'une trompe à eau.

La phase chloroformique restante est transférée dans un ballon préalablement taré ($\pm 0,1\text{mg}$). Les ballons sont placés dans un bain thermostaté à 42°C et le chloroforme est évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor Büchi 461 Water Bath). À la fin de l'évaporation, seuls les lipides restent dans le ballon. Les lipides ainsi isolés sont pesés ($\pm 0,1\text{mg}$).

Le pourcentage de lipides totaux (L) contenu dans les échantillons est calculé grâce à la formule suivante :

$$L = \frac{m}{M} \times 100$$

Avec : m = masse en grammes des lipides totaux extraits ; M = masse sèche en grammes de l'échantillon dont les lipides sont issus.

On procède ensuite à une deuxième extraction

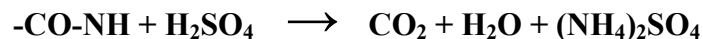
Une deuxième extraction sur la matière solide contenue dans les filtres est ensuite réalisée afin de déterminer le rendement de la première extraction et ainsi d'ajuster les résultats. Ce rendement est calculé selon la formule suivante :

$$R = \frac{\text{masse de lipides de la 1ère extraction}}{\text{masse de lipides de la 1ère extraction} + \text{masse de lipides de la 2ème extraction}}$$

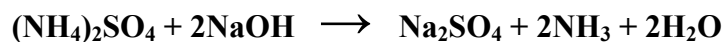
3) Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl

Cette technique permet de mesurer de façon indirecte la teneur en protéines des échantillons de muscle ou peau broyés, en déterminant leur teneur en azote ammoniacal total à l'aide d'un automate Büchi (322/342). Trois étapes sont nécessaires pour réaliser ce dosage:

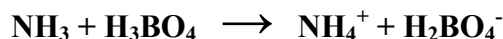
- La première étape de minéralisation est une hydrolyse à chaud en milieu acide. Un aliquote de 100 mg d'échantillon de matière sèche est pesé à 0,1 mg près et 3,5 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) pur, 1 ml d'eau oxygénée (H₂O₂), 1 g de catalyseur minéral mixte au sélénium et une goutte d'anti-mousse sont ajoutés. L'ensemble est porté à 300-400°C pendant 15 minutes dans un matras de minéralisation. Ainsi, l'azote organique est transformé en azote minéral fixé sous forme de sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄). Le carbone, l'hydrogène et l'oxygène contenus dans les macromolécules organiques s'évaporent sous forme de dioxyde de carbone et d'eau :



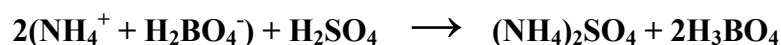
- Le minéralisat acide est ensuite alcalinisé par ajout de soude en excès (NaOH 7N).



Il se forme de l'ammoniac gazeux qui est entraîné par un flux de vapeur d'eau est recueilli dans une solution d'acide borique (H₃BO₄ à 0,64 M) en excès. À l'issue de la distillation, on obtient une solution de borate d'ammonium.



- La solution de borate d'ammonium obtenue est enfin titrée par une solution diluée d'un acide fort, l'acide sulfurique (H₂SO₄ à 0,05N), selon la réaction suivante :



Il y a ainsi reformation de sulfate d'ammonium et d'acide borique.

La quantité d'acide sulfurique ajoutée est proportionnelle à la quantité d'azote initialement présente dans l'échantillon (N). Ainsi, on peut déterminer la quantité d'azote (N échantillon) en mg et le taux de protéines (Q) en % de la masse sèche d'après les formules suivantes:

$$\mathbf{N \text{ (échantillon)} = (V - v) \times n \times M}$$

Avec : V = volume d'acide sulfurique ajouté (ml) ; v = volume d'acide sulfurique ajouté pour le titrage des blancs (même traitement mais sans les 100 mg d'échantillon dans le mélange initial) qui permettent de tenir compte des éventuelles traces d'azote dans les réactifs et ainsi éliminer les bruits de fond du dosage ; n = la normalité de la solution d'acide sulfurique et M = masse molaire de l'azote (g.mol⁻¹)

$$\mathbf{Q = \frac{N \text{ échantillon} \times 6,25 \times 100}{(m \times 1000)}}$$

Avec : m = masse de l'aliquote (g). On multiplie par un facteur de conversion entre la masse de l'azote total et la masse de protéines égal à 6,25, car le pourcentage moyen d'azote contenu dans les protéines musculaires est d'environ 16 % (Campbell et Leatherland, 1980) et que la quantité d'azote contenue dans les molécules autres que les protéines est considérée comme négligeable (Concon et Soltess, 1973).

V. Typologie des fibres musculaires : Histoenzymologie

Chaque type de fibre musculaire dispose d'un équipement enzymatique propre en relation avec son fonctionnement métabolique. Ainsi, la différenciation des types de fibres s'effectue grâce à des colorations de l'activité de certains enzymes caractéristiques tels que la myosine-ATPase (Guth et Samaha, 1969) et la succino-déshydrogénase (Nachlas *et al.*, 1957).

Les coupes transversales de muscle ont été réalisées en sections sériées de 14 μm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat (Harris) à -20°C et conservées au froid à -80°C jusqu'à leur traitement afin d'éviter la dénaturation des enzymes. Les coupes sont décongelées à température ambiante (30 minutes environ) juste avant la détermination des différentes activités enzymatiques.

1) La myosine – ATPase

La vitesse de contraction musculaire est directement liée à son activité ATPasique (Barany, 1967). Cette caractéristique est utilisée pour faire la distinction entre les fibres lentes et les fibres rapides, sachant que ces dernières ont une activité ATPasique plus élevée. L'intensité de l'activité m-ATPasique est mise en évidence grâce à la réaction entre le phosphate libéré par l'ATP hydrolysé et les ions calcium. Cette réaction est optimale à pH 9,4, ainsi la coloration de l'activité de l'enzyme apparaît de manière plus intense dans les fibres de type rapide que dans les fibres lentes. Par ailleurs, si l'on effectue une pré-incubation en milieu acide (pH 4,35), les ATPases de type lent sont inhibées permettant ainsi une meilleure différenciation des types cellulaires (Guth et Samaha, 1969).

Procédure

Après décongélation, les lames histologiques ont été plongées pendant 10 minutes dans une solution de pré-incubation acide constituée d'acétate de potassium 0,1 M, ajustée à pH 4,35. Après avoir été rincées dans un tampon (Tris-HCl 0,1M ; CaCl_2 18 mM ; pH 7,8), les coupes sont immergées dans une solution d'incubation, préparée extemporanément (ATP 2,7 mM ; CaCl_2 18 mM ; tampon 2-amino-2-méthyl-1-propanol 0,1 M) à pH 9,4 pendant 30 minutes à 37°C . Une série de bains successifs permet la coloration du complexe phosphate-calcium : trois bains de 30 secondes dans une solution de CaCl_2 0,07 M, puis 3 minutes dans une solution de CoCl_2 2% suivi de quatre bains de 30 secondes dans une solution de tampon

2-amino-2-méthyl-1-propanol 0,1 M, pH 9,4, et finalement un bain de 3 minutes dans une solution de sulfide d'ammonium à 1 %. Le précipité de sulfide de Cobalt obtenu est de couleur noire. Les lames sont alors rincées abondamment à l'eau du robinet avant d'être déshydratées à l'aide de quatre bains successifs de 5 minutes dans de l'éthanol 30, 50, 70 et 100 %. Pour finir, les lames sont encore immergées 5 minutes dans un bain de solvant (Histo-Clear II) avant d'être montées à l'Eukitt.

2) La succino-déshydrogénase

La succino-déshydrogénase (SDH) est une enzyme du cycle de Krebs. Sa présence permet de mettre en évidence un métabolisme oxydatif. Ainsi, seules les fibres lentes (type SO) et rapides de type FOG seront révélées par la coloration. L'activité de cette enzyme est décelée par la présence d'un sel de tétrazolium (nitro-BT). Soluble et incolore, le nitro-BT est réduit en formazan en captant les électrons libérés au cours de l'oxydation du succinate en fumarate. La présence du produit obtenu est détectée par une forte coloration bleue au niveau des sites d'activité de la SDH (Nachlas *et al.*, 1957).

Procédure

Les coupes décongelées sont directement plongées dans la solution d'incubation (Succinate de sodium 0,1 M ; nitro-BT 0,05% ; tampon phosphate – pH 7,6 – 0,1 M) durant une heure à 37°C et rincées dans une solution de NaCl (0,9%). Les échantillons sont alors déshydratés, passés dans un bain de solvant et montés à l'Eukitt comme indiqué précédemment pour les activités enzymatiques ATPasiques.

3) Analyse des coupes histologiques

L'observation des coupes histologiques a été effectuée au microscope optique (Zeiss, Axioplan 2) tandis que l'analyse a été réalisée à partir de photographies prises avec une caméra (Zeiss, Axiocam) grâce au programme Axiovision 3.1. Dans un muscle donné, la proportion de chaque type de fibre a été déterminée sur un total de 600 à 1000 cellules. L'aire et le périmètre de la section transversale des différents types de fibres ont été estimés grâce à un logiciel d'analyse d'images (Sigma Scan Pro 5.0). Pour chaque type de fibre, 25 cellules ont été mesurées au niveau de chacune des 4 régions choisies aléatoirement sur la coupe.

VI. Étude de la composition en isoformes de chaînes lourdes de la myosine

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) permet de réaliser une étude qualitative de la myosine en séparant les chaînes lourdes selon leur masse moléculaire (Talmadge et Roy, 1993).

1) Extraction de la myosine

L'extraction de la myosine a été réalisée sur le terrain, d'après D'Albis *et al.* (1979), dans le laboratoire situé à la base Alfred Faure. Cette étape permet l'obtention d'une solution de protéines constituée à 90-95 % de myosines. Les échantillons musculaires sont déposés avec 2 ml de tampon de lavage (NaCl 20mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 4,4mM, PO_4HNa_2 4mM, acide éthylène-glycol-tétra-acétique 1mM, pH 6,4) dans des tubes refroidis dans de la glace pilée. Après avoir été découpés plus finement dans le tampon de lavage, les échantillons sont centrifugés 10 minutes afin d'éliminer les protéines autres que la myosine. Un tampon d'extraction (pyrophosphate inorganique 97mM ; acide éthylène-glycol-tétra-acétique 5mM ;

dithiothréitol 1mM ; pH 8,4) est ensuite ajouté au culot. Le volume (ml) du tampon correspond à trois fois la masse initiale (en g) de chaque échantillon. La solution est ensuite agitée durant 30 minutes en chambre froide puis centrifugée 10 minutes. Le surnageant est conservé à -18°C après avoir été dilué d'un facteur 2 avec du glycérol à 87 %.

2) Préparation des échantillons

Afin d'obtenir des profils électrophorétiques suffisamment visibles, la quantité de protéines à faire migrer lors de l'électrophorèse doit être d'environ 5 µg pour 10 µl de dépôt. Ainsi, pour déterminer le volume d'extrait à prélever, des dosages de protéines ont été effectués selon la méthode de Bradford (1976).

3) Préparation des gels d'électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE)

Le système d'électrophorèse utilisé repose sur le matériel développé par Biorad pour réaliser des petits gels de 0,75 mm d'épaisseur (Miniprotean II). Les gels utilisés pour l'électrophorèse sont constitués d'un gel de concentration (partie supérieure) et de séparation (partie inférieure) composés respectivement à 4 et 8% d'acrylamide-bis (50 :1) (Tableau 3). Le persulfate d'ammonium (0,1%) ainsi que du N,N,N',N'tétra-méthyl-éthylènediamine à 0,05% (TEMED) sont rajoutés en fin de préparation pour les deux types de gel. Une fois polymérisés, les gels sont placés dans le système d'électrophorèse en présence de tampons de migration. Les tampons de migration interne (glycine 150 mM ; Tris 0,1 M et SDS 0,1%) et externe (glycine 75 mM ; Tris 50 mM et SDS 0,05%) sont respectivement versés entre et autour des plaques de verre (Figure 8).

| Gel de concentration | Gel de séparation |
|---------------------------|---------------------------|
| 30% de glycérol | 30% de glycérol |
| 4% Acrylamide-Bis (50 :1) | 8% Acrylamide-Bis (50 :1) |
| 70 mM Tris (pH 6,7) | 0,2 M Tris (pH 8,8) |
| 4 mM EDTA | 0,1 M glycine |
| 0,4 % SDS | |

Tableau 3 : Composition des gels de concentration et de séparation d'après Talmadge et Roy (1993).

EDTA = Acide Ethylène-diamine-tétra-acétique

SDS = Sodium dodécylsulfate

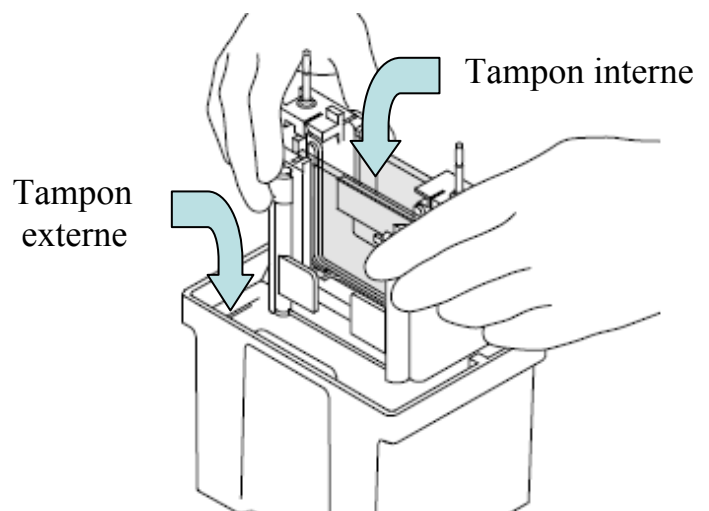
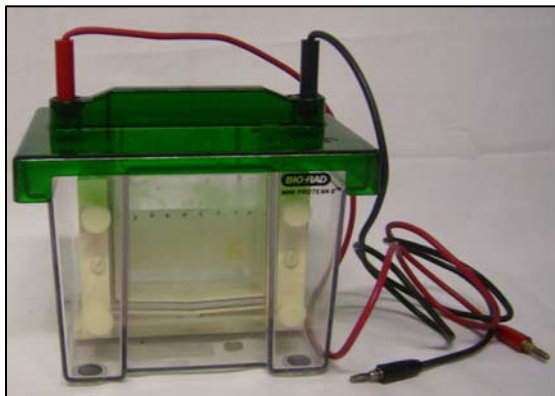


Figure 8 : Matériel utilisé pour la séparation des isoformes de chaînes lourdes de myosine. Le tampon de migration externe est versé dans la cuve d'électrophorèse, tandis que le tampon interne est coulé entre les plaques de verres contenant les gels SDS-PAGE.

Chaque échantillon est ensuite dilué dans un tampon de *Laemmli* (Tris HCl 124mM ; Glycérol SIGMA 20% ; β -mercapto-éthanol 0,72M ; éthylène-glycol-tétra-acétique 1mM ; sodium dodécylsulfate 5% et quelques grains de bleu de bromophénol) afin d'obtenir la concentration souhaitée (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Les tubes sont alors placés au bain-marie pendant 5 minutes à 100°C afin de dénaturer les protéines. De plus, la présence de β -mercapto-éthanol et de SDS dans le tampon *Laemmli* permet de séparer les chaînes lourdes et légères de la molécule de myosine en cassant les ponts disulfures, et en les chargeant négativement. Ainsi, la migration des protéines se fait uniquement en fonction de leur poids moléculaire. Après le dépôt des échantillons et l'ajout d'un marqueur de poids moléculaire (Laemmli, 1970), la migration est lancée à voltage constant de 70V durant 28 h dans une chambre froide à +4°C.

4) Révélation et lecture des isoformes de chaînes lourdes de myosine

Après la migration, les gels sont placés pendant 1 h sous agitation constante dans une solution de bleu de Coomassie (éthanol absolu 8,6M ; acide acétique 1,7M ; bleu de Coomassie 2,3mM) permettant de révéler les fragments de protéines. Les gels sont ensuite rincés à l'eau distillée avant d'être mis dans une première solution de décoloration (éthanol absolu 5M ; acide acétique 1,7M) sous agitation. Au bout de 30 minutes, ils sont à nouveau rincés puis trempés dans la deuxième solution de décoloration (éthanol absolu 0,86M ; acide acétique 0,84M) durant une nuit. Finalement, après avoir été plongés dans l'eau distillée pendant 30 minutes, les gels sont placés entre deux feuilles de cellophane et fixées sur un cadre où ils sécheront à température ambiante.

La lecture des gels d'électrophorèses a été effectuée à l'aide d'un densitomètre (BIORAD GS-800) et grâce à un logiciel d'analyse moléculaire (Quantity One 4.2.1).

VII. Étude de la microanatomie du tissu osseux

1) Préparation des lames minces

Après avoir retiré de manière grossière le tissu musculaire entourant les os longs, les échantillons ont été radiographiés afin de repérer la zone de coupe (Figure 9). Dans notre cas, nous nous intéressons plus particulièrement à la région mi-diaphysaire où le cortex est plus épais. Représentant la zone initiale de la croissance osseuse, cette zone correspond au point d'entrée des vaisseaux sanguins dans la diaphyse. Des segments transversaux de 6 à 10 mm d'épaisseur ont ainsi été réalisés au moyen d'une scie diamantée. Chaque segment a été déshydraté (3 bains de 6 heures dans de l'éthanol 70% puis 3 bains à 95% et 3 autres à 100 %) et dégraissé dans plusieurs bains successifs de trichloréthylène et d'acétone. Lorsque d'éventuel tissus médullaires persistaient, la suite du nettoyage se faisait manuellement. Les prélèvements, propres et secs, sont ensuite inclus dans une résine polyester (Norsodyne : Rhône-Poulenc) et sciés par incrément de 3 mm. Les sections obtenues ont été polies sur des disques abrasifs (Soc. Presi) de granulation décroissante jusqu'à la finition à la pâte d'alumine. Les tranches ont été collées sur des lames porte-objets et réduites par abrasion et polissage à une épaisseur de 100 μm .

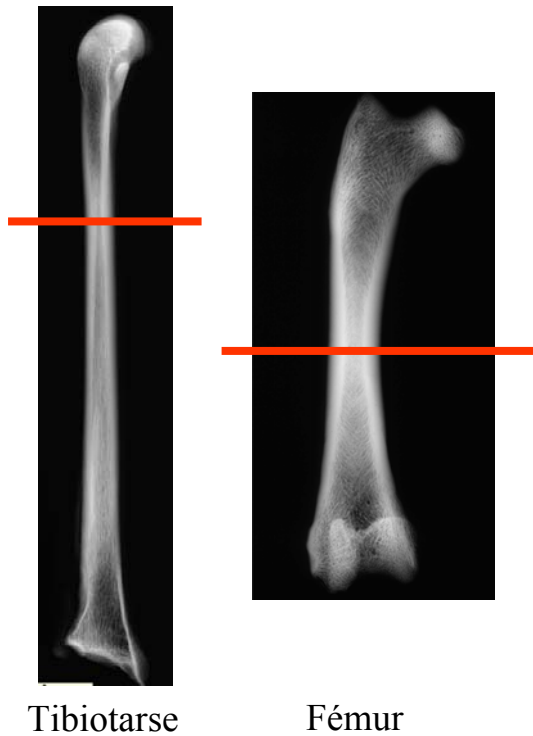


Figure 9 : Zone de coupe au niveau mi-diaphysaire définie par radiographie. Cette région correspond à la zone où le cortex est le plus épais.

2) Analyses morphométriques

Chaque section a été observée au microscope optique et schématisée à l'aide d'une chambre claire (grossissement de 30 à 50 fois). Afin de quantifier la compacité osseuse de la section, chaque petite cavité supérieure à 20 μm de diamètre ainsi que la zone médullaire ont été représentées. Les dessins ont ensuite été numérisés et convertis en images binaires grâce au logiciel Photoshop CS4 (Figure 10).

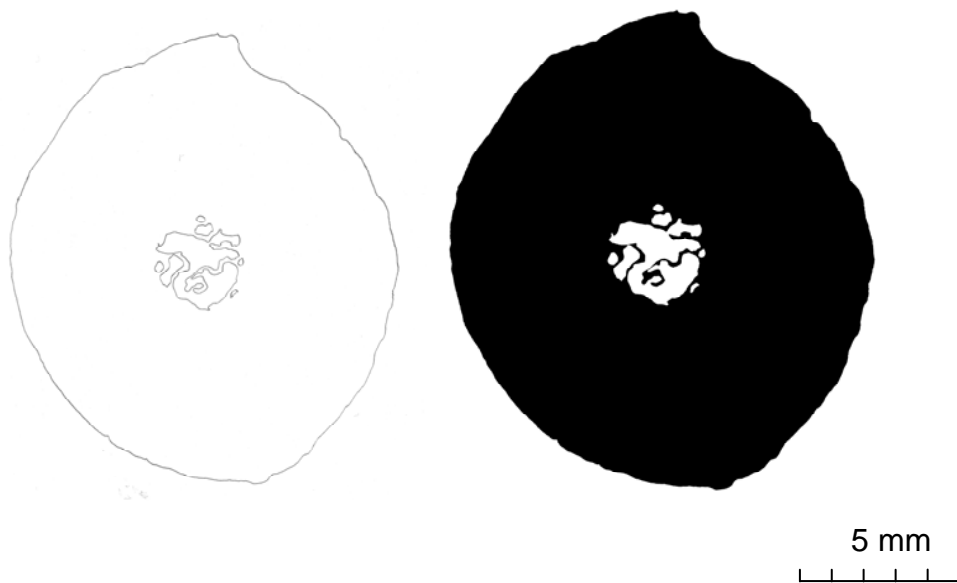


Figure 10 : Coupe transversale mi-diaphysaire d'un fémur adulte. À gauche est représenté le schéma réalisé à partir de la section d'os et à droite l'image binaire correspondante.

Chaque image binaire a été analysée à l'aide du logiciel Bone Profiler (Girondot et Laurin, 2003). Ce logiciel nous a permis d'obtenir plusieurs paramètres sur la structure osseuse, notamment la taille relative de la cavité médullaire, la compacité globale de la section osseuse, ainsi que la largeur de la zone de transition entre le cortex et la cavité médullaire.

III Études expérimentales

Partie I : Développement musculaire chez le poussin de manchot royal de l'éclosion à l'émancipation



Résumé de la partie I

Cette première partie regroupe deux études menées sur **le développement musculaire des ceintures pectorale et pelvienne de l'éclosion jusqu'à l'émancipation du poussin** :

1.2 - Differential development of the pectoral and pelvic girdles in early growth of king penguin chicks (*Aptenodytes patagonicus*). (Article en préparation).

2.2 - Differential muscular myosin heavy chain expression of the pectoral and pelvic girdles during early growth in the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) chick. (Article publié dans The Journal of Experimental Biology, février 2011, volume 214, 1829-1835).

La croissance se caractérise généralement par un développement structural et pondéral plus ou moins rapide faisant intervenir la maturation de divers tissus dont les muscles striés squelettiques. Pour répondre aux besoins énergétiques imposés par la croissance, l'élevage des jeunes coïncide habituellement avec la saison de plus forte disponibilité alimentaire. Cependant, lorsque la croissance est longue et que la saison estivale ne suffit pas pour atteindre l'émancipation totale, le développement du poussin peut être influencé par des fluctuations des conditions environnementales. Dans une telle situation, peu d'informations permettent de comprendre les compromis d'allocation d'énergie qui vont s'établir pour assurer la survie et la croissance du jeune lorsque les apports alimentaires sont insuffisants à certaines périodes de son élevage.

Chez le manchot royal, espèce semi-altriciale, la période d'élevage des poussins est très longue et se divise en deux phases de croissance séparées par une période de restriction alimentaire pendant les mois d'hiver. Dans ces deux études, nous nous sommes intéressés au développement du tissu musculaire des ceintures pectorale et pelvienne ainsi qu'à l'accrétion lipidique durant les deux premiers mois de vie du poussin. Au cours de cette période, la mise en place des mécanismes de thermorégulation et l'acquisition progressive de la marche sont de première

importance pour les poussins afin d'obtenir une première forme d'indépendance. Cependant, on peut se demander si le développement des muscles de la ceinture pectorale sera aussi rapide, comme cela a été mis en évidence chez d'autres espèces altriciales (Marsh et Wickler, 1982 ; Olson, 2001). En effet, le poussin ne va passer de l'état de marcheur à celui de nageur plongeur, (ce qui exige une musculature pectorale puissante), qu'un an plus tard. Auparavant, il aura dû subir une longue période de restriction alimentaire hivernale (Stonehouse, 1960 ; Barrat, 1976 ; Verrier, 2003), pendant laquelle le maintien d'une musculature importante a un coût énergétique élevé (Cherel *et al.*, 1993).

Finalement, le but de cette étude est de déterminer s'il existe une stratégie de croissance qui se met en place rapidement après la naissance du poussin en réponse aux contraintes environnementales auxquelles il sera confronté.

Nous avons ainsi étudié dans un premier temps la cinétique d'accrétion des protéines dans les muscles des membres antérieurs et postérieurs ainsi que la typologie des fibres d'un muscle de la ceinture pectorale (*Pectoralis major*) et deux muscles antagonistes de la ceinture pelvienne (*Gastrocnemius lateralis* et *Iliotibialis cranialis*) (étude 1.2). Puis, dans une seconde étude (étude 2.2) nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'expression des protéines contractiles (isoformes de chaîne lourde de myosine) dans ces différents muscles locomoteurs.

Méthodes

Prélèvements

Les tissus musculaires ont été prélevés sur des manchots royaux (poussins et adultes). Les échantillons destinés aux analyses de typologie en fibres et de la composition en chaîne lourde de myosine ont été réalisés dans la partie superficielle du muscle pour le *pectoralis major* et dans la partie médiane pour le *gastrocnemius lateralis* et l'*iliotibialis cranialis*.

Les muscles contralatéraux entiers de la ceinture pectorale (*pectoralis major, minor*, et *scapulohumeralis caudalis*) et de la ceinture pelvienne (en particulier *gastrocnemius lateralis* et *iliotibialis cranialis*) ont été disséqués. Par ailleurs, un échantillon de peau abdominale (avec le tissu adipeux sous-cutané adhérent) a été collecté pour chaque animal.

Méthodes utilisées

1) La concentration en protéines totales a été déterminée pour les muscles et la peau grâce à la méthode de Kjeldahl tandis que la teneur en lipides a été obtenue par la méthode gravimétrique de Folch. 2) La différenciation des types de fibres a été réalisée sur des coupes histologiques de muscles grâce à la mise en évidence de l'activité de la myosine-ATPase et la succinodéshydrogénase. 3) Les chaînes lourdes de myosine ont été séparées en fonction de leur masse moléculaire par électrophorèse SDS-PAGE.

Résultats

1.2 Développement différentiel des ceintures pectorales et pelviennes durant les deux premiers mois de croissance du poussin de manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*)

Le fait que les poussins soient émancipés a pu être déterminé grâce à l'aspect du duvet et aux observations sur le terrain. Les poussins de cette étude ont des indices staturaux (somme des tailles de l'aile, du tarse et du bec) ainsi que des masses corporelles semblables à ceux de poussins d'âge connu et nourris régulièrement par leurs parents (Verrier, 2003).

Les données ont été analysées par des régressions linéaires et les pentes de chaque droite ont été comparées par une analyse de variance (ANOVA à un facteur) suivi d'un test *post-hoc* de Holm-Sidak. Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les masses protéiques, l'indice d'adiposité et les données histoenzymologiques chez les poussins émancipés et les adultes. Le seuil de significativité est égal à 0,05.

Composition corporelle (Fig. 1)

L'indice d'adiposité (teneur en lipides/teneur en protéines de la peau) est positivement corrélée avec la masse corporelle des poussins ($R^2= 0,632$; $P< 0,001$; $y= 0,00106x + 0,559$) (Tableau 1). Cet indice augmente d'un facteur de 5 durant les deux premiers mois de vie du poussin et atteint chez les poussins émancipés une valeur qui n'est significativement pas différente de celle des adultes ($P= 0,935$) (Tableau 2). L'accrétion lipidique sous-cutanée est ainsi particulièrement élevée chez poussin entre l'éclosion et son émancipation. De plus, lorsque les poussins acquièrent leur émancipation thermique et locomotrice (terrestre uniquement), l'adiposité semble être similaire à celle des adultes.

Masse protéique

La masse protéique de la ceinture pectorale varie significativement avec la masse corporelle ($R^2 > 0,916$; $P < 0,001$; $y = 0,004x - 0,747$) et augmente d'environ 23 fois entre l'éclosion et l'émancipation du poussin (Tableau 1 et fig. 2). Dans la ceinture pectorale, la masse protéique relative du *pectoralis major* (Pec maj) diminue significativement en fonction de la masse corporelle des poussins ($R^2 = 0,443$; $P < 0,001$; $y = -0,00315x + 65,890$) (Fig. 3). Pour le *pectoralis minor* (Pec min) et le *scapulohuméralis caudalis* (Scap), la masse protéique relative augmente ($R^2 > 0,242$; $P < 0,001$; $y = 0,00155x + 26,758$ and $y = 0,00160x + 7,341$, respectivement) de manière similaire ($F = 0,0874$; $P < 0,05$) au cours des deux premiers mois après l'éclosion (Tableau 1 et fig. 3).

A l'émancipation du poussin, la masse protéique totale de la ceinture pectorale est significativement inférieure d'un facteur de 65 à celle des adultes ($P = 0,001$) (Tableau 2). Dans le groupe des adultes, la part de la masse protéique du Scap diminue significativement alors que celle du Pec maj augmente ($P = 0,001$). Concernant la masse protéique relative du Pec min aucune différence significative n'a été mise en évidence ($P = 0,418$) (Tableau 2).

Dans la ceinture pelvienne, l'accrétion protéique durant les deux premiers mois de vie du poussin est pratiquement deux fois plus rapide que celle dans la ceinture pectorale ($P < 0,0001$) (Fig. 2). Cependant, à l'émancipation du poussin, la masse protéique totale des muscles des pattes est significativement inférieure (d'un facteur de 3) à la valeur atteinte par le groupe adulte ($P = 0,001$). La masse protéique relative du *gastrocnémius latéralis* (GL) dans la ceinture pelvienne ne varie pas avec la masse corporelle des poussins ($R^2 = 0,0381$; $P = 0,170$) tandis que la proportion de l'*iliotibialis cranialis* (IC) diminue entre l'éclosion et l'émancipation du poussin ($R^2 = 0,221$; $P < 0,001$; $y = -0,00097x + 11,998$) (Tableau 1 et fig. 4)

Chez l'adulte, aucune différence significative concernant la part des deux muscles dans la ceinture pelvienne ($P= 0,105$) n'a été mise en évidence en comparaison avec les poussins émancipés (Tableau 2).

Histoenzymologie

Le typage des fibres et leurs analyses (proportion et morphométrie) ont été réalisés sur deux muscles de la ceinture pelvienne (*gastrocnémius latéralis* et *iliotibialis cranialis*) ainsi que sur un muscle de la ceinture pectorale (*pectoralis major*).

Concernant les muscles des pattes (*gastrocnémius latéralis* et *iliotibialis cranialis*), l'étude de la typologie en fibre nous a permis de mettre en évidence des fibres lentes (type SO) et rapides oxydo-glycolytique (type FOG) (Fig 5). La présence d'une population de fibres lentes ayant une grande résistance à la fatigue musculaire traduit un rôle dans le maintien de la posture (McFarland et Meyers, 2008).

Pour le *gastrocnémius latéralis* (GL), la proportion des fibres lentes varie en fonction de la masse corporelle des poussins ($R^2= 0,609$; $P= 0,003$; $y= -0,004x+ 17,231$) (Tableau 1). À l'éclosion, la proportion de ces fibres représente $15,0 \pm 2,4 \%$ et diminue pour atteindre environ $6,1 \pm 1,0\%$ à l'émancipation du poussin. Par contre, dans l'*iliotibialis cranialis* (IC), la part des fibres lentes ne varie pas au cours des deux premiers mois de vie du poussin ($R^2= 0,302$; $P= 0,196$) et représente en moyenne $7,1 \pm 0,8\%$. L'aire de la section transversale des fibres musculaires (rapide et lente) des deux muscles étudiés augmente en fonction de la masse corporelle du poussin (Tableau 1). Cependant, la vitesse de croissance des fibres FOG est significativement plus rapide que celle des fibres SO pour le GL (4 fois ; $P= 0,010$) et pour l'IC (1,5 fois ; $P= 0,007$).

Chez les poussins émancipés, la taille moyenne des fibres musculaires (rapide et lente) est significativement inférieure à celle des adultes ($P \leq 0,010$), et cela pour les deux muscles de la

ceinture pelvienne. Cependant, la proportion des fibres lentes n'y est pas différente ($P > 0,174$) (tableau 2).

Le *pectoralis major* (Pec maj) semble être entièrement constitué de fibres rapides de type oxydolytique (FOG) chez les poussins et les adultes (Figure 5). Cette composition en fibres qui se retrouve également chez d'autres espèces sauvages telles que le pic flamboyant (*Colaptes auratus*) et le martin pêcheur d'Amérique (*Megasceryle alcyon*) (Rosser *et al.*, 1996), correspond généralement à un type de locomotion sollicitant le muscle de manière soutenue et prolongée (Rosser *et al.*, 1996).

L'aire de la section transversale des fibres rapides varie en fonction de la masse corporelle du poussin ($R^2 = 0,907$; $P < 0,001$; $y = 0,052x + 0472$) et augmente de $19,8 \pm 2,4 \mu\text{m}^2$ à l'éclosion à $154,5 \pm 25,2 \mu\text{m}^2$ pour les poussins émancipés (Figure 6). Cependant, la vitesse de croissance des fibres rapides du muscle pectoral est significativement inférieure (facteur 2) à celle des muscles des pattes ($P < 0.006$) (tableau 1).

Chez les adultes, les aires moyennes des fibres rapides sont significativement plus grandes (18 fois) que celle des poussins pratiquant une locomotion exclusivement terrestre ($P = 0.010$) (Tableau 2).

Finalement, l'ensemble de ces résultats nous indique que durant les deux premiers mois de vie du poussin, les muscles de la ceinture pelvienne se développent plus rapidement que ceux de la ceinture pectorale. Ainsi, à l'émancipation du poussin, les muscles des pattes ont un degré de développement plus avancé que les muscles pectoraux. Cependant, comparé aux adultes, l'ensemble des muscles locomoteurs n'a pas encore atteint un stade de pleine maturité.

Tableau 1: Équations linéaires ($y = b + ax$) décrivant la croissance du poussin de manchot royal pendant les deux premiers mois de vie post-natale. Les pentes sont indiquées \pm erreur standard. Une différence significative entre les pentes est indiquée par des lettres différentes en exposant.

| Mesures | Structures | b | a | \pm SE | R ² | P | n |
|------------------------------|------------------|----------------------|-----------------------|----------|----------------|---------|----|
| Indice d'adiposité | Peau | 0,559 | 0,0011 | 0,0001 | 0,632 | <0,001 | 51 |
| Masse protéique totale (g) | Ceint. pectorale | -0,747 | 0,0044 ^a | 0,0002 | 0,916 | <0,001 | 51 |
| | Ceint. pelvienne | -3,763 | 0,0232 ^b | 0,0001 | 0,948 | <0,001 | 51 |
| Masse protéique relative (%) | Ceint pect | | | | | | |
| | Pec maj | 65,890 | - 0,0032 ^a | 0,0005 | 0,443 | <0,001 | 51 |
| | Pec min | 26,758 | 0,0016 ^b | 0,0004 | 0,242 | <0,001 | 51 |
| | Scap | 7,341 | 0,0016 ^b | 0,0003 | 0,385 | <0,001 | 51 |
| | Ceint pelv | | | | | | |
| | GL | 3,970 | 0,0001 ^c | 0,0001 | 0,0038 | P=0,170 | 51 |
| IC | 11,998 | -0,0009 ^d | 0,0003 | 0,221 | <0,001 | 51 | |

| | | | | | | | |
|--|---------|---------------------|----------------------|--------|--------|---------|----|
| Proportion des fibres lentes (%) | GL | 17,231 | -0.0040 ^a | 0,0001 | 0,609 | P=0,003 | 27 |
| | IC | 8,115 | -0,0006 ^b | 0,0007 | 0,302 | P=0,196 | 27 |
| Aire des sections transversale (μm^2) | Pec maj | | | | | | |
| | FOG | 0,472 | 0,0517 ^a | 0,0048 | 0,822 | <0,001 | 27 |
| | GL | | | | | | |
| | FOG | -42,183 | 0,5301 ^b | 0,0368 | 0,893 | <0,001 | 27 |
| | SO | 45,167 | 0,2920 ^c | 0,0254 | 0,840 | <0,001 | 27 |
| | IC | | | | | | |
| FOG | 125,697 | 0,4753 ^b | 0,0425 | 0,833 | <0,001 | 27 | |
| SO | 172,286 | 0,1540 ^c | 0,0200 | 0,702 | <0,001 | 27 | |

Tableau 2 : Comparaison des différents paramètres entre les poussins émancipés (n=7) et les adultes (n=8). Une différence significative (P< 0,05) entre les deux groupes est indiquée par des lettres différentes en exposant.

| | Structures | Poussins émancipés | Adultes |
|--|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Indice d'adiposité | Peau | 3,5 ± 0,4 ^a | 3,6 ± 0,5 ^a |
| Masse protéique totale (g) | Ceint. pectorale | 11,7 ± 1,8 ^a | 757,8 ± 34,9 ^b |
| | Ceint. pelvienne | 59,9 ± 6,9 ^c | 188,8 ± 8,8 ^d |
| Masse protéique relative (%) | Ceint pect | | |
| | Pec maj | 58,2 ± 0,8 ^a | 63,3 ± 0,7 ^b |
| | Pec min | 30,5 ± 0,7 ^c | 31,6 ± 0,7 ^c |
| | Scap | 11,3 ± 0,3 ^d | 5,1 ± 0,3 ^e |
| | Ceint pelv | | |
| | GL | 4,2 ± 0,2 ^f | 4,5 ± 0,2 ^f |
| IC | 10,0 ± 0,5 ^g | 10,6 ± 0,4 ^g | |
| Proportion des fibres lentes (%) | GL | 6,1 ± 0,5 | 5,3 ± 0,9 |
| | IC | 5,9 ± 1,2 | 4,0 ± 0,6 |
| Aire des sections transversales (µm ²) | Pec maj | | |
| | FOG | 154,5 ± 25,2 ^a | 2588,3 ± 268,2 ^b |
| | GL | | |
| | FOG | 1405,4 ± 286,8 ^c | 2625,0 ± 203,7 ^b |
| | SO | 769,2 ± 202,5 ^d | 2467,2 ± 354,6 ^b |
| | IC | | |
| FOG | 1511,6 ± 250,9 ^{c,e} | 3005,2 ± 342,6 ^f | |
| SO | 636,2 ± 124,6 ^d | 2277,0 ± 398,8 ^b | |

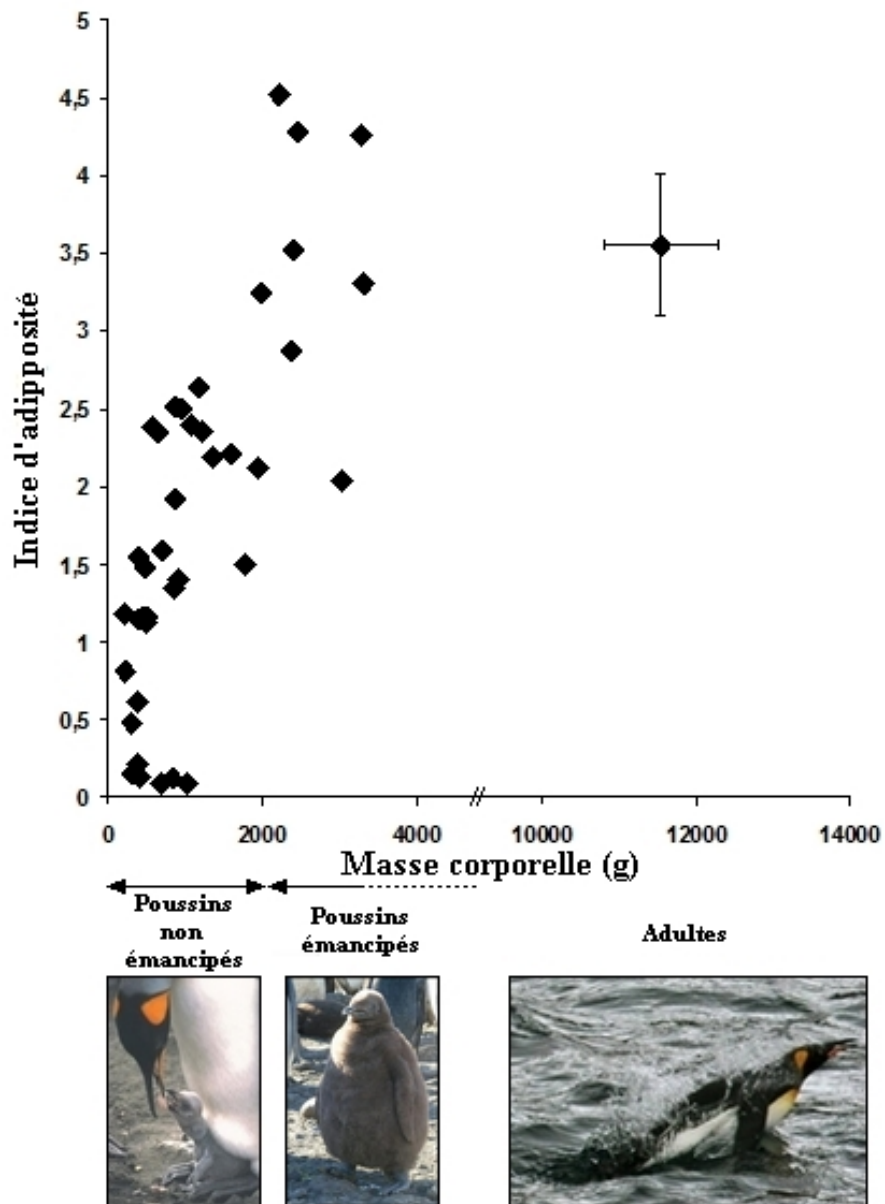


Figure 1 : Indice d'adiposité (masse lipidique/masse protéique de la peau) en fonction de la masse corporelle (g) des poussins au cours de leurs premiers mois de vie et chez les adultes (\pm l'erreur standard)

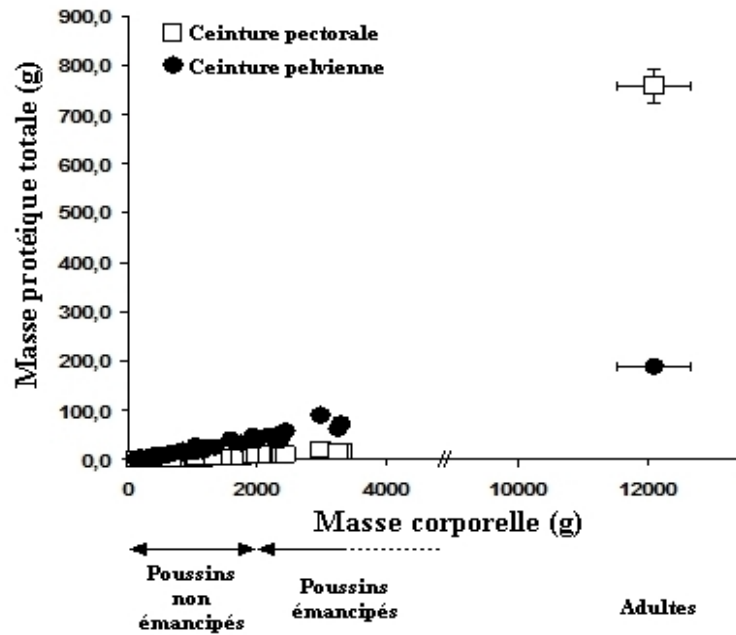


Figure 2 : Evolution de la masse protéique totale (g) des ceintures pectorale et pelvienne en fonction de la masse corporelle (g) des poussins au cours de leurs premiers mois de vie et chez les adultes (\pm l'erreur standard).

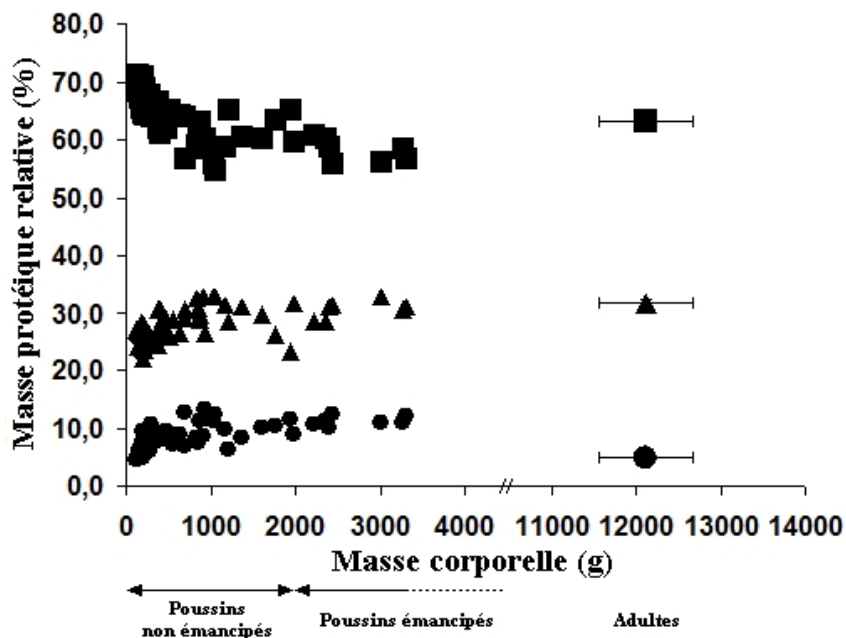


Figure 3 : Évolution de la masse protéique relative (%) du *pectoralis major* (■), *pectoralis minor* (▲) et *scapulohumeralis caudalis* (●) dans la ceinture pectorale en fonction de la masse corporelle (g) des poussins au cours de leurs premiers mois de vie et chez les adultes (\pm l'erreur standard).

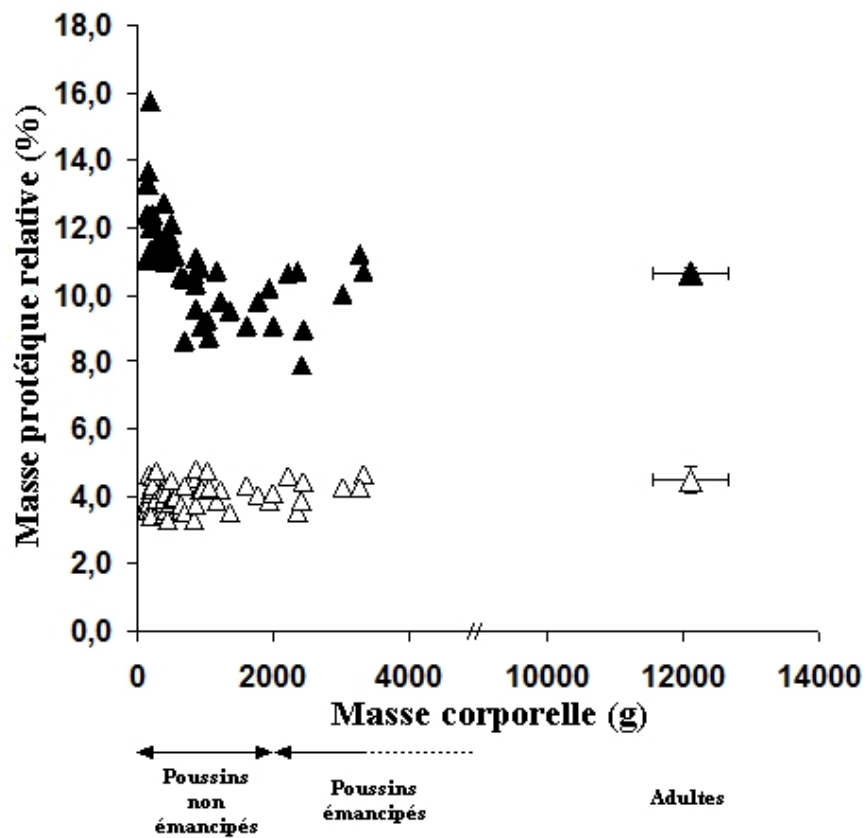


Figure 4 : Évolution de la masse protéique relative (%) de l'iliotibialis cranialis (▲) et du gastrocnémius latéralis (Δ) dans la ceinture pelvienne en fonction de la masse corporelle (g) des poussins au cours de leurs premiers mois de vie et chez les adultes (\pm l'erreur standard).

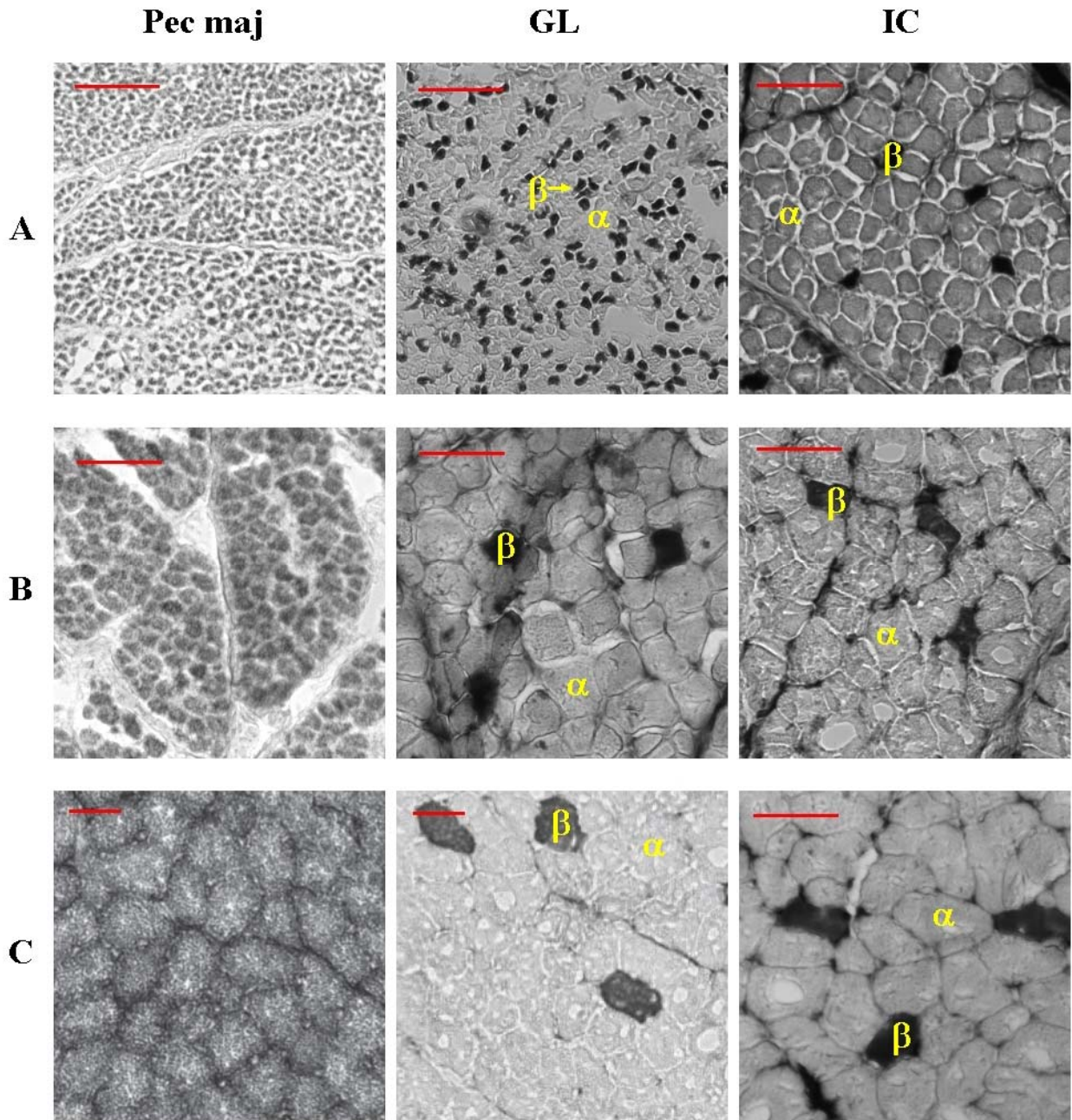


Figure 5 : Coupes transversales du *pectoralis major* (Pec maj) coloré pour la mise en évidence de la succino-déshydrogenase (coloration des fibres oxydatives) ainsi que du *gastrocnémius latéralis* (GL) et de l'*iliotibialis cranialis* (IC) colorés pour la mise en évidence de l'activité ATPasique avec préincubation acide (coloration des fibres lentes) de poussins non émancipés (A), émancipés (B) et d'adultes (C)

α : fibres rapides (FOG) ; β : fibres lentes (SO). Barre = 50 μm .

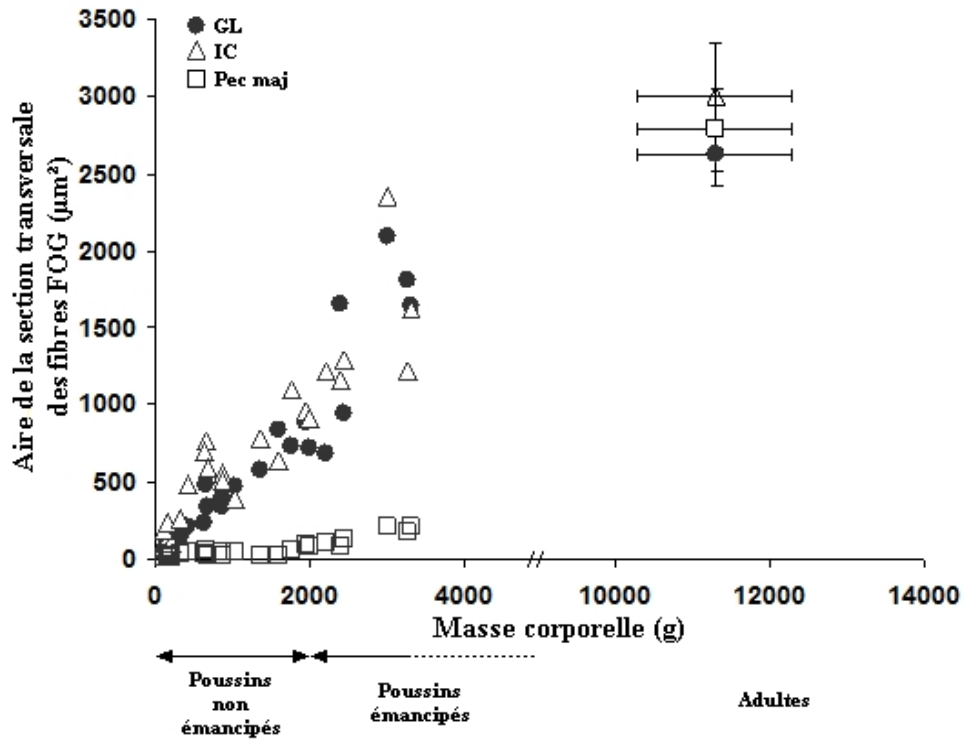


Figure 6 : Évolution de l'aire de la section transversale des fibres rapides de type FOG (μm^2) de l'*iliotibialis cranialis* (Δ), du *gastrocnémius latéralis* (\bullet) et du *pectoralis major* (\square) de la masse corporelle (g) des poussins et chez les adultes (\pm l'erreur standard).

2.2 - Differential muscular myosin heavy chain expression of the pectoral and pelvic girdles during early growth in the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) chick. (Article publié dans *The Journal of Experimental Biology*, février 2011, volume 214, 1829-1835).

RESEARCH ARTICLE

Differential muscular myosin heavy chain expression of the pectoral and pelvic girdles during early growth in the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) chick

Aude Erbrech^{1,2,*}, Jean-Patrice Robin^{1,2}, Nathalie Guérin^{1,2}, René Groscolas^{1,2}, Caroline Gilbert^{1,2,3} and Jean-Marc Martrette³

¹Université de Strasbourg, IPHC, 23 rue Becquerel 67087 Strasbourg, France, ²CNRS, UMR7178, 67037 Strasbourg, France and ³Nancy–Université, Faculté des Sciences et techniques, bp239 Bld des Aiguillettes 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

*Author for correspondence (aude.erbrech@iphc.cnrs.fr)

Accepted 2 February 2011

SUMMARY

Continuous growth, associated with a steady parental food supply, is a general pattern in offspring development. So that young chicks can acquire their locomotor independence, this period is usually marked by a fast maturation of muscles, during which different myosin heavy chain (MyHC) isoforms are expressed. However, parental food provisioning may fluctuate seasonally, and offspring therefore face a challenge to ensure the necessary maturation of their tissues when energy is limited. To address this trade-off we investigated muscle maturation in both the pectoral and pelvic girdles of king penguin chicks. This species has an exceptionally long rearing period (1 year), which is prolonged when parental food provisioning is drastically reduced during the sub-Antarctic winter. Approximately 1 month post hatching, chicks acquire a functional pedestrian locomotion, which uses pelvic muscles, whereas swimming, which uses the pectoral muscles, only occurs 1 year later. We therefore tested the hypothesis that the MyHC content of the leg muscles reaches a mature state before those of the pectoral muscles. We found that leg muscle MyHC composition changed with the progressive acquisition of pedestrian locomotion, whereas pectoral muscle fibres reached their mature MyHC profile as early as hatching. Contrary to our predictions, the acquisition of the adult profile in pectoral muscles could be related to an early maturation of the contractile muscular proteins, presumably associated with early thermoregulatory capacities of chicks, necessary for survival in their cold environment. This differential maturation appears to reconcile both the locomotor and environmental constraints of king penguin chicks during growth.

Key words: development, bird, king penguin, skeletal muscle, myosin heavy chain.

INTRODUCTION

During growth, individuals have to develop capacities such as thermoregulation or locomotion in order to rapidly acquire their independence. A fast post-embryonic development is necessary, linked to the maturation of muscles and skeleton (Ricklefs, 1979; Olson, 2001; de Margerie et al., 2004). However, in birds, muscle growth rates differ between altricial and precocial species (Hohtola and Visser, 1998), in relation to variation in the degree of tissue maturation at hatching (Nice, 1962; Ricklefs, 1979; Starck and Ricklefs, 1998). In precocial species, the early development of the pelvic girdle and the delayed maturation of pectoral muscles allow young birds to perform pedestrian locomotion quickly after hatching but before acquiring flight capability (Starck and Ricklefs, 1998; Phillips and Hamer, 2000; Bennett, 2008). In contrast, offspring of altricial species are totally reliant on parental care and the leg and pectoral muscles are not well developed at hatching; they acquire terrestrial and aerial locomotion before fledging (Olson, 2001). As development and maturation of different organs and tissues are energetically costly, growth is generally associated with a steady parental food supply (Ricklefs, 1979). However, when the rearing period is long, parental food supply may show seasonal fluctuation (Cherel et al., 1993) and become a growth-limiting factor (Heath and Randall, 1985). Hence, during growth chicks may face periods of low food availability that can delay their development (Schew and Ricklefs,

1998). In this context, the specific strategies of energy allocation that are developed to ensure future survival and fledging of the offspring are not fully understood.

We addressed this question in the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) chick, a semi-altricial species showing an exceptionally long rearing cycle (~1 year) in the sub-Antarctic and interrupted by a period of severe food restriction during the two to three winter months (Stonehouse, 1960; Barrat, 1976). At hatching in summer, the chick totally depends on its parents for warmth and food. When 1 month old, thermogenic processes become sufficiently mature and chicks are then able to walk. Parents continue to forage intensively at sea to allow them to store sufficient body reserves before winter. From May to August, chicks mainly rely on their fat stores as an energy source and can lose half of their body mass and stop growing (Stonehouse, 1960; Barré, 1978). From September onwards, parental feeding rate increases allowing chicks to grow and moult before departing to sea and becoming independent (Barrat, 1976). The locomotor capacity and activity of the king penguin chick continuously changes throughout its growth until its independence. During the first weeks after hatching, chicks remain hidden in the parental brood patch and show limited locomotor activity. At 1 month old they use exclusively pedestrian locomotion. One year later, king penguin chicks switch from an exclusively terrestrial locomotion to a mixed terrestrial and aquatic locomotion. During their aquatic life, muscles of the pectoral girdle power the flippers,

which allows them to forage and dive to depths of 200–300 m (Barrat, 1976). In this way, the king penguin chick, with this distinctive growth cycle, is a useful model to investigate the impact of environmental conditions on skeletal muscle development.

In birds, each mode of locomotion (flapping flight, aquatic propulsion or terrestrial locomotion) and postural maintenance corresponds to different metabolic and contractile properties of muscles that are determined by their fibre types (Torrella et al., 1998). Fast-twitch oxidative-glycolytic (FOG) fibres provide a sustained rapid contraction, whereas fast-twitch glycolytic (FG) fibres contract more powerfully and fatigue rapidly (Sokoloff et al., 1998). In contrast, slow fibres are adapted for slow sustained contraction and are therefore numerous in postural muscles (Meyers and Mathias, 1997). In addition to the activities of their energy-generating enzymes, contractile properties of the muscle fibres also depend on their myosin heavy chain (MyHC) isoforms (Rosser et al., 1996). During muscular growth, a sequence of different MyHC isoforms is expressed in each avian fibre type (Bandman and Rosser, 2000) as shown in the FG fibres of gallineous birds such as the chicken (*Gallus gallus*) (Hofmann et al., 1988; Tidyman et al., 1997), the turkey (*Meleagris gallopavo*) (Maruyama et al., 1993) or the Japanese quail (*Coturnix japonica*) (Merrifield et al., 1989). Moreover, a differential expression of MyHC isoforms in the FOG and FG fibres during development of the pectoral muscle has been demonstrated in the domestic pigeon (*Columba livia*) (Rosser et al., 1998). Effective muscular contractions need an optimal myofibrillar ATPase activity, which has been related to myosin heavy chain composition (Rivero et al., 1996). Moreover, recent studies on king penguin chicks indicate that the developmental pattern of muscles and bones in the pectoral and pelvic limb are markedly different during the first weeks after hatching. High rates of periosteal bone tissue growth (de Margerie et al., 2004) and protein accretion (Erbrech et al., 2008) in the pelvic muscles allow nestlings to rapidly acquire an effective pedestrian locomotion that is essential for their survival. Conversely, the development of the pectoral girdle, which is required for aquatic locomotion, is delayed. Together with the acquisition of locomotion, muscular development has also been shown to be of a major importance in the ontogeny of thermogenic processes in penguin chicks (Duchamp et al., 2002).

In the present work, we therefore focused on muscle development during the first 2 months of growth of king penguin chicks, i.e. from hatching to the period when pedestrian locomotion and thermoregulation capacities are sufficiently developed. To validate the MyHC composition in king penguin muscles we first compared MyHC isoforms with those of the domestic chicken (*Gallus gallus*). Then, we tested the hypothesis that muscles of the pelvic girdle (gastrocnemius lateralis and iliotibialis cranialis) reach a mature state in their MyHC content before the pectoral girdle (pectoralis major), given that chicks acquire terrestrial locomotion far in advance of aquatic locomotion.

MATERIALS AND METHODS

Study area and specimens

Fieldwork was conducted in the Baie du Marin, Possession Island, Crozet Archipelago (46°26'S, 51°52'E; Indian Ocean) during the sub-Antarctic summer, from January to April 2006. Approximately 25,000 breeding pairs of king penguins are habituated to human presence because of its proximity to the Alfred Faure Scientific Station. The study protocol was approved by the French Ethic Committee of the Institut Polaire Paul-Emile Victor (IPEV) and by the Polar Environment Committee of the Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF).

During daily surveys in the breeding colony, eggs with embryos close to hatching ($N=4$), chicks ($N=25$) and adult ($N=5$) king penguins (*Aptenodytes patagonicus* Miller, JF 1778) were collected immediately after being stolen and/or killed by predators [sub-Antarctic skuas (*Catharacta lombergi*) for eggs and chicks, or giant petrels (*Macronectes* sp.) for chicks and adults]. In a shelter close to the colony, embryos and birds were weighed to the nearest 0.1 or 1 g, depending on their absolute body mass. Within minutes after death, muscle samples from the pelvic and pectoral girdles were excised (~200 mg) and kept in crushed ice (less than 4 h) until myosin extraction. The length (accuracy ± 0.5 mm) of the beak, foot and flipper was measured according to Stonehouse and the age of the embryo was determined from flipper length (Stonehouse, 1960). Chick age was estimated according to the appearance of the down body mass and behaviour (Verrier, 2003). Seven developmental stages were examined: six for chicks, and the adult (Table 1). To limit the impact of the experiments on the predator populations, the remaining parts of the carcasses were returned to the colony.

Muscle sampling

Three muscles were selected for the study: the pectoralis major (PM) from the pectoral girdle, which is involved in aquatic locomotion, the gastrocnemius lateralis (GL), and the iliotibialis cranialis (ITC) from the pelvic girdle, which is essential for pedestrian locomotion. The PM inserts on the deltoid crest of the humerus (George and Berger, 1966) and is recruited for the movement of flippers, allowing propulsion underwater. The ITC arises from the anterior iliac crest and inserts on the patellar ligament (George and Berger, 1966). It is recruited for hip flexion and knee extension (Smith et al., 2006). The GL takes its origin on the proximal surface of the fibular condyle of the femur and ends on the most lateral part of the tendo achillis (George and Berger, 1966). This muscle is mainly recruited for ankle extension and knee flexion (Smith et al., 2006).

Myosin extraction and electrophoresis of MyHC analysis

Each muscle sample was weighed (± 0.1 mg) and myosin was extracted in a specific high ionic strength buffer according to the method of D'Albis et al. (D'Albis et al., 1979). The extracts were kept at -80°C until analysis. Protein concentrations in the extracts were determined using the method described by Bradford (Bradford, 1976). Isoform separations were performed according to the method of Talmadge and Roy (Talmadge and Roy, 1993). The stacking and separating gels were respectively composed of 4% and 8% acrylamide-*N,N'*-methylene-bis-acrylamide (bis; 50:1). Mini-gels (0.75 mm thickness) were used in the Bio-Rad (Hercules, CA, USA) Mini-protein II Dual Slab Cell. Electrophoresis were carried out at a constant 70 V for 28 h in a cold room ($+4^{\circ}\text{C}$). The amount of protein run on the gel was approximately 5 μg of total protein per lane. The gels were stained with Coomassie Blue R-250. The relative amounts of the different MyHC isoforms were measured using a Bio-Rad GS-800 integration densitometer, and the results analysed with the Quantity one 4.2.1 Program (Hercules, CA, USA). Only bands representing more than 1% of total MyHC were taken into account. Moreover, muscle samples obtained from an adult chicken (*Gallus gallus*) were used to compare the composition in MyHC isoforms of this species with that of adult king penguins, and to validate our extraction procedure.

Statistical analysis

Results are given as means \pm s.e.m. Multiple comparisons were made using non-parametric Kruskal-Wallis ANOVAs, followed by

Table 1. Muscle sampling schedule of king penguin chicks in relation to age, thermoregulatory capacity, locomotor activity and plumage (following Barrat, 1976; Stonehouse, 1960; Verrier, 2003)

| Developmental stage | Age | Body mass range | Thermoregulatory capacity | Locomotor activity | Plumage |
|---------------------|--------------------------------------|-----------------|----------------------------|--|-------------|
| Chick | | | | | |
| Stage A | Embryonic <1 week before hatching | 125–160 g | | | Unfeathered |
| Stage B | Post hatching 1–3 days | <300 g | Heterotherm activity | Brooding phase: no locomotor | Unfeathered |
| Stage C | 6–7 days | 300–500 g | Acquisition of homeothermy | Brooding phase: no locomotor activity | Brown down |
| Stage D | 7–15 days | 0.5–1 kg | Homeotherm | Chicks sitting upright in front of their parent | Brown down |
| Stage E | 3–4 weeks | 1–2 kg | Homeotherm | End of brooding phase: chicks begin to move away from adults | Brown down |
| Stage F | 1–2 months | 2–3 kg | Homeotherm | Terrestrial locomotion: emancipated chicks wander alone on the colony | Brown down |
| Adult | | | | | |
| | >4 years | 10–12 kg | Homeotherm | Aquatic locomotion: adults forage at sea and come on land to moult and breed | Feathers |

Dunn's *post hoc* tests. Relative percentages were analysed after transformation to arcsin square roots. All statistical analyses were carried out using Statview 5.0. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Validation of the extraction procedure Pectoralis major

A single MyHC isoform was detected in the PM from both the domestic chicken and the adult king penguin (Fig. 1). However, the PM isoform of the king penguin had a lower mobility than that of the domestic chicken.

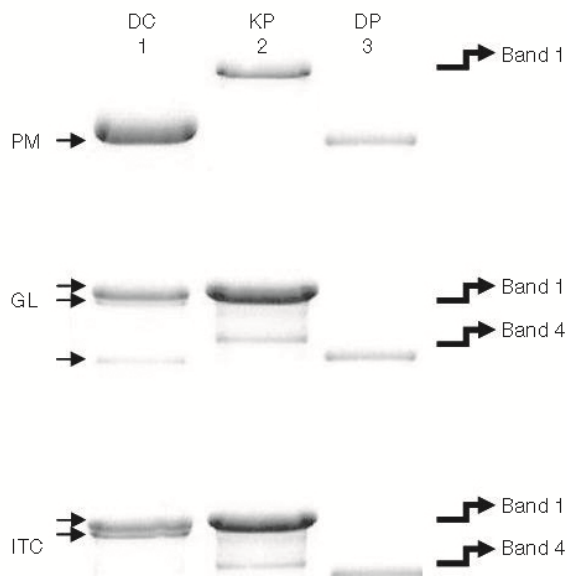


Fig. 1. Electrophoretic mobilities of myosin heavy chain (MyHC) isoforms found in pectoralis major (PM), gastrocnemius lateralis (GL) and iliotibialis cranialis (ITC) in the domestic chicken (DC, lane 1) and the king penguin (KP, lane 2). Lane 3 (DP) shows the mobility of porcine MyHC of a standard molecular mass (200 kDa) (Laemmli, 1970).

Gastrocnemius lateralis

The GL of the adult king penguin contained two MyHC isoforms (Fig. 1, bands 1 and 4), whereas three isoforms were detected in the domestic chicken. The slowest moving isoform in the two species had similar electrophoretic mobilities whereas the other MyHC isoforms all had different mobilities.

Iliotibialis cranialis

Two MyHC isoforms were present in the adult king penguin (Fig. 1, bands 1 and 4) and in the domestic chicken ITC samples. The slowest moving isoform in the two species had similar electrophoretic mobilities, but the second isoform from the chicken had a lower mobility than band 4 in the king penguin.

These results of isoform separations from PM and GL muscles in the domestic chicken are in accordance with previous studies that used immunoblotting and gene expression analyses (Hofmann et al., 1988; Tidyman et al., 1997), therefore validating our extraction protocol.

Differential foot and flipper growth in king penguin chicks

The foot and flipper lengths of king penguin chicks significantly increased during the first two months post hatching ($P \leq 0.001$; Fig. 2). From stages A to F (within the first week of growth), they increased from 44.1 ± 1.9 and 49.4 ± 0.4 mm to 117.5 ± 4.5 and 117.6 ± 7.8 mm, respectively. In emancipated chicks (stage F), feet and flippers had reached 76.2% and 43.1% of their adult size, respectively.

Developmental expression of MyHC isoforms in the pelvic and pectoral girdles of king penguin chicks

A total of six different MyHC isoforms could be detected (Fig. 3). They were labelled as bands 1–6 according to their electrophoretic mobilities: bands 1 and 6 were, respectively, the slowest and the fastest migrating isoforms. However, only four MyHC isoforms (bands 1, 3, 4 and 6) that were more than 1% of the total MyHC, could be detected by the densitometric analysis. We therefore focused on these four isoforms (Fig. 3, Table 2).

Developmental expression of MyHCs in PM

The band 1 isoform was present in PM at growth stages A to F and in adults (Fig. 3). The band 3 isoform was only detected ($5.6 \pm 1.7\%$) at stage E (3- to 4-week-old chicks; Table 2).

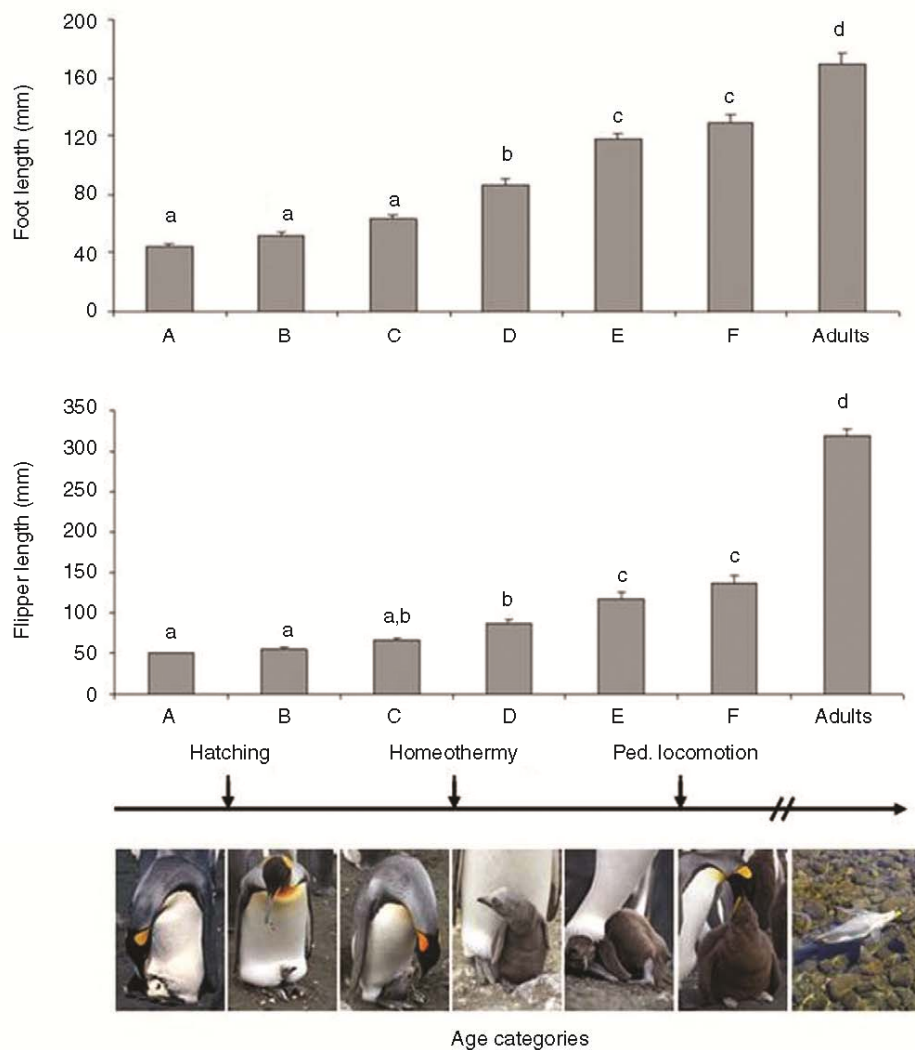


Fig. 2. Mean lengths (mm; \pm s.e.m.) of the foot and flipper of chicks for the different age categories (A, <1 week before hatching; B, 1–3 days; C, 6–7 days; D, 7–15 days; E, 3–4 weeks; F, 1–2 months) and of adults. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences between categories ($P < 0.05$).

Developmental expression of MyHCs in GL
 From stage A to D (up to 2-week-old chicks), the expression of three isoforms (bands 1, 4 and 6) was observed in the GL muscle (Fig. 3). Band 1 was the predominant isoform and its relative percentage (67–76%) did not vary significantly within this period ($P = 0.100$; Table 2). The relative percentages of bands 4 and 6 were lower than band 1, and did not change significantly from stage A to C ($P = 0.087$ and 0.350 , respectively). At stage D (1- to 2-week-old chicks), the expression of the band 4 isoform was similar to that at stage A, whereas band 6 had decreased significantly ($P = 0.001$; Fig. 3, Table 2).

At stages E and F (3- to 4-week-old and 1- to 2-month-old chicks), only bands 1 and 4 were detected. Their relative percentages were similar to those of the adult group ($P > 0.195$). However, when the chicks were 1 to 2 months old, the band 1 isoform increased and reached its highest level ($92.9 \pm 2.5\%$), but the variations in band 4 were not significantly different.

Developmental expression of MyHC isoforms in ITC
 At stages A and B (1 week before hatching and 3 days post hatching), three MyHC isoforms (bands 1, 4 and 6) were detected in the ITC muscle (Fig. 3). Band 1 was the predominant isoform ($\sim 72\%$), while the relative proportions of bands 4 and 6 were lower (12–16%; Table 2).

At stage C (6 to 7 days old), the band 3 was detected ($16.2 \pm 4.7\%$; Fig. 3, Table 2). The relative contribution of bands 1 and 4 were not significantly different from the previous two stages ($P > 0.118$), but band 6 decreased significantly, by 1.6-fold in stage C compared with stages A and B ($P = 0.002$; Table 2).

From stages D to F (1 week to 2 months old), bands 1 and 3 did not change significantly ($P > 0.359$) whereas bands 4 and 6 disappeared (Table 2).

In the adult group, the contribution of band 1 did not vary significantly compared with the chick groups ($P = 0.380$). Band 4 was present in adults but its expression ($16.9 \pm 0.7\%$) was not significantly different from stages A–C (up to 1-week-old chicks; Table 2).

DISCUSSION

During the early life of king penguin chicks, their feet and flippers increased in size and reached respectively 76.2% and 43.1% of their average adult size at 2 months of age. At the end of the first period of growth, feet practically reached their adult size, whereas flippers reach their adult length later, at the end of the fledging period (Cherel et al., 2004). In parallel, it has been shown (de Margerie et al., 2004) that the pelvic girdle of king penguin chicks has the highest bone tissue growth rate during the first month after hatching. The fast structural development of the lower limb thus allows chicks to

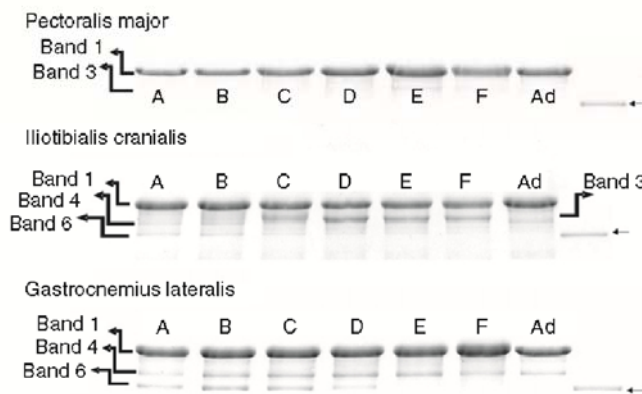


Fig. 3. Myosin heavy chain isoforms of the three different muscles: pectoralis major, gastrocnemius lateralis and iliotibialis cranialis, of king penguin chicks at different ages and adults identified by SDS-PAGE. A, <1 week before hatching; B, 1–3 days; C, 6–7 days; D, 7–15 days; E, 3–4 weeks; F, 1–2 months; Ad, adults. Small arrows indicate porcine myosin heavy chain of a standard molecular mass (200 kDa) (Laemmli, 1970).

rapidly acquire a bipedal posture and pedestrian locomotion (Verrier, 2003). The survival of chicks at the beginning of emancipation is indeed linked to their ability to escape predators and to chase their parents for food when they return from foraging trips.

Considering the PM, two isoforms could be detected from hatching to the full emancipation of king penguin chicks. Band 1

was the predominant isoform at each stage, whereas band 3 only appeared with a low relative percentage in chicks aged 3 to 4 weeks old. These results differ from those of the domestic chicken, in which five MyHC isoforms have been detected in the developing pectoral muscle (Tidyman et al., 1997): three embryonic MyHC isoforms are supplanted after hatching by a neonatal isoform that is in turn replaced by an adult isoform. In the domestic chicken, the PM has been reported to contain almost all FG fibres (Rosser et al., 1996); whereas only FOG fibres were found in king penguin chicks PM (A.E., R.G. and J.-P.R., unpublished data). As these two fibre types are linked to the expression of different MyHC isoforms during development (Rosser et al., 1996) the variation in MyHC content between chicken and king penguins could result from differences in the composition of the fibre types in this muscle. Surprisingly, muscle fibres of the PM of king penguin chicks expressed a MyHC profile similar to adults as early as hatching. This result reveals an early maturation of the PM contractile proteins, although in king penguin chicks of 3 to 4 weeks old, the cross-sectional area of the fast-twitch fibres is 30 times lower than in adults (Erbrecht et al., 2008). These results are in contrast to those from the domestic pigeon (Rosser et al., 1998), in which PM fibres reach their adult MyHC composition and adult size after fledging. Because fibre size is a major determinant for the production of the mechanical force essential to locomotor activity (Olson, 2001), we suggest that despite the PM of king penguin chicks expressing a mature MyHC profile, its muscle fibres have not yet acquired the morphological characteristics necessary for the development of an efficient locomotor activity. Thus, in king penguin chicks, the delayed development of PM fibres compared with those of the leg muscles

Table 2. Percentage distribution of myosin heavy chain (MyHC) isoforms in three muscles (pectoralis major, gastrocnemius lateralis, iliotibialis cranialis) of king penguin chicks from hatching to emancipation

| Muscle | Developmental stage | MyHC isoforms | | | | N |
|-------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|---|
| | | Band 1 | Band 3 | Band 4 | Band 6 | |
| Pectoralis major | Stage A | 100.0 | ND | ND | ND | 4 |
| | Stage B | 100.0 | ND | ND | ND | 5 |
| | Stage C | 100.0 | ND | ND | ND | 2 |
| | Stage D* | 100.0 | ND | ND | ND | 7 |
| | Stage E | 94.4±1.7 | 5.6±1.7 | ND | ND | 6 |
| | Stage F† | 100.0 | ND | ND | ND | 4 |
| | Adults | 100.0 | ND | ND | ND | 5 |
| Gastrocnemius lateralis | Stage A | 67.0±3.5 ^a | ND | 15.9±1.5 ^a | 17.1±2.1 ^a | 4 |
| | Stage B | 72.5±1.5 ^{a,b} | ND | 14.0±0.7 ^a | 13.5±1.1 ^{a,b} | 5 |
| | Stage C | 67.1±1.9 ^a | ND | 18.3±1.0 ^a | 14.6±1.2 ^{a,b} | 3 |
| | Stage D* | 75.6±2.6 ^{a,b} | ND | 17.4±1.1 ^a | 7.1±1.8 ^b | 7 |
| | Stage E | 84.9±2.4 ^{b,c} | ND | 15.1±2.4 ^a | ND | 5 |
| | Stage F† | 92.9±2.5 ^c | ND | 7.1±2.5 ^a | ND | 4 |
| | Adults | 90.0±4.2 ^c | ND | 10.0±4.2 ^a | ND | 5 |
| Iliotibialis cranialis | Stage A | 71.9±5.1 ^a | ND | 12.4±4.4 ^a | 15.7±1.3 ^a | 4 |
| | Stage B | 72.5±1.6 ^a | ND | 15.0±1.0 ^a | 12.5±0.7 ^a | 4 |
| | Stage C | 69.5±2.1 ^a | 16.2±4.7 ^a | 6.4±3.2 ^a | 7.9±0.3 ^b | 3 |
| | Stage D* | 69.9±6.1 ^a | 30.1±6.1 ^a | ND | ND | 7 |
| | Stage E | 77.5±3.5 ^a | 22.5±3.5 ^a | ND | ND | 6 |
| | Stage F† | 76.4±1.8 ^a | 23.6±1.8 ^a | ND | ND | 4 |
| | Adults | 83.1±0.7 ^a | ND | 16.9±0.7 ^a | ND | 4 |

Stages: A, <1 week before hatching; B, 1–3 days; C, 6–7 days; D, 7–15 days; E, 3–4 weeks; F, 1–2 months.

*Start of homeothermy; †start of pedestrian locomotion.

ND: not detected.

Values are mean percentages of total myosin heavy chain, ± s.e.m.

For a given muscle and MyHC band, different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

(Erbrech et al., 2008) is not linked to the MyHC isoform type content.

In the pelvic girdle, we revealed a MyHC polymorphism in the GL and ITC muscles of king penguin chicks, from hatching to approximately 2 weeks of age. The composition of MyHC isoforms differentially changed in the GL and ITC with the progressive acquisition of terrestrial locomotion, in agreement with the fact that contractile activity is essential for the maturation of avian skeletal muscle fibres (Bandman and Rosser, 2000). Changes in the activity of muscle fibres are indeed linked to the expression of myosin isoforms, which can be delayed or induced as a function of the intensity of muscle activation (Salmons and Sreter, 1976; Brown et al., 1983; Cerny and Bandman, 1987). In the ITC muscle, band 4 and 6 isoforms disappeared and were replaced by band 3 isoform when the chick was 7 to 15 days old, corresponding to the time when chicks are emerging from the brood patch and are able to stand in front of their parents (Stonehouse, 1960; Barrat, 1976; Verrier, 2003) (personal observations). In the GL muscle, the proportion of the band 6 isoform decreased slightly until it disappeared at approximately 3 weeks of age, when chicks are starting to walk actively. Since the principal function of the ITC is to protract the femur (Torrella et al., 1998), this muscle should be recruited early to maintain a bipedal posture and to support the chick's body mass. In contrast, the GL muscle, which is involved in ankle extension and knee flexion, is essentially recruited for bipedal locomotion (Smith et al., 2006). At the time of emancipation (3–4 weeks), the GL muscle appeared to be already mature, containing similar MyHC isoforms to adults. In the contrast, the ITC muscle had not reached this state at the end of the brooding period: band 3 isoform, present in the emancipated chick, was replaced by the band 4 isoform in adults. This switch can possibly be explained by the less intensive use of this muscle in adults, in relation to their marine life. During the chick-rearing period, young birds possess an exclusively terrestrial locomotion and therefore use their ITC muscles more intensively than adults that spend 75% of their time at sea, alternating travels at sea and sojourns on land to moult and breed (Stonehouse, 1960; Barrat, 1976). However, to test this hypothesis, it would be necessary to evaluate the MyHC isoform composition in older chicks, particularly at the end of the second growth period, at approximately 1 year of age.

In addition to these mechanical factors being a possible explanation for the changes in myosin profiles, hormonal and thermal factors are also likely to be involved. Thyroid hormones (T3 and T4) in particular have been shown to induce changes in MyHCs during the development of muscle fibres (Maruyama et al., 1993; Gardahaut et al., 1992). In the domestic turkey, Maruyama et al. showed that the increase in thyroxine (T4) level in the plasma could support the transition from embryonic to neonatal MyHCs during the development of the breast muscle (Maruyama et al., 1993). Thus, in king penguin chicks, the progressive disappearance of the band 6 isoform in the GL muscle, the disappearance of band 6 and 4 isoforms, followed by the appearance of band 3 isoform in the ITC muscle, together with the detection of band 3 isoform in the PM muscle, may be related to the increase in T4 plasma level also observed by Cherel et al. in the same species during early growth (Cherel et al., 2004). Moreover, at hatching, king penguin chicks are essentially heterothermic, but the rapid improvement of thermoregulatory processes and thermal insulation during the first 2–3 weeks of life allows them to acquire thermal emancipation (Duchamp et al., 2002). Changes in plasma T4 levels (the major thermogenesis regulating hormone) also correspond to the period when chicks gain independent thermoregulation. Thermoregulatory

capacity is crucial for chicks' survival during the sub-Antarctic winter when weather conditions deteriorate and parental food supply is restricted. Studies undertaken by Duchamp et al. on GL and PM muscles indicate that muscular shivering is the main thermogenic mechanism in growing chicks (Duchamp et al., 2002). Production of heat by repetitive muscular contraction therefore requires a rapid maturation of skeletal muscles. The development of endothermy in young birds requires the maturation of the neuromuscular system, an increased muscular oxidative capacity, as well as the development of myofibrillar ATPase in muscle fibres (Hohtola and Visser, 1998). Moreover, myofibrillar ATPase activity is linked to myosin heavy chain composition (Rivero et al., 1996). In the pectoral muscle of the domestic chicken, the contraction velocity of embryonic fast MyHCs were shown to be lower than the neonatal isoform (Lowey et al., 1993). In this context, changes in MyHC content occurring in king penguin chick leg muscles could be related to the progressive acquisition of homeothermy from their second week of life. Moreover, Duchamp et al. showed that shivering in king penguin chick PM, assessed by integrated electromyographic activity, occurred immediately after hatching, even though thermal insulation was not fully developed (Duchamp et al., 2002). The MyHC adult profile of the PM of young chicks could therefore indicate an early maturation of the contractile muscle proteins that would allow shivering as early as hatching. Furthermore, this muscle is known to be the major source of shivering and non-shivering thermogenesis in adults (Duchamp et al., 1989).

In order to rapidly acquire an effective pedestrian locomotion essential to their survival, early in their growth, chicks invest energy in the development of the pelvic girdle at the expense of the pectoral girdle (de Margerie et al., 2004; Erbrech et al., 2008). Considering the immature fibres size (Erbrech et al., 2008) and the mature MyHC content (this study) of the PM in young chicks, we also suggest that the PM is essential for thermoregulatory functions at this stage of development, whereas their locomotor function will be developed several months later before departing to sea. Together, these results from king penguin chicks illustrate the trade-off between muscle growth rate and functional capacity, as suggested for several bird species (reviewed by Krijgsveld et al., 2001). At the end of these first weeks of growth, king penguin chicks have acquired a functional pedestrian locomotion and are thermally emancipated. However, their growth will still last several months when they have to face a period of severe and prolonged under-nutrition during the sub-Antarctic winter, before finally departing to sea where they can forage independently. Throughout their winter fast, together with their locomotor and thermoregulatory functions, skeletal muscles may act as important protein reserves. One major task in future studies should therefore be to investigate the effect of this winter energy restriction on muscle development (fibre size and types, MyHC content) in both the pelvic and pectoral girdles when chicks are fully grown.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the laboratory of Biosciences de l'aliment (UC 885, INRA – LBSA, Nancy-Université) for the use of the integration densitometer. We thank Dominic McCafferty for useful editing comments. The study was supported by the Institut Paul Emile Victor (Brest, France) and received the logistic support of the Terres Australes et Antarctiques Françaises. A.E. was supported by grants from the Faculté d'odontologie de Nancy (France).

REFERENCES

- Bandman, E. and Rosser, B. W. (2000). Evolutionary significance of myosin heavy chain heterogeneity in birds. *Microsc. Res. Tech.* **50**, 473–491.
 Barrat, A. (1976). Quelques aspects de la biologie et de l'écologie du manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) des îles Crozet. *Corn. Nat. Fr. Res. Antarct.* **40**, 9–52.

- Barré, H. (1978). Métabolisme énergétique du poussin de manchot royal au cours de sa croissance. *J. Physiol. (Paris)* **74**, 555-561.
- Bennett, M. B. (2008). Post-hatching growth and development of the pectoral and pelvic limbs in the black noddy, *Anous minutus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **150A**, 159-168.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brown, W., Salmoms, S. and Whalen, R. G. (1983). The sequential replacement of myosin subunit isoforms during muscle type transformation induced by long-term electrical stimulation. *J. Biol. Chem.* **258**, 14686-14692.
- Cerny, L. C. and Bandman, E. (1987). Contractile activity is required for the expression of neonatal myosin heavy chain in embryonic chick pectoral muscle cultures. *J. Cell Biol.* **103**, 2153-2161.
- Cherel, Y., Charrassin, J. B. and Handrich, Y. (1993). Comparaison of body reserve buildup in prefasting chicks and adults of king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *Physiol. Zool.* **66**, 750-770.
- Cherel, Y., Durant, J. M. and Lacroix, A. (2004). Plasma thyroid hormone pattern in king penguin chicks: a semi-altricial bird with an extended posthatching developmental period. *Gen. Comp. Endocrinol.* **136**, 398-405.
- D'Albis, A., Pantaloni, C. and Bechet, J. J. (1979). An electrophoretic study of native myosin isozymes and of their subunit content. *Eur. J. Biochem.* **99**, 261-272.
- de Margerie, E., Robin, J.-P., Verrier, D., Cubo, J., Groscolas, R. and Castanet, J. (2004). Assessing a relationship between bone microstructure and growth rate: a fluorescent labelling study in the king penguin chick (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Exp. Biol.* **207**, 869-879.
- Duchamp, C., Barré, H., Delage, D., Rouanet, J.-L., Cohen, A. E. and Minaire, Y. (1989). Nonshivering thermogenesis and adaptation to fasting in king penguin chicks. *Am. J. Physiol.* **257**, R744-R751.
- Duchamp, C., Rouanet, J.-L. and Barré, H. (2002). Ontogeny of thermoregulatory mechanisms in king penguin chicks (*Aptenodytes patagonicus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **131A**, 765-773.
- Erbrecht, A., Guerin, N., Verrier, D., Gaudin, C., Groscolas, R. and Robin, J.-P. (2008). Muscular developmental asynchrony during the early growth phase in the king penguin chick. XXth International Congress of Zoology, Paris (France) 26-29 Août. *Integr. Zool. (suppl.)*, p. 94.
- Gardahaut, M. F., Fontaine-Perus, J., Rouaud, T., Bandman, E. and Ferrand, R. (1992). Developmental modulation of myosin expression by thyroid hormone in avian skeletal muscle. *Development* **115**, 1121-1131.
- George, J. C. and Berger, A. J. (1966). *Avian Myology*. London and New York: Academic Press.
- Heath, R. G. M. and Randall, R. M. (1985). Growth of jackass penguin chicks (*Spheniscus demersus*) hand reared on different diets. *J. Zool. Lond.* **205A**, 91-105.
- Hofmann, S., Dusterhoff, S. and Petter, D. (1988). Six myosin heavy chains are expressed during chick breast muscle development. *FEBS Lett.* **238**, 245-248.
- Hohtola, E. and Visser, G. H. (1998). Development of locomotion and endothermy in altricial and precocial birds. In *Avian Growth and Development. Evolution Within the Altricial-Precocial Spectrum* (ed. J. M. Starck and R. E. Ricklefs), pp. 157-173. Oxford: Oxford University Press.
- Krijgsveld, K. L., Olson, J. M. and Ricklefs, R. E. (2001). Catabolic capacity of the muscle of shorebird chicks: maturation of function in relation to body size. *Physiol. Biochem. Zool.* **74**, 250-260.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lowey, S., Guillermina, S. W. and Trybus, K. M. (1993). Function of skeletal muscle myosin heavy and light chain isoforms by an *in vitro* motility assay. *J. Biol. Chem.* **268**, 20414-20418.
- Maruyama, K., Kanemaki, N., Potts, W. and May, J. D. (1993). Body and muscle growth of domestic turkeys (*Meleagris gallopavo*) and expression of myosin heavy chain isoforms in breast muscle. *Growth Dev. Aging* **57**, 31-43.
- Merrifield, P. A., Sutherland, W. M., Litvin, J. and Konigsberg, I. R. (1989). Temporal and tissue-specific expression of myosin heavy chain isoforms in developing and adult avian muscle. *Dev. Genet.* **10**, 372-385.
- Meyers, R. A. and Mathias, E. (1997). Anatomy and histochemistry of spread-wing posture in birds. 2. Gliding flight in the California gull, *Larus californicus*, a paradox of fast fibers and posture. *J. Morphol.* **233**, 237-247.
- Nice, M. M. (1962). Development of behaviour in precocial birds. *Trans. Linn. Soc. NY* **8**, 1-211.
- Olson, J. M. (2001). Ontogeny of catabolic and morphological properties of skeletal muscle of the red-winged blackbird (*Agelaius phoeniceus*). *J. Comp. Physiol. B.* **171**, 527-542.
- Phillips, R. A. and Hamer, K. C. (2000). Postnatal development of northern fulmar chicks, *Fulmarus glacialis*. *Physiol. Biochem. Zool.* **73**, 597-604.
- Ricklefs, R. E. (1979). Adaptation, constraint and compromise in avian postnatal development. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **54**, 269-290.
- Rivero, J. L. L., Talmadge, R. J. and Edgerton, V. R. (1996). Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in equine skeletal muscle and the influence of training. *Anat. Rec.* **246**, 195-207.
- Rosser, B. W. C., Wick, M., Waldbillig, D. M. and Bandman, E. (1996). Heterogeneity of myosin heavy chain expression in fast-twitch fiber types of mature avian pectoralis muscle. *Biochem. Cell Biol.* **74**, 715-728.
- Rosser, B. W. C., Wick, M., Waldbillig, D. M., Wright, D. J., Farrar, C. M. and Bandman, E. (1998). Expression of myosin heavy chain isoforms during development of domestic pigeon pectoralis muscle. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 653-661.
- Salmoms, S. and Sreter, F. A. (1976). Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type. *Nature* **263**, 130-134.
- Schew, W. A. and Ricklefs, R. E. (1998). Developmental plasticity. In *Avian Growth and Development. Evolution Within the Altricial-Precocial Spectrum* (ed. J. M. Starck and R. E. Ricklefs), pp. 288-304. Oxford: Oxford University Press.
- Smith, N. C., Wilson, A. M., Jespers, K. J. and Payne, R. C. (2006). Muscle architecture and functional anatomy of the pelvic limb of the ostrich (*Struthio camelus*). *J. Anat.* **209**, 765-779.
- Sokoloff, A. J., Ryan, J. M., Valerie, E., Wilson, D. S. and Goslow, G. E., Jr (1998). Neuromuscular organization of avian flight muscle: morphology and contractile properties of motor units in the pectoralis (pars thoracicus) of pigeon (*Columba livia*). *J. Morphol.* **236**, 179-208.
- Starck, J. M. and Ricklefs, R. E. (1998). Data set avian growth parameters. In *Avian Growth and Development. Evolution Within the Altricial-Precocial Spectrum* (ed. J. M. Starck and R. E. Ricklefs) pp. 381-423. Oxford: Oxford University Press.
- Stonehouse, B. (1960). The king penguin *Aptenodytes patagonica* of South Georgia. I. Breeding behaviour and development. *Falklands Islands Dependencies Survey Sci Rep.* **23**, 1-80.
- Talmadge, R. J. and Roy, R. R. (1993). Electrophoretic separation of skeletal muscle myosin heavy chain. *J. Appl. Physiol.* **75**, 2337-2340.
- Tidyman, W. E., Moore, L. A. and Bandman, E. (1997). Expression of fast myosin heavy chain transcripts in developing and dystrophic chicken skeletal muscle. *Dev. Dyn.* **208**, 491-504.
- Torrella, J.-R., Fouces, V., Palomeque, J. and Viscor, G. (1998). Comparative skeletal muscle fibre morphometry among wild birds with different locomotor behaviour. *J. Anat.* **192**, 211-222.
- Verrier, D. (2003). *Croissance et Mue Chez le Poussin de Manchot Royal (Aptenodytes patagonicus): Aspects Écophysiologiques*. Vet. thesis, University Claude Bernard-Lyon I, France.

Principaux résultats et discussion

Les résultats de l'étude 1.2 ont démontré une accrétion lipidique rapide au cours des premiers mois de vie du poussin jusqu'à atteindre le même indice d'adiposité que les adultes. Un décalage de croissance entre les muscles des ceintures pectorale et pelvienne a également été mis en évidence. En effet, l'accrétion protéique dans les muscles des pattes est environ 3 fois supérieure à celle des muscles pectoraux.

Nous avons montré que le *pectoralis major*, chez le poussin comme l'adulte, n'est composé que de fibres rapides de type oxydo-glycolytique (FOG). Ce résultat est conforme à ce qui peut être observé chez d'autres espèces telles que, par exemple, le pic flamboyant (*Colaptes auratus*) et le martin pêcheur d'Amérique (*Megasceryle alcyon*) (Rosser *et al.*, 1996). De part leur métabolisme, cette composition en fibres est compatible chez l'adulte avec la sollicitation soutenue du muscle lors de l'activité de plongée. L'étude de la composition en isoformes de chaîne lourde de myosine (MyHC) (2.2) révèle une maturation précoce des protéines contractiles de ce muscle. Ce type de fibre et cette maturation précoce pourraient jouer un rôle important dans la thermorégulation avec frisson. Cependant d'après leur taille, ces fibres musculaires ne permettraient pas de développer la force de contraction nécessaire à la locomotion subaquatique.

Au niveau des muscles de la ceinture pelvienne, le *gastrocnémius latéralis* (GL) et l'*iliotibiolis cranialis* (IC) présentent une typologie correspondant au rôle de maintien de la posture (fibres lentes, SO) et de locomotion terrestre (fibres rapides de type FOG) (étude 1.2). La vitesse de croissance des fibres FOG de ces deux muscles apparaît plus rapide que celle du *pectoralis major* (d'un facteur 2). Concernant le GL, la diminution de la proportion des fibres lentes pendant le développement pourrait correspondre au passage progressif d'une position debout, sollicitant les fibres de posture (SO) à la locomotion terrestre nécessitant l'activité des fibres rapides (FOG). Le changement d'expression des protéines contractiles (étude 2.2) dans ce muscle semble également lié à la mise en place de la marche bipède. À l'émancipation du poussin, le

pourcentage des fibres lentes ainsi que la composition en isoforme de MyHC sont similaires à celles chez l'adulte.

Pour l'IC, aucune évolution notable de la proportion des fibres lentes n'a pu être mise en évidence chez le poussin et, de plus, elle est semblable à celle chez l'adulte (étude 1.2). Cependant, une modification de l'expression des protéines contractiles a été observée mais, contrairement à ce que nous avons montré pour le GL, la composition en MyHC à l'émancipation, reste différente de celle de l'adulte (étude 2.2).

D'après ce travail, chez le poussin de manchot royal, la ceinture pelvienne est plus développée que la ceinture pectorale au cours des premiers mois de vie du poussin. En effet, le développement précoce des muscles locomoteurs terrestres est essentiel pour échapper aux prédateurs (skuas et pétrels géants) et également pour supporter les réserves lipidiques importantes qui sont stockées avant la période hivernale (Cherel *et al.*, 1993). Au contraire les muscles de la ceinture pectorale principalement nécessaire pendant le vol subaquatique ne seront sollicités qu'un an plus tard lorsque le jeune manchot quitte la colonie pour son premier départ en mer.

Cette différence de développement entre les deux ceintures chez ce modèle d'oiseaux marin semi-altricial, semble en contradiction avec le déroulement classique de la croissance des espèces altriciales chez lesquelles aucun décalage important n'a été mis en évidence (Marsh et Wickler, 1982 ; Olson, 2001). Ceci suggère qu'en présence de contraintes environnementales particulières durant la période de croissance des oiseaux il peut y avoir un développement différentiel des ceintures pectorale et pelvienne, indépendamment du caractère altricial du développement post-embryonnaire.

Partie II : Impact de l'hiver sur le développement musculaire chez le poussin de manchot royal



Résumé de la partie II

Impact de l'hiver sur le développement musculaire chez le poussin de manchot royal

Nous avons vu dans l'étude 1 que pendant les deux premiers mois de vie du poussin de manchot royal, l'accrétion protéique est 2 fois plus rapide au niveau des muscles de la ceinture pelvienne par rapport aux muscles pectoraux (étude 1.2). Par ailleurs, il semblerait que la maturation précoce des protéines contractiles dans le *pectoralis major* puisse jouer un rôle important dans la mise en place des mécanismes de thermorégulation (étude 2.2). Le décalage dans le développement des membres antérieur et postérieur est relativement atypique parmi les espèces altriciales. Généralement, chez ces espèces, les muscles des deux ceintures se développent à la même vitesse après l'éclosion, puis la croissance du muscle pectoral s'intensifie jusqu'à l'émancipation totale du jeune oiseau (Marsh et Wickler, 1982 ; Olson, 2001).

Chez le jeune manchot, le développement rapide des membres postérieurs et la maturation précoce du muscle pectoral permet au jeune animal d'acquiescer une première forme d'indépendance. Les poussins, thermiquement émancipés et devenus marcheurs, sont ainsi laissés seuls dans la colonie pendant les voyages alimentaires des parents. Cependant, nous pouvons nous demander comment le développement des ceintures pectorale et pelvienne va évoluer chez ces et si le décalage de croissance se maintient jusqu'au début de l'hiver austral. En d'autres termes, quelle sera la stratégie de gestion des réserves énergétiques (lipidiques dans le tissu adipeux et protéiques dans le muscle) à l'approche de la restriction alimentaire hivernale ? Et d'autre part quel sera l'impact direct de la réduction des apports énergétiques sur les ceintures pectorale et pelvienne de ces poussins ?

Dans cette étude, nous allons donc nous intéresser premièrement à la croissance musculaire des ceintures pectorale et pelvienne, ainsi qu'à l'accrétion lipidique avant l'entrée dans la période

hivernale chez des poussins déjà émancipés du point de vue de la thermorégulation et de la locomotion terrestre. Dans un second temps, le but sera de déterminer l'impact de l'hiver austral sur les deux ceintures musculaires et les réserves lipidiques sous-cutanées.

Méthodes

Prélèvements

Les tissus musculaires ont été prélevés sur 39 poussins de manchot royaux émancipés et 9 adultes. Les muscles entiers homolatéraux gauches de la ceinture pectorale (*Pectoralis major*, *minor*, et *Scapulohumeralis caudalis*) et de la ceinture pelvienne (en particulier *Gastrocnemius lateralis* et *Iliotibialis cranialis*) ont été disséqués. Un muscle contralatéral de chaque ceinture (*Pectoralis major*, *Gastrocnemius lateralis* et *Iliotibialis cranialis*) a été prélevé pour l'analyse de la composition en chaîne lourde de myosine et de typologie en fibres (sauf l'*Iliotibialis cranialis*).

Du tissu adipeux sous-cutané a été également récupéré au même niveau de l'abdomen pour chaque animal.

Méthodes utilisées

1) La concentration en protéines totales a été déterminée pour les muscles et la peau grâce à la méthode de Kjeldahl tandis que la teneur en lipides a été obtenue par la méthode gravimétrique de Folch. 2) La différenciation des types de fibres a été réalisée sur des coupes histologiques de muscles grâce à la mise en évidence de l'activité de la myosine-ATPase et de la succino-déshydrogénase. 3) Les chaînes lourdes de myosine ont été séparées en fonction de leur masse moléculaire par électrophorèse SDS-PAGE.

Principaux résultats et conclusion

Les résultats de cette étude montrent que le décalage de croissance entre les muscles des ceintures pelvienne et pectorale existant à l'émancipation des poussins se maintient jusqu'à l'entrée dans la période hivernale. Cependant, cet écart se réduit grâce au développement plus rapide de la ceinture pectorale. Par ailleurs, la restriction alimentaire hivernale, en plus des réserves lipidiques, affecte plus particulièrement la ceinture pectorale. Il semblerait donc que les muscles de cette ceinture servent principalement de réserve en acides aminés pendant l'hiver. Le maintien général de la musculature des membres postérieurs, malgré la réduction des apports énergétiques, peut être liée au fait que la locomotion terrestre doit être préservée pour assurer la survie des poussins.

INTRODUCTION

Pour tout organisme, la vie commence par une phase critique qui est la période de croissance. En effet, durant cette phase l'organisme est particulièrement vulnérable, et dans certains cas, totalement tributaire des soins prodigués par les parents (Lequette et Weimerskirch, 1990). Pendant cette période, le jeune animal est généralement alimenté de manière fréquente et soutenue (Ricklefs, 1979a). Ainsi, différentes fonctions telles que la locomotion ou la thermorégulation (pour les homéothermes) vont connaître une maturation importante (Ricklefs, 1973) afin que le jeune animal puisse acquérir son indépendance. Plusieurs stratégies sont alors adoptées selon les espèces et leurs traits d'histoire de vie (Stearns, 1992) afin d'amener les jeunes jusqu'à l'émancipation totale. Ces traits sont directement influencés par des compromis (ou *trade-off*) (Cole, 1954 ; Stearns, 1992). Ainsi, lorsque les ressources énergétiques sont limitées, un compromis est réalisé entre les différentes fonctions physiologiques et toute allocation énergétique envers une fonction se fera aux dépens d'une autre.

L'état des réserves énergétiques des jeunes individus est alors un élément crucial et ce particulièrement chez les oiseaux marins lors de leur premier départ en mer. Chez ces derniers, le développement post-embryonnaire revêt un caractère fondamental qui va conditionner la survie (Corbel *et al.*, 2009). Cette croissance post-embryonnaire se traduit par un développement structural et pondéral plus ou moins rapide (Case, 1978 ; Ricklefs, 1973) qui va faire intervenir la maturation des différents tissus tels que les os (Margerie *et al.*, 2004) et les muscles (Olson, 2001).

Chez les espèces aviaires, la vitesse de développement est en moyenne deux fois plus rapide que chez les mammifères de même taille (Ricklefs, 1979). Cependant, en fonction de l'état de maturité des poussins à l'éclosion quatre grands modes de développement ont été définis (Nice, 1962). Le premier est dit précoce et concerne les poussins nidifuges tels que les Anatidés (canards, oies...) ou les Galliformes (cailles, poules...). Dans ce groupe, les jeunes oisillons sont

rapidement capables d'assurer leur thermorégulation et de pratiquer une locomotion bipède relativement efficace. Ils quittent ainsi le nid au plus tard dans les deux premiers jours après l'éclosion. À l'opposé, le groupe dit altricial, concerne les poussins nidicoles, comme les Passériformes (passereaux) par exemple. Chez ces oisillons, les capacités thermorégulatrices et locomotrices sont beaucoup moins développées. Les poussins sont couvés et dépendent entièrement de l'apport alimentaire parental. Entre ces deux extrêmes, il existe deux modes de développement intermédiaires. On trouve en effet 1) des poussins semi-précoces comme les Laridés (goélands, mouettes, sternes...) qui ont les mêmes caractéristiques que les précoces mais qui ne quitteront le nid qu'à l'envol et 2) des poussins semi-altriciaux dont font partie les Strigiformes (chouettes, hiboux) et les Sphéniciformes (manchots) qui sont comme les altriciaux totalement dépendant des soins parentaux.

Le développement des fonctions locomotrices est un facteur qui va conditionner l'émancipation des oisillons. Selon le mode de déplacement (vol plané, vol ou nage soutenue, déplacements terrestres...), les muscles striés squelettiques peuvent être constitués de différents types de fibres ayant des propriétés contractiles (dépendent de la composition en isoformes de chaîne lourdes de myosine) et métaboliques propres (Torrella *et al.*, 1998). Ainsi, chez les espèces domestiques tel que le poulet, les muscles pectoraux ne sont composés que de fibres FG capables d'accomplir des séries de contractions rapides et puissantes mais pendant un bref laps de temps (Smith *et al.*, 1993). Par contre, les muscles pectoraux des oiseaux migrateurs sont composés d'une très grande proportion de fibres FOG certes moins puissantes et rapides que les FG mais qui, en raison de leur meilleure résistance à la fatigue, sont capables de soutenir un effort plus prolongé (Rosser *et al.*, 1996).

Finalement, la structure morpho-fonctionnelle des tissus musculaires dépend directement des contraintes imposées par le mode de locomotion de animaux.

Lorsque les contraintes sont environnementales (restriction alimentaire, exposition au froid) la typologie des fibres musculaires peut également être affectée (Duchamp *et al.*, 1992 ; Li *et al.*, 2007). Dans certains cas, ces contraintes pourront survenir dès la période de croissance post-embryonnaire.

La plupart des oiseaux font coïncider l'élevage de leurs poussins avec la saison présentant la plus forte disponibilité alimentaire, à savoir la période correspondant au printemps et à l'été. Les adultes peuvent ainsi assurer la perpétuation de l'espèce tout en veillant à leur propre survie (Groscolas, 1986). Pour le poussin, l'apport alimentaire peut néanmoins dépendre de la qualité intrinsèque des parents et être modulé par des fluctuations des conditions climatiques. Cela est particulièrement vrai lorsque la croissance des poussins est longue et que la saison estivale ne suffit pas aux parents pour amener leurs poussins jusqu'à l'émancipation totale. Dans une telle situation, la survie des poussins suggère la mise en place de stratégies d'allocation énergétique particulières qui ne sont à ce jour pas bien comprises.

Le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) est une espèce semi-altricielle qui doit faire face à de fortes pressions environnementales à un certain moment de son développement. En effet, de part sa grande taille, il est l'un des seuls oiseaux à ne pas pouvoir faire coïncider l'ensemble de son cycle de reproduction avec la seule période estivale (Jouventin et Lagarde, 1995). Les jeunes manchots sont donc soumis à l'hiver austral durant leur croissance, période au cours de laquelle la disponibilité alimentaire est fortement diminuée (Clerquin, 1998). Ainsi, la croissance de cet animal peut être divisée en 3 grandes périodes. La première phase de croissance est caractérisé par un développement statural rapide (Verrier, 2003) et un engraissement important (Cherel *et al.*, 1993) jusqu'au début de l'hiver. La seconde période correspond à l'arrêt de croissance liée à la sous alimentation hivernale durant laquelle les poussins seront nourris au mieux une fois toutes les 5 à 6 semaines (Cherel *et al.*, 1987 ; Descamps *et al.*, 2002) et dans certains cas pas du tout (Cherel et Le Maho, 1985 ; Cherel *et al.*, 1987) durant 4 à 5 mois. Enfin,

la troisième période débute à la fin de l'hiver lorsque les poussins commencent à être réalimentés. Le poussin entame alors une deuxième phase de croissance essentiellement pondérale (avec accumulation de réserves énergétiques) et se termine par la mue et le départ de la colonie (Stonehouse, 1960 ; Barrat, 1976 ; Cherel et Le Maho, 1985). La période d'élevage des poussins aura finalement duré 1 an, une période exceptionnellement longue pour un oiseau (Stonehouse, 1960).

La mise en place rapide de la thermorégulation (Duchamp *et al.*, 2002) et de la locomotion chez cette espèce pendant la première phase de croissance (entre 1 et 2 mois d'âge) traduit la nécessité d'acquiescer une première forme d'indépendance. Lors des deux premiers mois de vie, un développement précoce des muscles de la ceinture pelvienne a été mis en évidence au détriment des muscles pectoraux (Partie I) alors que chez d'autres espèces altriciales, les ceintures pectorale et pelvienne se développent simultanément (Marsh et Wickler, 1982 ; Olson, 2001). Cependant, après l'acquisition de la locomotion bipède, nous pouvons nous demander comment va évoluer le développement des deux ceintures et si le décalage de croissance se maintient jusqu'au début de l'hiver austral. En effet, la gestion des réserves énergétiques (lipides du tissu adipeux mais également protéines musculaires) des poussins durant cette période est primordiale au vu de la restriction alimentaire de plusieurs mois à laquelle ils vont devoir faire face. Dans un second point, on s'intéressera également à l'impact direct de cette restriction alimentaire hivernale sur les ceintures pelvienne et pectorale de ces poussins.

Pour répondre à ces questions, un groupe de poussins émancipés avant hiver et après hiver ont été comparés. Leur masse protéique a été déterminée au niveau des deux ceintures. Parallèlement un index de l'adiposité sous-cutanée a été calculé pour chaque individu. Nous avons également déterminé et comparé la composition en isoformes de myosine de muscles des deux ceintures. Et enfin, une étude histoenzymologique a permis une approche typologique et morphométrique des fibres musculaires de ces mêmes muscles.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Collecte des échantillons

Cette étude a été menée sur l'île de la Possession dans l'archipel de Crozet (46° 26' S, 51° 52' E, Océan Indien) entre avril et octobre 2006. De l'ordre de 25 000 couples de manchots royaux habitués à la présence humaine se reproduisent à proximité de la base scientifique Alfred Faure. Le protocole de l'étude a été approuvé par le comité d'éthique français de l'Institut Polaire Paul Émile Victor et par le comité de l'Environnement Polaire des Terres Australes et Antarctiques Française (TAAF).

Les prélèvements ont été effectués sur des poussins (n=39) victimes de prédation par des pétrels géants (*Macronectes halli* et *giganteus*) dont la mort est survenue au plus quelques minutes auparavant. À l'issue des dissections, les restes des cadavres ont été replacés dans la colonie à l'endroit de leur collecte afin de limiter l'impact de ces prélèvements sur la population de prédateurs.

Les 5 muscles homolatéraux gauches des ceintures pelvienne (*Gastrocnemius lateralis* et *Iliotibialis cranialis*) et pectorale (*Pectoralis major* et *minor*, *Scapulohumeralis caudalis*), ont été prélevés en entier, pesés ($\pm 0,01g$) et stockés à $-20^{\circ}C$ jusqu'aux analyses en laboratoire à Strasbourg. Un échantillon de peau de l'abdomen avec le tissu adipeux sous-cutané ainsi que les restes de muscle de la ceinture pelvienne ont été conditionnés de la même manière.

Les dissections, destinées aux analyses de la typologie des fibres (histoenzymologie) et de la composition des chaînes lourdes de myosine (électrophorèse), ont été effectués sur les muscles controlatéraux de l'animal (*Pectoralis major*, *Gastrocnemius lateralis* et *Iliotibialis cranialis*). L'échantillonnage a été réalisé dans la partie médiane pour les deux muscles des membres postérieurs et dans la partie supérieure pour le muscle pectoral. Des prélèvements musculaires de $0,20\text{ cm}^3$, destinés à l'histoenzymologie, ont été congelés dans du isopentane (cryoprotecteur) à

-80°C, et ~200 mg de tissu a été conservé à +4°C avant que la myosine ne soit extraite au laboratoire situé à la Base puis maintenu à -80°C jusqu'aux analyses en métropole.

Par ailleurs, chaque animal a été pesé ($\pm 0,1$ g) et les mensurations du bec, de l'aile et du tarse ont été déterminées ($\pm 0,5$ mm).

Analyses en laboratoire

1) Composition corporelle

Les muscles entiers et les échantillons de peau ont été lyophilisés puis réduits en une fine poudre homogène grâce à un broyeur (Retsch ZM1). L'azote ammoniacal total des différents tissus a été dosé par la méthode de Kjeldhal. Puis la teneur en protéines est déterminée en multipliant la teneur en azote par 6,25 (Concon et Soltess, 1973 ; Campbell et Leatherland, 1980). Les masses protéiques des ceintures pectorale et pelvienne sont obtenues en multipliant la masse protéique des muscles pectoraux et celle des pattes respectivement par 2.

La teneur en lipides de la peau a été déterminée d'après la méthode gravimétrique de Folch *et al.* (1957) en utilisant une solution de chloroforme/méthanol (2:1, v/v). Ainsi un indice d'adiposité (teneur en lipides/teneur en protéine de la peau) a pu être calculé pour chaque individu.

2) Histoenzymologie

Des coupes transversales sériées (14-20 μm) ont été réalisées à froid (-20°C) à l'aide d'un cryostat (Harris) sur des segments musculaires, préalablement inclus dans du Tissue-Tek OCT. Les sections obtenues sont ensuite été déposées sur des lames en verre traité à la Poly-Lysine (0,01%) et stockées à -80°C jusqu'à leur traitement.

Détermination des types de fibre :

Chaque type de fibre musculaire dispose d'un équipement enzymatique propre en relation avec son fonctionnement métabolique. Ainsi, la différenciation des différents types de fibres s'effectue grâce à l'activité de certains enzymes caractéristiques.

Les fibres lentes et rapides ont été discriminées grâce à l'activité de la myosine-ATPase (Guth et Samaha, 1969) tandis que la présence d'enzymes oxydatives (succino-déshydrogénase, SDH) a permis de faire la distinction entre les fibres rapide de type oxydo-glycolytique (FOG) et glycolytique (FG) (Nachlas *et al.*, 1957).

Myosine- ATPase

Après avoir été décongelées à température ambiante pendant 30 minutes environ, les lames histologiques ont été plongées dans une solution acide en milieu acide dans une solution d'acétate de potassium à 0,1 M, pH 4,35 durant 10 minutes afin d'inhiber l'activité de la myosine-ATPase des fibres rapides (Guth et Samaha, 1969). Les échantillons sont rincées dans une solution tampon (Tris-HCl 0,1 M ; CaCl₂ 18 mM ; pH 7,8), avant d'être plongées dans une solution d'incubation préparée extemporanément (ATP 2,7 mM ; CaCl₂ 18 mM ; tampon 2- amino-2-méthyl-1-propanol 0,1 M), pH 9,4 pendant 30 minutes à 37°C. Les lames sont ensuite plongées dans trois bains successifs de 30 secondes dans une solution de CaCl₂ à 0,07 M, puis 3 minutes dans un bain de CoCl₂ à 2% suivi de quatre bains de 30 secondes dans une solution de tampon 2-amino-2-méthyl-1-propanol à 0,1 M (pH 9,4) et finalement un bain de 3 minutes dans une solution de sulfide d'ammonium à 1%.

Les coupes sont alors rincées abondamment à l'eau du robinet et déshydratées grâce à quatre bains successifs de 5 minutes dans de l'éthanol 30, 50, 70 et 100 %, passées 5 minutes dans un bain de solvant (HistoClear II, Electron Microscopy Sciences) et montées à l'Eukitt (EMS).

Succino-déshydrogénase

Les coupes décongelées sont directement plongées dans la solution d'incubation (Succinate de sodium 0,1 M ; nitro-BT 0,05% ; tampon phosphate 0,1 M à pH 7,6) durant 1 heure à 37°C puis rincées dans une solution de NaCl (0,9%). Les échantillons sont ensuite déshydratés et montés à l'Eukitt (EMS).

Analyse des coupes histologiques

Les coupes histologiques ont été observées au microscope optique (Zeiss, Axioplan 2) et les l'analyse ont été réalisée à partir de photographies prises avec une caméra (Zeiss, AxioCam) grâce au programme Axiovision 3.1®. La proportion de chaque type de fibre a été déterminée sur un total de 600 à 1000 fibres pour chaque individu. L'aire de la section transversale des fibres a été mesurée grâce au programme SigmaScan Pro 5®. Pour chaque type de fibre, 100 cellules ont été mesurée à raison de 25 dans 4 zones différentes et choisies aléatoirement.

3) Extraction et analyse de la composition en isoformes de chaînes lourdes de myosine

La myosine a été extraite selon la méthode de D'Albis *et al.* (1979) et conservé à -80°C jusqu'aux analyses. Les isoformes de chaîne lourde de myosine on été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Cette méthode permet de réaliser une étude qualitative de la myosine en séparant les chaînes lourdes selon leur masse moléculaire (Talmadge et Roy, 1993). Les gels de concentration et de séparation sont respectivement composés de 4 et 8 % d'acrylamide-bis (50:1). Le système d'électrophorèse utilisé repose sur le matériel développé par Biorad (Hercules, CA, USA) pour réaliser des petits gels de 0,75 mm d'épaisseur (Miniprotean II). La quantité de protéines déposées par puits est de 5 µg. La migration est lancée à voltage constant de 70V durant 28 h dans une chambre froide à + 4°C. Les isoformes de myosine sont ensuite révélés dans une solution de bleu de Coomassie (R-250) avant d'être séchés à température ambiante.

La lecture des gels électrophorétiques a été effectuée à l'aide d'un densitomètre (Bio-Rad GS 800) et grâce à un logiciel d'analyse moléculaire (Quantity One 4.2.1).

Analyses statistiques

Chaque moyenne est indiquée \pm l'erreur standard (ES). Les analyses statistiques ainsi que les figures ont été réalisées avec le logiciel R version 2.10.1 (R Development Core Team, 2009).

L'indice statural utilisé pour la comparaison des poussins du groupe avant hiver de cette étude avec des poussins suivis et nourris régulièrement depuis l'éclosion (Verrier, 2003), a été calculé à l'aide d'une analyse de composante principale (ACP) sur la taille de l'aile, du bec et du tarse des individus.

La comparaison entre les groupes a été effectuée à l'aide d'un modèle linéaire (LM) lorsque la normalité des résidus était vérifiée. En cas contraire, c'est un modèle linéaire généralisé (GLM) basé sur une loi gamma qui a servi à analyser les données. Suite à cela les p-valeurs ajustées ont été obtenues grâce à l'ajustement de Tukey. Pour comparer différents paramètres au sein des groupes et entre les groupes, c'est un modèle linéaire mixte (LMM) qui a été utilisé en cas de normalité avérée des résidus, et un modèle linéaire généralisé mixte (GLMM) basé sur une loi gamma si la normalité de ces résidus n'était pas respectée. De même, l'ajustement de Tukey a permis d'obtenir les p-valeurs ajustées pour les comparaisons multiples. Dans tous les cas la normalité des résidus a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk.

Les écarts entre les masses corporelles au sein et entre les groupes définis pour cette étude (poussins avant hiver, après hiver et adultes) étant importants, il a été choisi, dans certains cas, de corriger les modèles statistiques utilisés par cette même masse corporelle en la prenant en compte comme co-variable. Cette règle a été appliquée pour les tests comparant des paramètres directement corrélés à la masse corporelle : la masse protéique (ou tout ratio l'impliquant), l'indice d'adiposité. Concernant les données histoenzymologiques, la masse n'étant pas significativement corrélée aux paramètres étudiés pour le GL, et nettement différents entre les groupes pour le Pec maj, il a été décidé de ne pas appliquer cette corrélation. Le seuil de significativité a été fixé à 0,05.

RÉSULTATS

Condition corporelle

Il existe une corrélation linéaire positive entre la masse corporelle et l'indice statural pour les groupes de poussins après ($R^2=0,379$; $p<0,014$; $y=22,567x + 468,97$) et avant hiver ($R^2=0,611$; $p<0,001$; $y=32,963x + 309,18$) (Figure 1). Dans ce dernier groupe, les jeunes manchots ont des indices staturaux (somme de la taille de bec, de l'aile et du tarse) ainsi que des masses corporelles semblables à ceux de poussins d'âge connu et nourris régulièrement par leurs parents (Verrier, 2003).

Les poussins étudiés avant l'hiver austral ont été collectés entre mi-mars et fin juin 2006, et leur masse corporelle augmente plus de 2 fois durant cette période, passant de 3,8 à environ 7,8 kg. Un poussin encore nourri en début d'hiver collecté en juillet 2006 a été ajouté à ce groupe, sa masse corporelle étant de 11,5 kg. La masse corporelle moyenne des poussins après hiver est inférieure de presque 2 kg à celle des poussins avant hiver ($p<0,001$). Tandis que la masse corporelle des adultes est en moyenne 2 fois supérieure à celles des poussins des deux groupes ($p<0,001$) (Tableau 1). L'indice structural est significativement différent entre les deux groupes de poussins ($p> 0,05$). Par contre, chez les poussins après hiver, cet indice est similaire à celui des adultes ($p<0,001$) (Tableau 1).

L'indice d'adiposité (teneur en lipides/teneur en protéine de la peau) est corrélé de manière linéaire par rapport à la masse corporelles des poussins (poussins avant hiver : $R^2=0,612$; $p<0,001$ et poussins après hiver : $R^2=0,416$; $p=0,014$) (Figure 3). Chez les poussins avant hiver, la valeur de cet indice augmente environ de 1,5 à 13 alors que l'adiposité des oisillons après l'hiver est en moyenne de $0,5 \pm 0,3$. L'indice d'adiposité est significativement différent entre les deux groupes de poussins (avant et après hiver) et les adultes. La valeur de l'indice des poussins avant hiver est plus de 13 fois supérieure à celle des poussins après hiver ($p<0,001$) (tableau 1).

Chez les adultes, l'adiposité est en moyenne plus de 2 fois inférieure et presque 6 fois supérieure à celle des poussins respectivement avant et après hiver ($p < 0,001$) (Figure 2).

Masse protéique

1- Ceinture Pelvienne

Gastrocnemius lateralis

Chez les poussins (avant et après hiver), la masse protéique totale du *gastrocnémus latéralis* (GL) est positivement corrélée avec la masse corporelle (avant hiver : $R^2=0,800$; $p < 0,001$ / après hiver : $R^2=0,795$; $p < 0,001$) (Figure 3). Ainsi chez les poussins elle est plus que doublée entre les individus ayant les masses corporelles les plus faibles et les plus élevées.

La proportion du *Gastrocnemius lateralis* (GL) dans la ceinture pelvienne totale n'est pas significativement différente entre les groupes de poussins (avant et après hiver) et les adultes ($p \geq 0,068$) (Figure 4). Seule la masse protéique du GL chez les adultes diffère significativement d'un facteur 2 par rapport à celle des 2 groupes de poussins (facteur 2, $p < 0,032$) (Figure 3).

Iliotibialis cranialis

Comme pour le GL, il existe une corrélation positive entre la masse protéique de *l'iliotibialis cranialis* (IC) et la masse corporelle entre les 3 groupes (avant hiver : $R^2=0,743$; $p < 0,001$; $y=1,4126x-0,2577$ et après hiver : $R^2=0,619$; $p=0,001$; $y=2,1904x-3,3746$) (Figure 5).

La proportion de l'IC dans la ceinture pelvienne est plus faible (~22%) chez les poussins après hiver que chez ceux avant hiver ($p=0,001$) (Figure 4). Cependant, la masse protéique totale ne diffère pas significativement entre les 2 groupes de poussins ($p \geq 0,097$) (Figure 5).

Chez les poussins avant hiver, la proportion de l'IC est similaire aux adultes ($P= 0,08$). Mais comme pour le GL la masse protéique de ce muscle est environ 35 % plus importante chez les adultes que chez les poussins des deux groupes ($p < 0,001$).

Ceinture pelvienne totale

La masse protéique de la ceinture pelvienne totale des poussins à la sortie de l'hiver est en moyenne 1,5 fois moins importante que celle des poussins avant hiver ($p < 0,05$) (Tableau 1, figure 6). Chez les adultes cette masse est en moyenne 1,5 fois supérieure à celle des deux groupes de poussins ($p < 0,001$).

2) Ceinture Pectorale

Pectoralis major

La masse protéique du *Pectoralis major* (Pec maj) est corrélée positivement à la masse corporelle dans les groupes de poussins après ($R^2 = 0,444$; $p < 0,001$) et avant hiver ($R^2 = 0,856$; $p < 0,001$). Dans ce dernier groupe elle passe de 4 à 88 g (Figure 7).

La proportion du Pec maj dans la ceinture pectorale est plus faible chez les poussins après hiver que chez ceux avant hiver ($p < 0,001$) (Figure 8) ; de même sa masse protéique est en moyenne 1,5 fois plus faible après l'hiver ($p = 0,001$) (Figure 7).

Chez l'adulte, la masse protéique du muscle est 20 fois supérieure en moyenne à celle des deux groupes de poussins ($p < 0,001$) (Figure 7). La part du Pec maj dans la ceinture pectorale chez les adultes est également supérieure à celle chez les poussins après hiver ($p = 0,003$), cependant il n'y a pas de différence significative avec les poussins avant hiver ($p = 0,224$) (Figure 8).

Pectoralis minor

La masse protéique du *Pectoralis minor* (Pec min) est également corrélée à la masse corporelle chez les poussins après ($R^2 = 0,426$; $p = 0,034$; $y = 5,2641x - 9,7906$) et avant hiver ($R^2 = 0,826$; $p < 0,001$; $y = 5,7046x - 21,331$) (Figure 9). Dans ce dernier groupe elle passe d'environ 2 à 50 g.

Dans le groupe de poussins après hiver la proportion de ce muscle dans la ceinture pectorale est plus importante (plus de 20%) que chez les poussins avant hiver ($p < 0,001$) (Figure 8), cependant

sa masse protéique reste plus élevée (d'un facteur 1,25) dans le groupe avant hiver ($p < 0,001$) (Figure 9).

Chez les adultes, la part de la masse protéique du Pec min dans la ceinture pectorale totale est uniquement inférieure à celle du groupe de poussins après hiver ($p < 0,001$) (Figure 8). Par ailleurs, la masse protéique de ce muscle est en moyenne plus de 10 fois supérieure dans le groupe des adultes à celle dans les deux groupes de poussins ($p < 0,001$).

Scapulohumeralis caudalis

La masse protéique du *Scapulohumeralis caudalis* (Scap) augmente avec la masse corporelle dans les deux groupes de poussins avant et après hiver (respectivement : $R^2 = 0,830$; $p < 0,001$; $y = 1,1363x - 3,4720$ et $R^2 = 0,462$; $p = 0,008$; $y = 1,0173x - 1,6817$) (Figure 10). Chez les poussins avant hiver, la masse protéique du Scap passe de 0,6 g à 11 g (Figure 10). La seule différence significative entre les deux groupes de poussins concerne la part de la masse protéique de ce muscle dans la ceinture pectorale. Elle est plus importante chez les poussins avant hiver que chez ceux après hiver ($p = 0,008$) (Figure 8).

Chez les adultes, la part de la masse protéique du Scap dans la ceinture pectorale est significativement inférieure à celle des poussins avant hiver ($p = 0,028$) et aucune différence significative ($p = 0,751$) n'a été mise en évidence avec les poussins après hiver (Figure 8). La masse protéique totale du Scap est, quant à elle, environ 8 fois supérieure chez les adultes que chez les deux groupes de poussins ($p < 0,001$).

Ceinture pectorale totale

La masse protéique de la ceinture pectorale totale des poussins après hiver est en moyenne 2 fois moins importante que celle des poussins avant hiver ($p < 0,001$) (Tableau 1, figure 6). Chez les

adultes, la masse protéique de la ceinture pectorale est plus de 8 fois supérieure à celle des deux groupes de poussins ($p < 0,001$).

Ceinture pelvienne vs. Ceinture pectorale

Chez les poussins avant hiver et après hiver, la masse protéique de la ceinture pelvienne est supérieure (de respectivement 73 g et 58 g en moyenne) à celle de la ceinture pectorale ($p < 0,001$) (Figure 6). À l'inverse, chez les adultes, la masse protéique de la ceinture pectorale est 4 fois plus élevée que celle de la ceinture pelvienne ($p < 0,001$) (Figure 6).

Histoenzymologie

Le typage des fibres et leurs analyses (proportion et morphométrie) ont été réalisés sur un muscle des ceintures pelvienne (*Gastrocnemius lateralis*) et pectorale (*Pectoralis major*). De manière respective, ces muscles sont essentiellement impliqués dans la locomotion terrestre et la nage subaquatique (Figure 11).

Gastrocnemius lateralis

Pour le *Gastrocnemius lateralis* (GL), des fibres lentes (type SO) et rapides de type FOG ont été mise en évidence dans les deux groupes de poussin ainsi que chez les adultes (Figure 11). Il n'y a pas de corrélation significative entre l'aire des fibres rapides et lentes du GL et la masse corporelle des poussins ($R^2 \leq 0,126$; $p \geq 0,064$) (Figure 12).

La proportion des fibres rapides, leur aire ainsi que celle des fibres lentes dans le GL ne présentent pas de différences entre les deux groupes de poussins ($p \geq 0,309$) (Tableau 2).

Cependant, l'aire des fibres rapides est presque 2 supérieure à celle des fibres lentes ($p < 0,001$).

Chez les adultes, il n'y a pas de différence significative entre l'aire des fibres lentes et rapides ($p = 0,759$). La proportion et l'aire des fibres rapides ne diffèrent pas entre les deux groupes de

poussins ($p \geq 0,661$) (Tableau 2). Cependant, l'aire des fibres lentes est plus de 2 fois plus importante par rapport à celle des poussins ($p \leq 0,002$) (Tableau 2).

Pectoralis major

Dans le *pectoralis major*, les fibres musculaires mis en évidence sont toute rapides de type FOG (Tableau 2). Il existe une corrélation linéaire positive entre la masse corporelle et l'aire des fibres rapides pour les poussins avant hiver ($R^2=0,804$; $p<0,001$; $y=216,69x-770,47$). Concernant le groupe de poussins après hiver, une telle corrélation est inexistante ($R^2=0,1017$; $p=0,074$) (Figure 12). L'aire des fibres rapides ne diffère pas significativement entre des deux groupes de poussins ($p=0,409$), alors que celle des adultes est plus de 7 fois plus importante que dans les deux groupes de poussins ($p<0,001$) (Tableau 2).

Gastrocnemius lateralis vs. *Pectoralis major*

Au niveau des groupes de poussins avant et après hiver, la moyenne de l'aire des fibres rapides du GL est supérieur (d'un facteur de 5) à celle du Pec maj ($p<0,001$) (Tableau 2 et Figure 11). À l'inverse, chez l'adulte aucune différence significative n'a été mise en évidence entre l'aire des deux types de fibres ($p=0,674$).

Composition en isoformes de chaînes lourdes de myosine

Dans le *Pectoralis major*, la bande 1 est l'unique isoforme détectée pour les deux groupes de poussins et les adultes (Tableau 3 et figure 13).

Concernant le *Gastrocnemius latéralis*, deux isoformes (bandes 1 et 4) ont été observés pour les trois groupes étudiés (Figure 13). La bande 1 est l'isoforme prédominante et son pourcentage relatif (82-90%) ne varie pas significativement entre les poussins (avant et après hiver) et les

adultes ($P=0,100$). La part de la bande 4 est plus faible que la bande 1 (10-18%) et aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les trois groupes ($P> 0,350$).

Pour l'Iliotibialis cranialis, les bandes 1 et 3 ont été détectées chez les poussins avant hiver (Tableau 3, figure 13). La proportion de la bande 1 est majoritaire ($67,8 \pm 6,4\%$) par rapport à la bande 3 ($32,2 \pm 6,4$). Dans le groupe de poussins après hiver et les adultes, la présence des bandes 1 et 4 a été observée alors que la bande 3 est inexistante. Le pourcentage relatif de la bande 1 ne varie pas entre les trois groupes ($P>0.360$). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les poussins après hiver et les adultes concernant la proportion relative de la bande 4 ($P=0.087$).

DISCUSSION

Tout d'abord la comparaison, en termes de masse corporelle et de stature, des individus du groupe de poussins avant hiver de cette étude avec des poussins nourris régulièrement et d'âge connu (Verrier, 2003) montre qu'il n'existe aucun décalage entre ces deux populations. Autrement dit, si un des poussins avait été dans un état de malnutrition, pour un même indice statural, la masse corporelle aurait été inférieure à celle de leurs congénères nourris régulièrement. Ainsi, l'échantillon considéré dans cette étude (uniquement les poussins récupérés avant l'hiver austral) semble représentatif des poussins en première phase de croissance.

Approche dynamique de la croissance et évolution morpho-fonctionnelle de la musculature pelvienne et pectorale avant l'hiver austral.

Après l'émancipation thermique et l'acquisition de la locomotion terrestre, la masse corporelle des poussins est plus que doublée en 4 mois et l'indice d'adiposité est augmenté d'environ 8 fois. Ainsi l'adiposité des poussins est deux fois plus élevée que celle des adultes avant l'hiver. Cet

engraissement extrême déjà observé dans une autre étude menée chez cette même espèce (Cherel *et al.*, 1993) peut être considéré comme une réponse adaptative directe aux conditions hivernales auxquelles doivent faire face les poussins au terme de leur première phase de croissance.

Du point de vue du développement musculaire, une diminution du rapport de la masse protéique totale de la ceinture pelvienne sur celle de la pectorale a été observée. Ainsi la vitesse de croissance de la ceinture pectorale est plus élevée que dans la ceinture pelvienne chez les poussins en fin de première période de croissance, leur masse protéique étant multipliée respectivement par un facteur 10 et 1,5. La dynamique de croissance relative de ces deux ceintures est donc inversée chez les poussins émancipés par rapport aux poussins âgés de moins de 2 mois (Partie I). Cependant, contrairement aux muscles de la ceinture pelvienne, la masse protéique de la ceinture pectorale des poussins avant hiver reste beaucoup plus faible par rapport à celle des adultes (facteur 8).

La masse protéique, bien qu'étant un indicateur du développement musculaire, ne fournit pas d'information précise sur les capacités contractiles et le métabolisme des fibres musculaires. Ainsi, les études de la typologie des fibres et de la composition en isoforme de chaîne lourde de myosine ont servi à compléter nos données.

Les études menées sur le *Gastrocnemius lateralis* (GL), un muscle de la locomotion terrestre, révèlent la présence majoritaire (> 90%) de fibres rapides de type FOG ainsi que d'un petit pourcentage de fibres lentes (I). Ces résultats sont relativement similaires à ceux obtenus chez d'autres espèces d'oiseaux tels que le manchot empereur (*Aptenodytes forestri*) ou le canard colvert (*Anas platyrhynchos*), bien que chez ces deux dernières espèces la proportion de fibres de type FOG semble plus faible (respectivement 77 et 80%) (Ponganis *et al.*, 1997 ; Torrella *et al.*, 1996). Cette étude a également permis de montrer que les aires moyennes des fibres rapides, leurs proportions ainsi que la composition en isoforme de chaîne lourde de

myosine n'étaient pas significativement différentes de celles des adultes. Ces fibres assureront donc un effort musculaire maximal lors de la marche ou de la course. Cette efficacité très précoce des fibres FOG semble donc primordiale pour permettre aux poussins de se mouvoir au sein la colonie, d'échapper à de potentiels prédateurs, et donc finalement de survivre seuls durant les voyages alimentaires en mer des deux parents. Cependant, la moyenne de l'aire de section transversale des fibres lentes est plus de 2 fois plus petites chez les poussins par rapport à celle des adultes. Il est possible que cette différence morphométrique résulte d'une sollicitation différentielle de ce type de fibres entre les poussins et les adultes. Les fibres de type lent, ont généralement un rôle important dans le maintien de la posture (Suzuki *et al.*, 1985). Or les adultes ont une masse corporelle nettement supérieurs à celle des poussins. La taille des fibres musculaires étant déterminante pour une production optimale de la force mécanique (Olson, 2001), il est probable qu'une taille plus importante de ces fibres musculaires soit nécessaire chez les adultes afin de fournir la force de contraction indispensable au maintien de la position debout.

L'accrétion protéique au niveau de la ceinture pectorale est plus importante que celle de la ceinture pelvienne durant la fin de la première période de croissance. Ce résultat est très différent de celui mis en évidence durant la période qui précède l'émancipation. En effet, au cours des deux premiers mois de vie, le poussin développe en priorité les muscles de la ceinture pelvienne au détriment des muscles de la ceinture pectorale afin d'acquérir rapidement une locomotion bipède. Puis, à l'émancipation du poussin, lorsque la locomotion terrestre est effective, il semblerait que le jeune manchot investisse dans le développement des muscles de la ceinture pectorale.

Dans le *Pectoralis major* (Pec maj), seules des fibres de type rapides oxydo-glycolytiques (FOG) ont été mise en évidence, conformément à ce qui peut être observé chez d'autres espèces telles que le pic flamboyant (*Colaptes auratus*) ou le martin pêcheur d'Amérique (*Megasceryle alcyon*),

par exemple (Rosser *et al.*, 1996). Cette composition en fibres correspond ainsi à un exercice qui sollicite le muscle de manière soutenue afin d'effectuer des vols (aérien ou subaquatique) de longue durée. L'aire de la section transversale des fibres rapides augmente d'un facteur 4 au cours de cette période. De plus, concernant les protéines contractiles, et en accord avec les résultats obtenus par Erbrech *et al.* (2011), les fibres musculaires du Pec maj présentent la même composition en isoformes de chaîne lourde de myosine que les adultes.

Chez ces oiseaux le Pec maj est considéré comme étant le principal site responsable de la thermorégulation avec et sans frisson (Duchamp *et al.*, 1989). Par ailleurs, d'après Olson (2001), le développement des capacités thermorégulatrices sont dépendantes du développement morphométrique des fibres et de la maturation du tissu musculaire. Dans ce cas, le développement et la maturation du Pec maj permettrait d'assurer une part importante de la thermorégulation des poussins durant l'hiver.

Néanmoins, la masse protéique de ce tissu ainsi que la taille des fibres musculaires restent significativement inférieures à celles des adultes (d'un facteur 20 et 4, respectivement). Ainsi, le stade de croissance et de maturation du Pec maj semble suffisant pour assurer des fonctions thermorégulatrices, mais très éloigné du degré de développement maximal observé chez les adultes nageurs-plongeurs. Ce phénomène semble être issu d'un compromis énergétique entre le développement nécessaire du tissu musculaire pour lutter contre le froid et la limitation des dépenses énergétiques liées au maintien de ce même muscle pendant le jeûne hivernal (Cherel *et al.*, 1993).

Impact des conditions environnementales au cours de l'hiver austral sur la musculature pelvienne et pectorale des poussins.

La masse corporelle des poussins collectés après l'hiver a diminuée plus de 2 fois et leur indice d'adiposité d'environ 20 fois par rapport aux poussins en fin de première phase de croissance.

Au niveau de la ceinture pelvienne, la masse protéique totale diminue de 36% entre les groupes avant et après hiver. Dans le GL, l'analyse morpho-fonctionnelle ne présente aucun impact de l'hiver sur la proportion de ce muscle dans la ceinture pelvienne, sur l'aire de la section transversale des fibres musculaires (SO et FOG) ainsi que la proportion de ces fibres et la composition en protéines contractiles de ce muscle. L'*Iliotibialis cranialis* semble plus affecté par l'hiver car sa proportion dans la ceinture pelvienne diminue de 22% environ cependant la composition en isoformes de chaînes de lourdes de myosine de ce muscle est identique à celle de l'adulte. L'impact de l'hiver austral est donc inégal au niveau des deux muscles la ceinture pelvienne.

La masse protéique totale de la ceinture pectorale est plus altérée que celle de la ceinture pelvienne après la période hivernale (elle est réduite de 49% après l'hiver).

La proportion relative des trois muscles de la ceinture pectorale (*Pectoralis major*, *Pectoralis minor* et *Scapulohumeralis caudalis*) diminuent chez les poussins après hiver. Cependant, l'aire moyenne des fibres FOG du Pec maj ainsi que la composition en isoformes de chaînes lourdes de myosine ne varie pas significativement entre les poussins avant et après hiver.

Leur fonction éventuelle dans la thermorégulation pourrait alors potentiellement avoir été maintenue tout au long de l'hiver, si nous considérons que les capacités thermorégulatrices sont dépendantes du degré de maturation des muscles (Olson, 2001 ; Duchamp *et al.*, 2002).

Enfin, l'effet mineur de la restriction alimentaire hivernale sur la ceinture pelvienne par rapport à la ceinture pectorale est à relier avec le statut d'oiseaux marcheurs des poussins de manchot royal

et à la nécessité de maintenir des capacités de marche les plus efficaces possibles afin d'assurer la survie face notamment aux prédateurs.

En conclusion, ce travail aura permis une analyse relativement poussée de la préparation des poussins de manchot royal à l'hiver austral du point de vue de leur musculature et de leurs réserves lipidiques. Avant l'hiver, nous avons mis en évidence une croissance particulièrement rapide des muscles de la ceinture pectorale par rapport à ceux de la ceinture pelvienne, même si ces derniers restent plus développés. En accord avec Cherel *et al.* (1993), l'adiposité augmente fortement avant l'hiver en vue de la restriction alimentaire à laquelle les poussins devront faire face. Après la période hivernale, les réserves lipidiques ont quasiment été épuisées et la masse protéique totale des deux ceintures a diminué. Toutefois, l'impact de l'hiver a été plus important au niveau des muscles de la ceinture pectorale. Au vue de l'accrétion protéique avant l'hiver dans la ceinture pectorale et sachant que celle-ci n'a pas de rôle locomoteur évident pendant cette période de vie du poussin, il semblerait que les muscles de cette ceinture servent principalement de réserve en acides aminés pendant l'hiver.

Cependant, la méthode de prélèvement n'a pas donné la possibilité d'effectuer un suivi, avant et pendant l'hiver, des poussins. En effet, pour les jeunes manchots récupérés à la sortie de l'hiver, nous ne disposons d'aucunes données concernant l'état des réserves énergétiques (lipidiques et protéiques) avant la période hivernale. De même, la fréquence de nourrissage nous est inconnue or les poussins peuvent être nourris au mieux toutes les 5 à 6 semaines (Cherel *et al.*, 1987 ; Descamps *et al.*, 2002). De plus, ce groupe de poussins, victimes de prédation, possède une masse corporelle moyenne relativement basse ($3,6 \pm 0,2$ kg) comparée à d'autres individus suivis au cours de précédentes études où cette masse peut atteindre le double (Verrier, 2003).

Nos résultats ne caractérisant qu'une petite portion de la population de manchot royal à la sortie de la restriction hivernale, il serait intéressant de mener cette même étude sur des individus suivis

et dont l'état des réserves énergétiques serait plus favorable en début de deuxième phase de croissance.

Tableau 1 : Effectif, masse corporelle et indice structural moyen (\pm erreur standard) des poussins de manchot royale avant et après hiver et des adultes. L'indice de taille structural est calculé en faisant la somme de la taille de l'aile du bec et du tarse. Les différences significatives entre les groupes sont indiquées par des lettres différentes en exposant ($p < 0,05$).

| Groupe | Effectif | Masse corporelle (kg) | Indice statural (mm) | Indice d'adiposité | Masse protéique totale (g) Ceint pect Ceint pelv |
|----------------------|-----------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--|
| Poussins avant hiver | 16 | 6,3 \pm 0,4 ^b | 297,6 \pm 9,3 ^b | 8,4 \pm 0,6 ^a | 92,9 \pm 16,0 ^b 165,5 \pm 12,3 ^b |
| Poussins après hiver | 12 | 3,6 \pm 0,2 ^c | 335,8 \pm 5,0 ^{a,b} | 0,5 \pm 0,3 ^c | 46,4 \pm 8,7 ^c 104,1 \pm 8,7 ^c |
| Adultes | 9 | 11,78 \pm 0,6 ^a | 375,1 \pm 7,1 ^a | 3,6 \pm 0,5 ^b | 757,8 \pm 34,9 ^a 188,8 \pm 8,8 ^a |

Tableau 2 : Proportion des fibres rapides (FOG) des muscles *Gastrocnémius latéralis* et *Pectoralis major* et l'aire moyenne de la section transversale des différents types de fibres (\pm erreur standard, ES) pour les groupes de poussins de manchot royal avant hiver (P. av. hiv.), après hiver (P. ap. hiv.) et celui des adultes. Une différence significative entre deux groupes est indiquée par des lettres différentes en exposant pour les aires et l'absence de symbole signifie qu'il n'y a pas de différence significative au niveau des proportions ($p < 0,05$).

| | <i>Gastrocnémius latéralis</i> | | | <i>Pectoralis major</i> | | |
|---|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | P. av. hiv. | P. ap. hiv. | Adultes | P. av. hiv | P. ap. hiv. | Adultes |
| Proportion des fibres rapides (%) | 93,3 \pm 1,2 | 93,0 \pm 1,5 | 94,7 \pm 0,9 | 100 | 100 | 100 |
| Aire des fibres rapides (μm^2) | 2077 \pm 152 ^a | 2257 \pm 342 ^a | 2625 \pm 203 ^b | 466 \pm 81 ^a | 338 \pm 45 ^a | 2588 \pm 268 ^b |
| Aire des fibres lentes (μm^2) | 1146 \pm 70 ^a | 1417 \pm 198 ^a | 2467 \pm 355 ^b | - | - | - |

Tableau 3 : Composition relative en isoformes de chaîne lourde de myosine (% , \pm erreur standard, ES) du *Pectoralis major*, *Gastrocnémius latéralis* et *Iliotibialis cranialis* pour les poussins avant hiver, après hiver et les adultes. L'absence de symbole en exposant signifie qu'il n'y a pas de différence significative entre les groupes pour un muscle donné, au niveau d'une même bande.

N.D signifie non détecté

| Groupes | <u>Bande 1 Bande 3 Bande 4</u> | | | n |
|--------------------------------|--------------------------------------|----------------|----------------|----|
| | | | | |
| <i>Pectoralis major</i> | | | | |
| P. av. hiv. | 100,0 | N.D | N.D | 27 |
| P. ap. hiv | 100,0 | N.D | N.D | 12 |
| Adultes | 100,0 | N.D | N.D | 5 |
| <i>Gastrocnemius lateralis</i> | | | | |
| P. av. hiv. | 82,0 \pm 3,3 | N.D | 18,0 \pm 3,3 | 26 |
| P. ap. hiv | 86,5 \pm 3,4 | N.D | 13,5 \pm 3,4 | 12 |
| Adultes | 90,0 \pm 4,2 | N.D | 10,0 \pm 4,2 | 5 |
| <i>Iliotibialis cranialis</i> | | | | |
| P. av. hiv. | 67,8 \pm 6,4 | 32,2 \pm 6,4 | N.D | 27 |
| P. ap. hiv | 93,9 \pm 2,3 | N.D | 6,1 \pm 2,3 | 11 |
| Adultes | 83,1 \pm 0,7 | N.D | 16,9 \pm 0,7 | 4 |

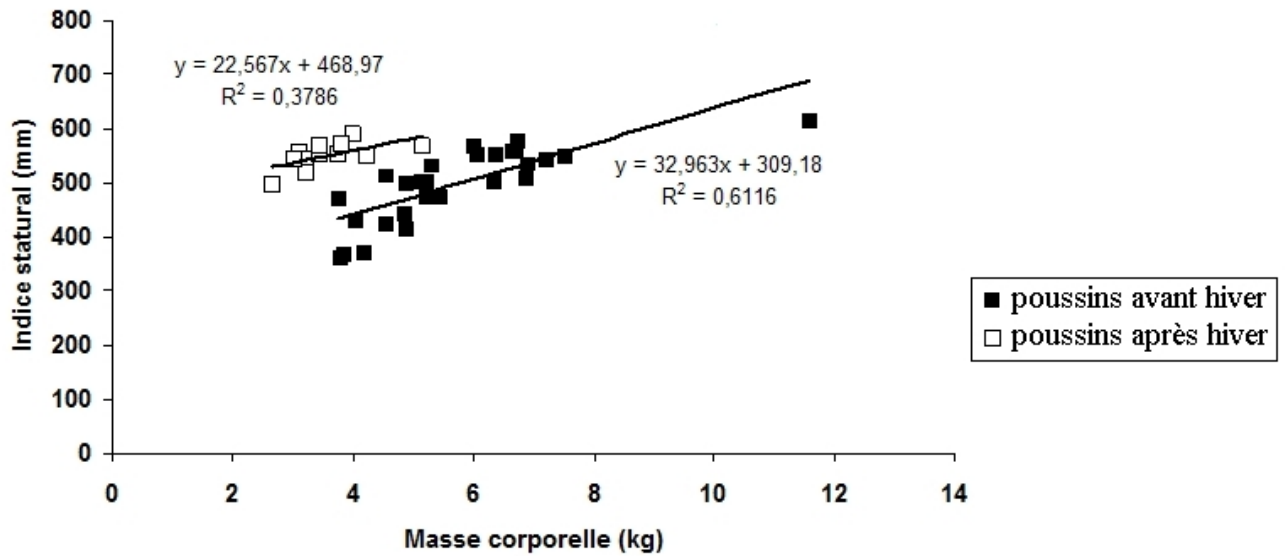


Figure 1 : Indice statural (somme de la taille de l'aile, du bec et du tarse, mm) des poussins avant et après hiver en fonction de leur masse corporelle (kg).

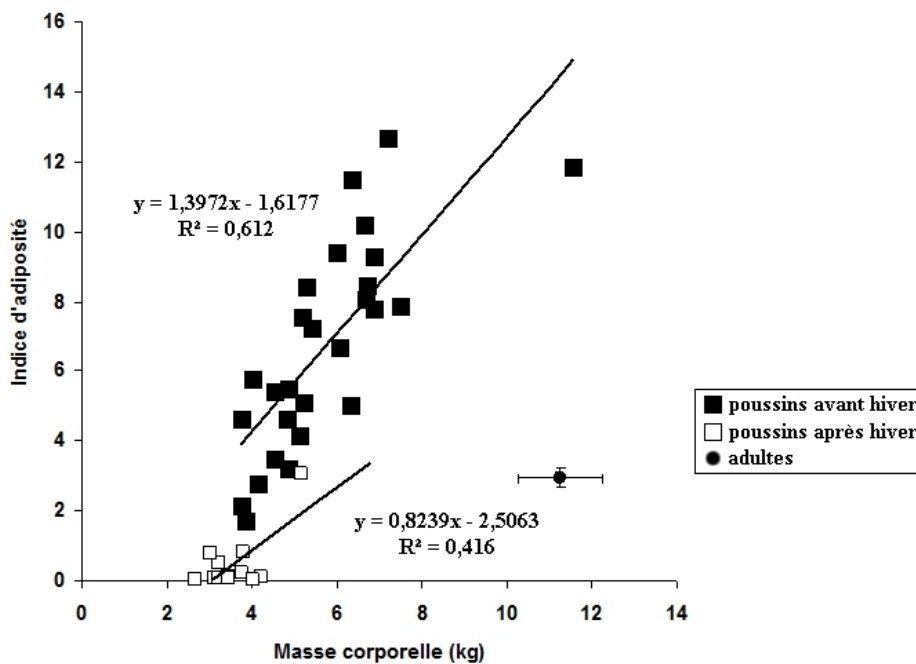


Figure 2 : Indice d'adiposité (masse lipidique sur la masse protéique de la peau) en fonction de la masse corporelle (kg) des poussins avant et après hiver. Pour les adultes, l'indice d'adiposité moyen est donné en fonction de la masse corporelle moyenne (\pm erreur standard).

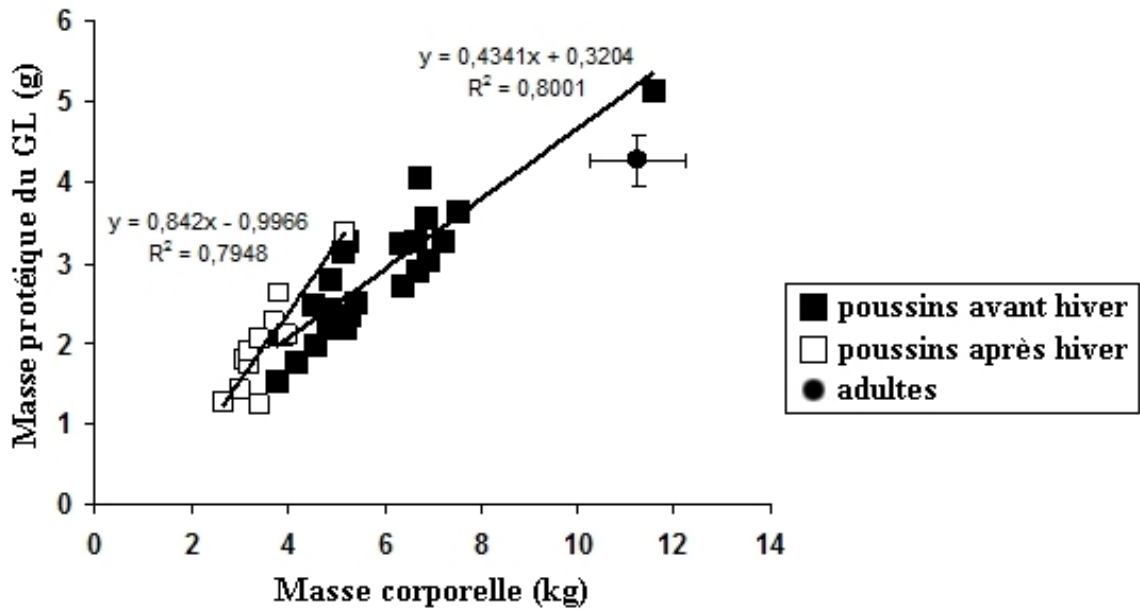


Figure 3 : Masse protéique (g) du *Gastrocnemius lateralis* (GL) en fonction de la masse corporelle (kg) des poussins avant et après hiver. Pour les adultes, la masse protéique moyenne est donnée en fonction de la masse corporelle moyenne (\pm erreur standard).

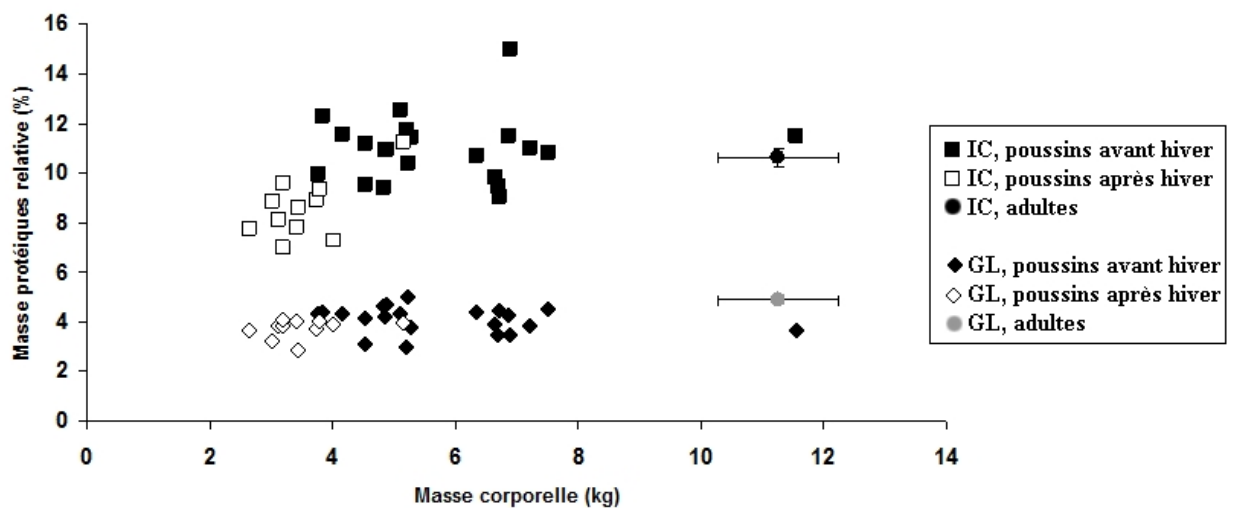


Figure 4 : Masse protéique relative (masse protéique du muscle sur la masse protéique totale de la ceinture pelvienne, %) des muscles *Gastrocnemius lateralis* (GL) et *Iliotibialis cranialis* (IC) en fonction de la masse corporelle (kg). Pour les adultes, la masse protéique moyenne est donnée en fonction de la masse corporelle moyenne (\pm erreur standard).

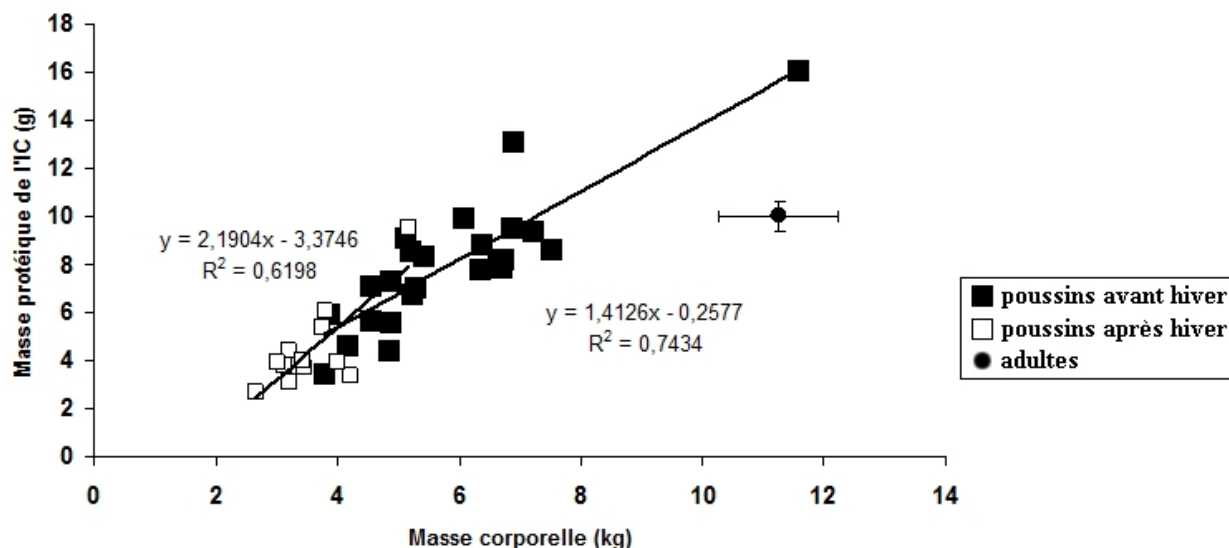


Figure 5 : Masse protéique (g) de l'*Iliotibialis cranialis* (IC) en fonction de la masse corporelle (kg) des poussins avant et après hiver. Pour les adultes, la masse proteique moyenne est donnée en fonction de la masse corporelle moyenne (\pm erreur standard).

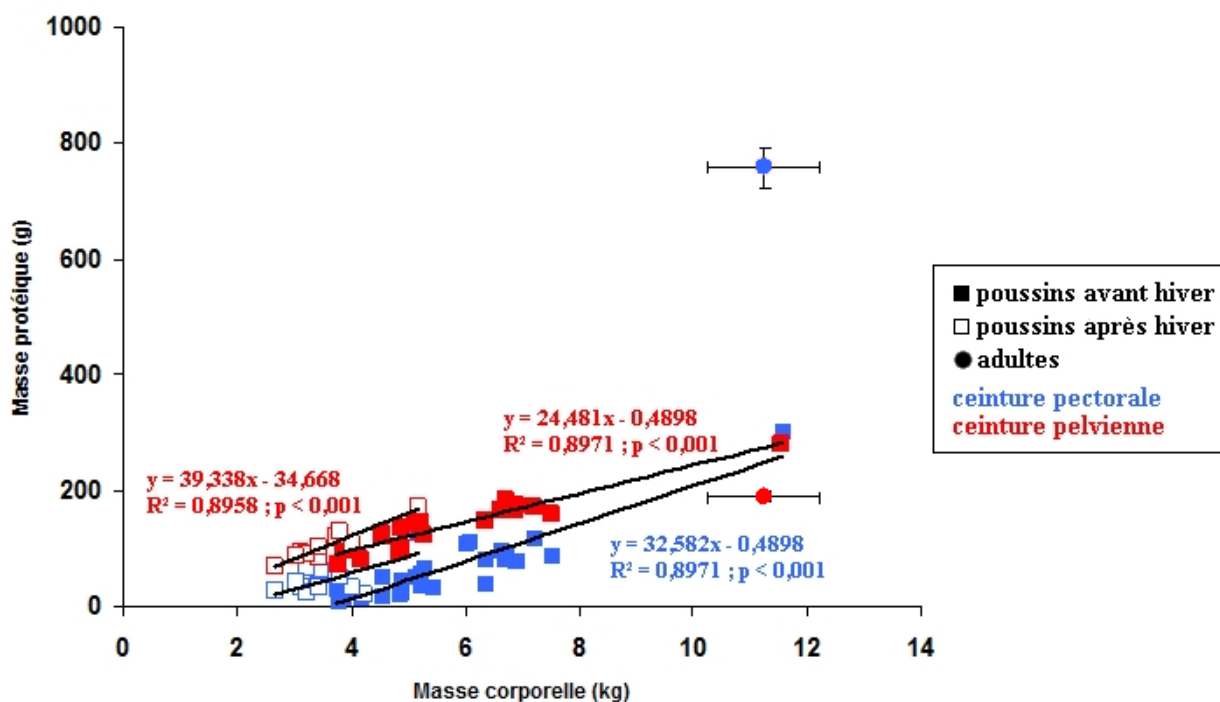


Figure 6 : Masse protéique totale (g) des ceintures pelvienne et pectorale en fonction de la masse corporelle (kg). Pour les adultes, la masse proteique moyenne est donnée en fonction de la masse corporelle moyenne (\pm erreur standard). Régression linéaire du groupe de poussin après hiver concernant la ceinture pectorale : $R^2 = 0,446$; $p = 0,025$; $y = 28,931x - 57,361$).

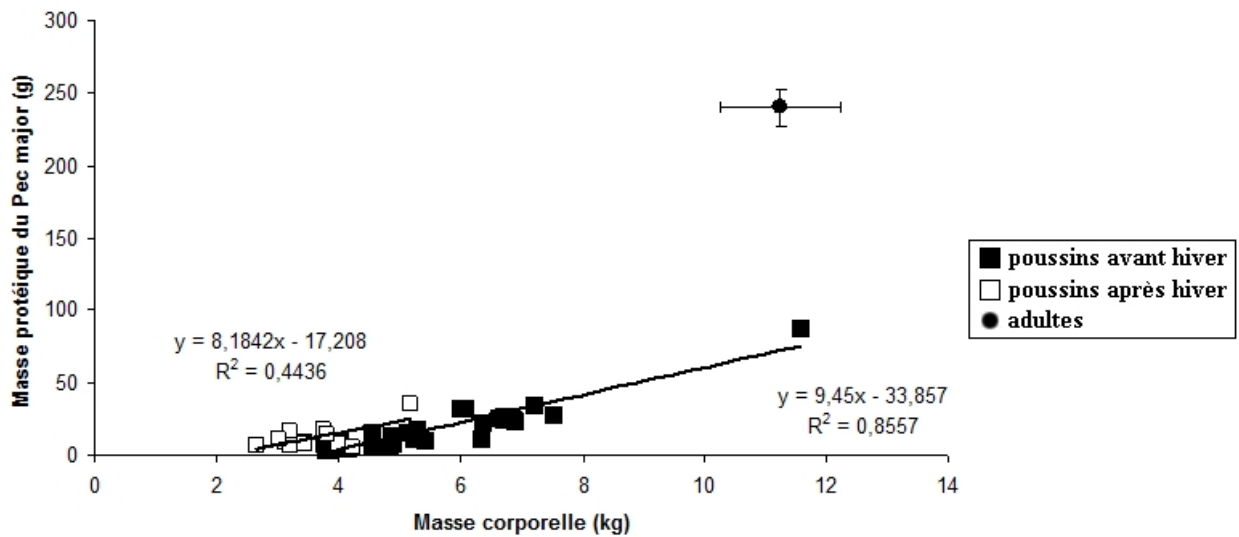


Figure 7 : Masse protéique (g) du *Pectoralis major* (Pec maj) en fonction de la masse corporelle (kg) des poussins avant et après hiver. Pour les adultes, la masse proteique moyenne est donnée en fonction de la masse corporelle moyenne (\pm erreur standard).

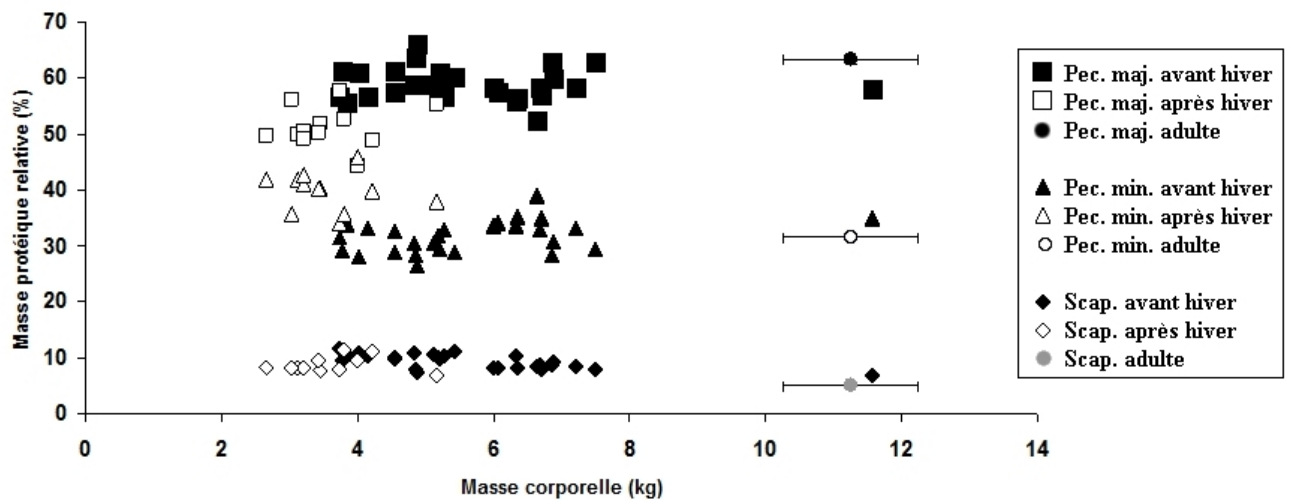


Figure 8 : Masse protéique relative (masse protéique du muscle sur la masse protéique totale de la ceinture pelvienne, %) des muscles *Pectoralis major* (Pec maj), *Pectoralis minor* (Pec min) et *Scapulohumeralis caudalis* (Scap) en fonction de la masse corporelle (kg). Pour les adultes, la masse proteique moyenne est donnée en fonction de la masse corporelle moyenne (\pm erreur standard).

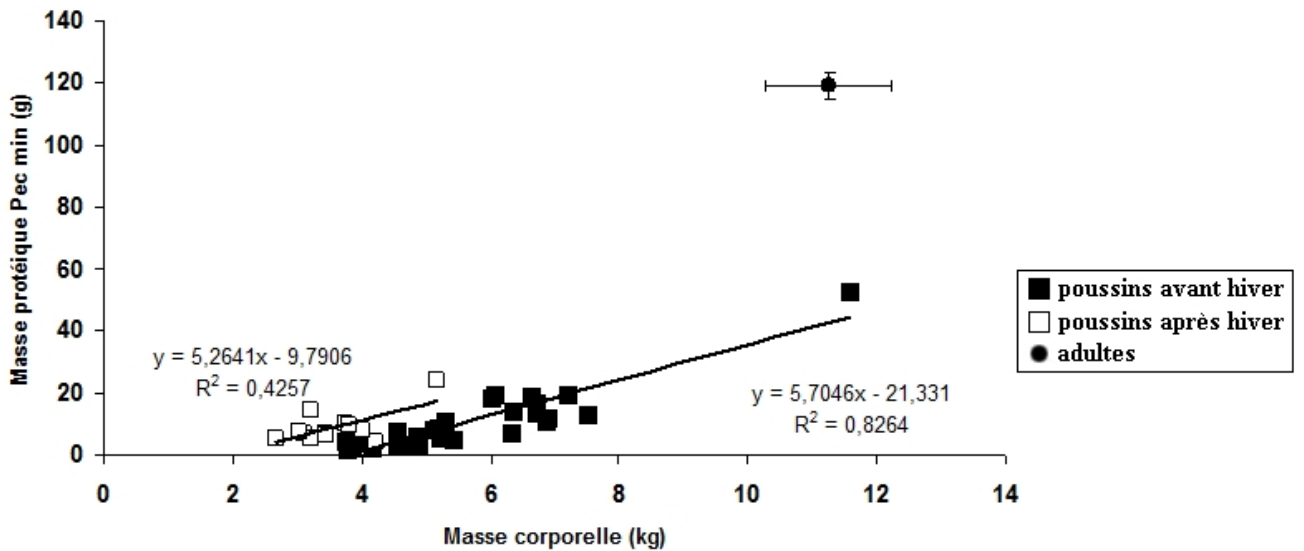


Figure 9 : Masse protéique (g) du *Pectoralis minor* (Pec min) en fonction de la masse corporelle (kg) des poussins avant et après hiver. Pour les adultes, la masse proteique moyenne est donnée en fonction de la masse corporelle moyenne (\pm erreur standard).

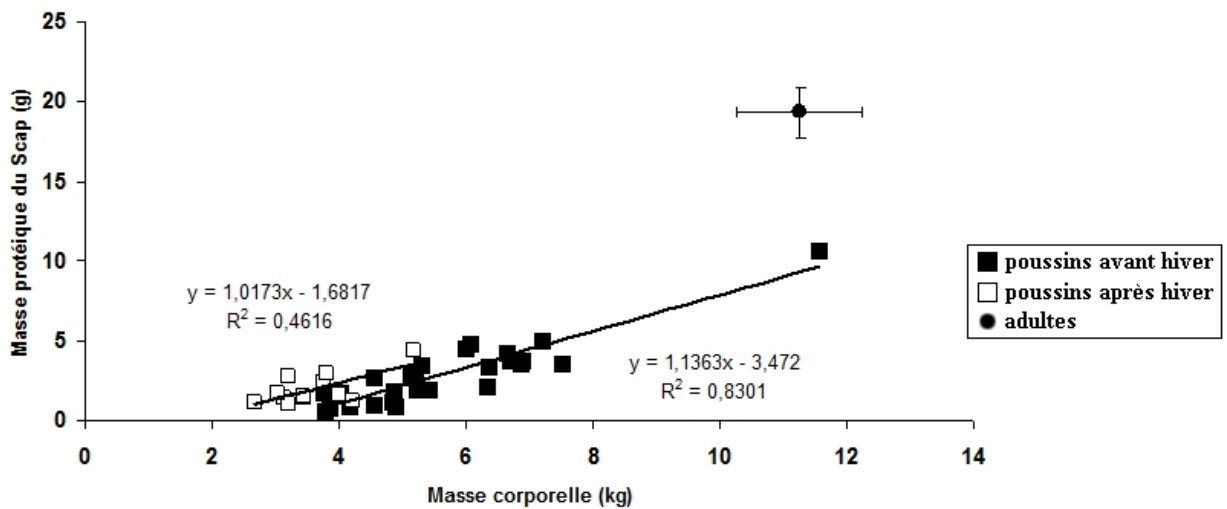


Figure 10 : Masse protéique (g) du *Scapulohumeralis caudalis* (Scap) en fonction de la masse corporelle (kg) des poussins avant et après hiver. Pour les adultes, la masse proteique moyenne est donnée en fonction de la masse corporelle moyenne (\pm erreur standard).

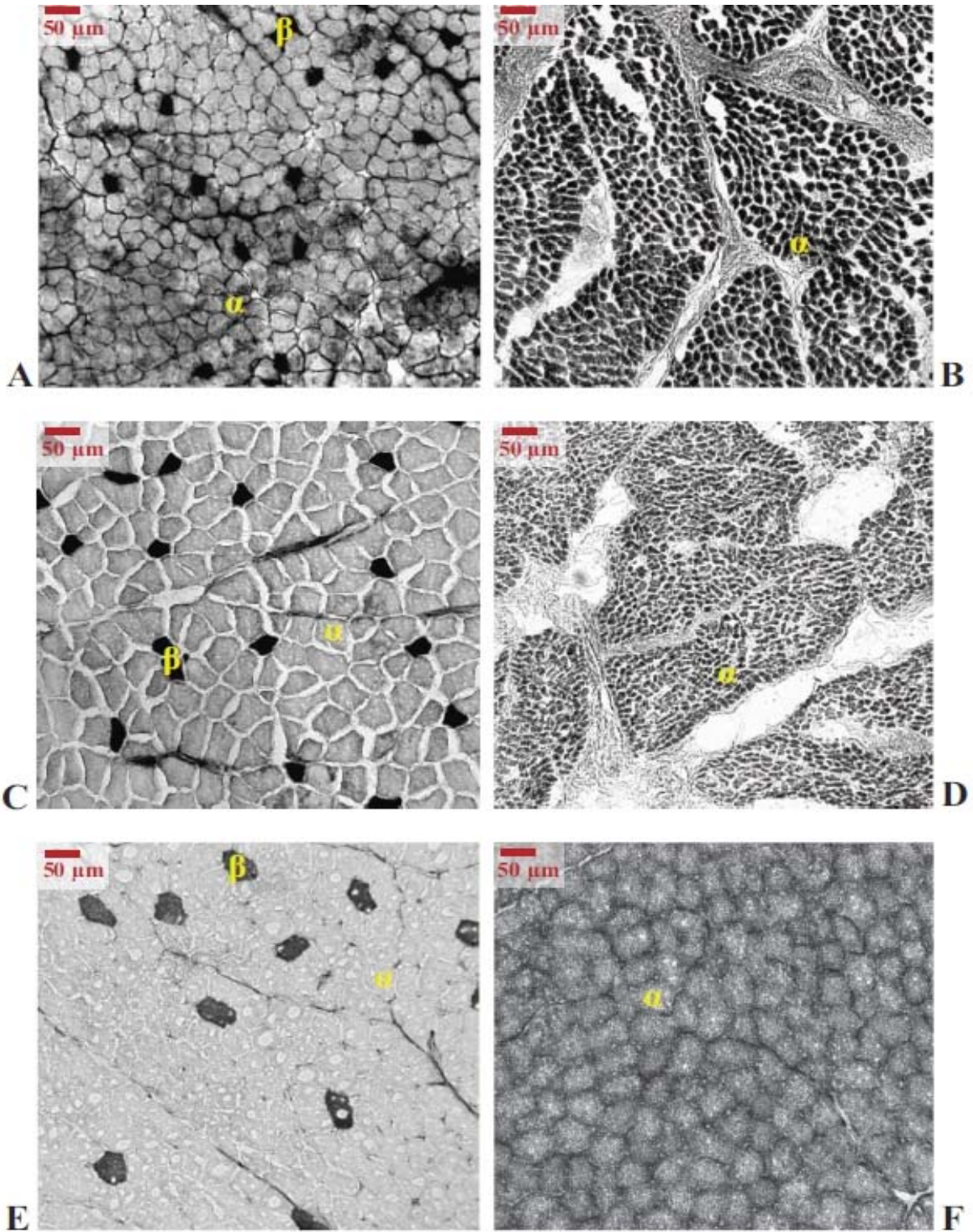


Figure 11 : Coupes transversales du *Gastrocnemius lateralis* colorées pour la mise en évidence de l'activité ATPasique avec préincubation acide (A, C, E) et du *Pectoralis major* colorées pour la mise en évidence de la succino-déshydrogénase (B, D, F) de poussins avant hiver (A,B), après hiver, (C,D) et d'adulte (E,F). α : fibres rapide de type FOG ; β : fibre lentes. Barre = 50 μ m.

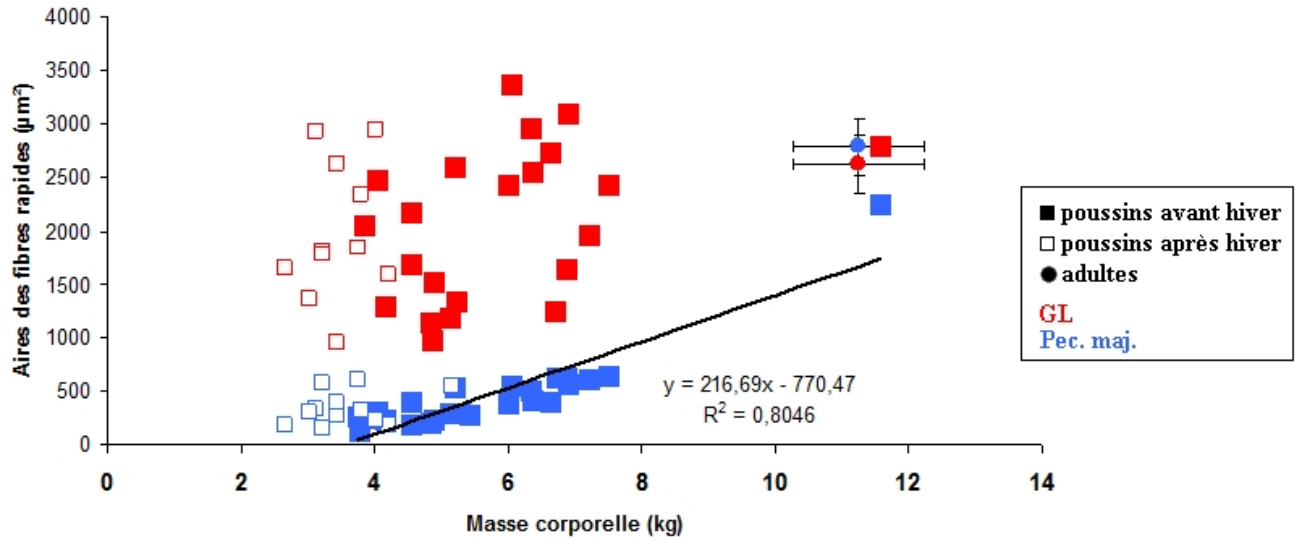


Figure 12 : Aires de la section transversale (μm^2) des fibres rapides (FOG) du *Gastrocnemius lateralis* et du *Pectoralis major* en fonction de la masse corporelle. Pour les adultes, l'aire myenne des fibres est donnée en fonction de la masse corporelle moyenne (\pm erreur standard).

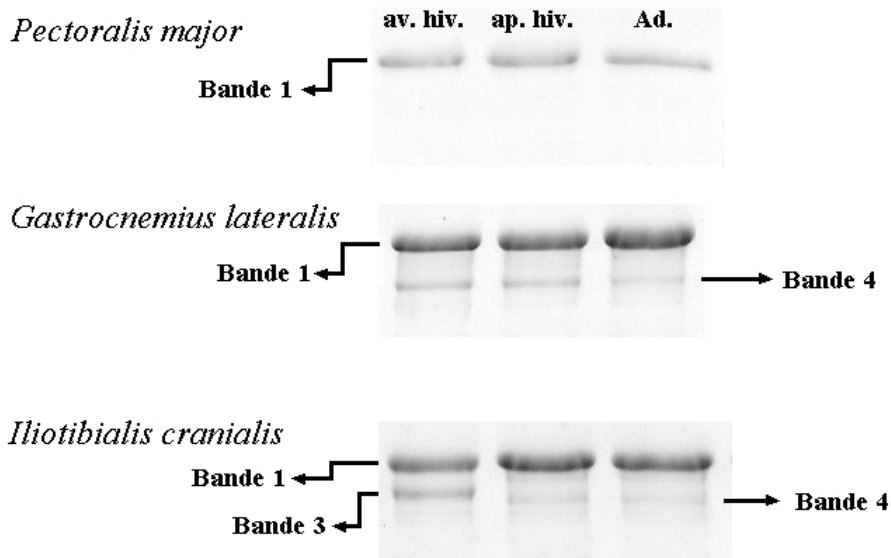
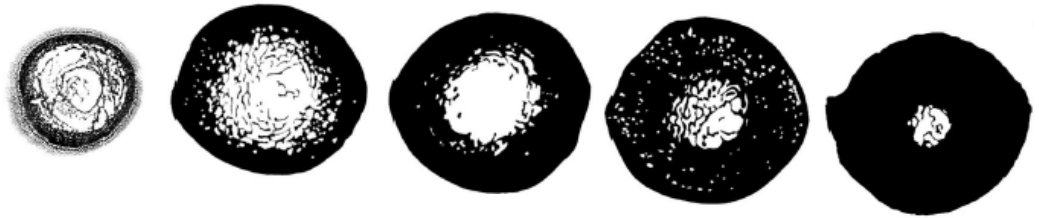


Figure 13 : Profil électrophorétique des isoformes de chaînes lourdes de myosine du *pectoralis major*, du *Gastrocnemius lateralis* et de l'*Iliotibialis cranialis* pour les poussins de manchot royal avant hiver (av. hiv.), après hiver (ap. hiv.) et les adultes (Ad).

Partie III : Développement ontogénétique de la microanatomie des os longs chez le poussin de manchot royal



Partie III

Les muscles et le squelette forment un ensemble fonctionnellement cohérent dont dépend, aux divers stades du développement ontogénique des animaux, l'efficacité de la motricité en général et de la locomotion en particulier. C'est la raison pour laquelle l'intérêt a été porté, dans le cadre de cette thèse, sur l'examen de la structure osseuse des manchots aux divers stades de leur croissance. Il s'agit là, toutefois, de travaux préliminaires visant à identifier les grandes questions relatives à la maturation du squelette qu'il s'agira, ultérieurement, de documenter plus en détail sur un grand nombre d'échantillons.

Cette troisième partie expose les premiers résultats obtenus dans ce domaine. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au développement de la microanatomie de certains os appendiculaires. Notre but était, dans un premier temps, de suivre les modifications de la structure et de la compacité des os longs du squelette appendiculaire au cours de la croissance et de les mettre en relation avec le mode de locomotion des poussins.

INTRODUCTION

La locomotion des oiseaux est généralement associée à la capacité de vol aérien. Cependant, ces animaux occupent des niches écologiques diverses et variées, certaines espèces étant secondairement adaptées au milieu aquatique (Hémery, 2001). Parmi ces dernières, le degré d'adaptation à la « nage » *sensu lato* peut être très différent et semble être le reflet de leur régime alimentaire (Kato *et al.*, 2006 ; Habib et Ruff, 2008). Certains oiseaux, comme par exemple les canards ou les cormorans, pratiquent une locomotion à la fois aérienne et aquatique. Dans ce cas, la fonction de nage est essentiellement assurée par l'activité des membres postérieurs. À l'inverse, les oiseaux marins tels que les manchots effectuent des plongées profondes pour se nourrir. Au cours de l'évolution, ces taxons ont subi de profondes modifications morphologiques et physiologiques ; ils ont notamment perdu leur aptitude au vol aérien au profit du vol

subaquatique. Leurs ailes sont ainsi transformées en palettes natatoires dont la cinématique, directement issue de celle du vol aérien, crée une portance frontale assurant une excellente propulsion en milieu aquatique. Les pattes postérieures, palmées, optimisent la propulsion et l'hydrodynamisme (Bannasch, 1995 ; Watanuki *et al.*, 2003)

Une étude menée par Habib et Ruff (2008) a permis de mettre en relation les caractéristiques structurales des os longs avec le mode de locomotion utilisé par les différentes espèces aviaires. Pour être efficace, la locomotion aérienne nécessite un allègement de l'ensemble du squelette (Cubo et Casinos, 2000 ; Dumont, 2010). Les os des membres sont ainsi composés d'une très vaste cavité médullaire libre, de travées osseuses et entourée d'un cortex compact particulièrement fin (Habib et Ruff, 2008). À l'opposé, les espèces aviaires ayant un mode de vie plutôt aquatique présentent des os appendiculaires beaucoup plus compacts (Habib et Ruff, 2008).

Les oiseaux incapables de voler, comme le cormoran aptère ou le manchot de Magellan, possèdent des os longs particulièrement compacts ce qui induit un alourdissement du squelette. C'est chez les Spheniscidae où cette particularité montre l'expression la plus extrême (Meister, 1962). Ce phénomène bien connu par ailleurs chez certains mammifères tels que les Siréniens (De Buffrénil et Schoevaert, 1989 ; De Buffrénil *et al.*, 2010) pourrait être interprété comme une adaptation à la nage subaquatique. En effet, l'augmentation de la densité du squelette influence nécessairement la flottabilité du corps par un effet de lest ; elle faciliterait, de ce fait la plongée et l'immersion de longue durée. De plus, l'eau étant beaucoup plus dense que l'air (environ 850 fois), l'épaississement des corticales induirait une meilleure résistance des os à la forte viscosité de l'eau et aux pressions élevées qui s'exercent durant la plongée (Habib et Ruff, 2008).

La plupart des études menées sur la compacité du tissu osseux aborde le sujet sous forme de comparaison entre les diverses espèces aquatiques mais peu de travaux se sont plus précisément penchés sur la mise en place de ces adaptations dans une optique ontogénétique.

Le manchot royal est une espèce marine vivant dans les zones subantarctiques. Parfaitement adapté à la vie aquatique, cet animal est capable de plonger jusqu'à 300 mètres de profondeur (Barrat, 1976) et de rester plus de 7 minutes en apnée pour rechercher et capturer ses proies. Les manchots passent les deux tiers de leur vie en mer et ne retournent à terre que pour muer et se reproduire. La période d'élevage du poussin est relativement longue pour un oiseau (environ un an) et sa croissance est interrompue par une période de restriction alimentaire durant l'hiver austral. Le cycle de développement peut ainsi se diviser en trois phases. La première phase de croissance débute à l'éclosion, pendant l'été austral. Incapable de se déplacer et de maintenir sa température corporelle, l'oisillon est constamment sous la protection parentale. Au bout d'un mois environ, la mise en place rapide de la thermorégulation (Duchamp *et al.*, 2002) et de la locomotion terrestre permet au jeune manchot d'acquérir progressivement une première forme d'indépendance. Le poussin est alors laissé seul dans la colonie pendant les voyages alimentaires des adultes. Les jeunes manchots, livrés à eux même se rassemblent alors pour former des crèches qui leur confèrent une protection de masse contre les prédateurs (Stonehouse, 1960). À la fin de l'été, la stature du poussin est proche de celle des adultes (le tarse atteint au moins 90% de sa taille adulte moyenne et l'aileron 75 à 95%) et son adiposité est particulièrement importante (Cherel *et al.*, 1992). La croissance est ensuite interrompue par une période de restriction alimentaire pendant l'hiver austral. Durant cette deuxième phase, les poussins sont nourris plus épisodiquement, au mieux une fois toutes les 5 à 6 semaines (Cherel *et al.*, 1987 ; Descamps *et al.*, 2002) et dans certains cas pas du tout (Cherel et Le Maho, 1985 ; Cherel *et al.*, 1987) pendant 4 à 5 mois. À la fin de l'hiver, la reprise du nourrissage intensif permet aux jeunes manchots d'entamer la troisième phase de leur cycle de développement

caractérisée par une croissance essentiellement pondérale avec une accumulation des réserves énergétiques (Barrat, 1976).

Au printemps, le poussin perd son duvet au profit d'un plumage très semblable à celui de l'adulte. Lorsque cette « mue juvénile » est achevée, le jeune manchot quitte la colonie pour son premier voyage en mer (Barrat, 1976).

Ainsi, au cours de leur développement, le poussin de manchot royal présente respectivement deux phases locomotrices différentes. Les juvéniles acquièrent une locomotion exclusivement terrestre, mais relativement peu active (Stonehouse, 1960 ; Barrat, 1976) dès l'âge d'un mois environ et ils ne passeront à la locomotion subaquatique que 10 à 12 mois après l'éclosion.

Le but de la présente étude est de décrire les modifications de structure qui peuvent survenir pendant la croissance osseuse de cet animal marin. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'évolution de la compacité des os appendiculaires.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Prélèvements

Les échantillons ont été collectés dans la colonie de manchots royaux de la Baie du Marin, située sur l'île de la Possession dans l'archipel de Crozet (46° 26' S, 51° 52' E, Océan Indien). Cette colonie est localisée près de la base scientifique Alfred Faure où environ 25 000 couples de manchots viennent chaque année se reproduire.

Le prélèvement des os longs a été effectué sur 14 poussins et 8 adultes (non en mue) pendant des missions sur les îles Crozet en 1998 et 2000. Les animaux étaient, pour la plupart victimes de prédation par des pétrels (*Macronectes halli et gigantus*). Les poussins ont été classés en quatre groupes selon leur stade de développement (Tableau 1). Pour chaque individu, l'étude a porté sur deux os des membres antérieurs (humérus et radius) et deux des membres postérieurs (fémur et tibiotarse).

Microanatomie et histologie

Des coupes transversales mi-diaphysaires ont été effectuées sur les quatre os appendiculaires. La zone mi-diaphysaire a été au préalable localisée par radiographie (Fig1) et correspond au point initial de pénétration des vaisseaux sanguins dans la diaphyse, lorsque l'ébauche cartilagineuse de l'os commence son processus d'ossification. Cette région est, ontogénétiquement, la plus ancienne et présente la plus forte épaisseur corticale. Des lames minces d'os sec de 100 à 150 μm d'épaisseur et orientées transversalement à l'axe de l'os ont été réalisées selon la procédure communément employée à cette fin (e.g. De Buffrénil et Mazin, 1989). Pour le recueil des données morphométriques, chaque section a été dessinée à l'échelle à l'aide d'une chambre claire montée sur une loupe binoculaire (grossissement 30-50x). Toutes les cavités internes des os (espaces inter-trabéculaires, lacunes de résorption, canaux vasculaires, cavité médullaire) d'un diamètre supérieur à 20-30 μm ont été représentées. Les dessins ont ensuite été numérisés et convertis en images binaires grâce au logiciel Photoshop CS4 pour être analysés au moyen du logiciel Bone Profiler (Girondot et Laurin, 2003).

Dans son principe, ce logiciel mesure la compacité locale de l'os (pourcentage de la surface réellement occupée par le tissu osseux) dans 60 secteurs radiaires, eux-mêmes subdivisés en 51 bandes parallèles, depuis la surface périphérique de l'os jusqu'à son centre. L'information de base est donc distribuée sur 3060 cellules ponctuelles, topographiquement définies par leur distance par rapport au centre géométrique de l'os. Sur cette base, le logiciel définit un profil de compacité intégratif, sous la forme d'une courbe sigmoïde (Fig 2) où apparaissent de multiples paramètres parmi lesquels on retiendra ici :

C_g : la compacité globale de la section (rapport sans unité ; varie de 0 à 1)

S : lié à la pente de la sigmoïde, ce paramètre reflète la largeur de la zone de transition entre le cortex et la cavité médullaire.

P : distance du centre de l'os au point d'inflexion de la pente, divisé par le rayon moyen de l'os. La signification de l'indice P est comparable à celle de l'indice cortico-diaphysaire utilisé antérieurement et traduit la taille relative de la cavité médullaire.

Taux de minéralisation

Afin d'apprécier la charge minérale du tissu osseux chez l'adulte et le poussin, des sections (1 à 2 mm d'épaisseur) ont été pratiquées dans l'humérus, le radius, le fémur et le tibiotarse de 5 individus : quatre adultes et le poussin n° 100, poussin émancipé de 1 mois (cf. Tableau 4). Ces sections ont été soigneusement déshydratées, dégraissées et nettoyées de tout résidu de tissu non-osseux avant d'être pesées (± 0.0001 g), puis incinérées à la température de 900°C durant 8 heures. Le taux de minéralisation (en %) est donné par le rapport du poids des cendres sur le poids initial de la section osseuse.

Compte tenu du faible effectif des groupes correspondant aux différents stades de développement (voir tableau 1) aucune analyse statistique n'a été effectuée pour l'instant.

Observations histologiques

Pour les descriptions histologiques, chaque section osseuse a été observée aux grossissements faibles (x40) et moyens (x400) du microscope optique, en éclairage transmis, naturel ou en lumière polarisée.

RÉSULTATS

Croissance en diamètre des os longs

Le diamètre moyen de l'humérus et du radius (os non cylindriques) augmente d'un facteur de 2 entre l'émancipation du poussin (groupe A) et la fin de la première phase de croissance (Tableau 2). Concernant les os appendiculaires des membres postérieurs, la croissance diamétrale

est légèrement plus faible (facteur 1,3) entre les groupes A et B. À la fin de la première phase de croissance, l'humérus, le fémur et le tibiotarse atteignent en moyenne plus de 90 % du diamètre de l'os adulte. La seule exception est le radius qui ne représente que 86 % du diamètre adulte.

Évolution de la structure interne des os (Tableau 3)

Les coupes des poussins émancipés âgés de 1-2 mois n'ont pas pu être analysées avec le logiciel Bone Profiler.

Compacité globale de la section osseuse (paramètre Cg)

En fin de première phase de croissance, la compacité du fémur et du tibiotarse est de 20% supérieure à celle des os longs des membres antérieurs (humérus et radius). À ce stade du développement, la compacité du tibiotarse est la plus élevée ($0,826 \pm 0,021$) par rapport aux autres os et représente déjà 92% de la valeur que l'on retrouve chez les adultes ($0,893 \pm 0,021$). Entre la fin de la première phase de croissance et le stade de mue, l'augmentation de la compacité osseuse semble être plus progressive pour le fémur, l'humérus et le radius. Finalement, lorsque les poussins sont en mue, les os des membres postérieurs et antérieurs atteignent respectivement 95 et 87% de la compacité des adultes.

Aucun effet de l'hiver sur la compacité des os n'a été mis en évidence dans ces premiers résultats. Cependant, chez les spécimens en mue, on peut observer une légère diminution de la compacité globale du tibiotarse (2%) par rapport aux poussins en fin d'hiver. Ce résultat est à prendre avec précaution compte tenu du faible effectif dont nous disposons. Chez les adultes, la compacité osseuse semble être la plus élevée dans le fémur et l'humérus ($0,940 \pm 0,009$ et $0,930 \pm 0,017$, respectivement) puis viennent le tibiotarse ($0,893 \pm 0,021$) et le radius ($0,836 \pm 0,027$).

Taille relative de la cavité médullaire (paramètre P)

Chez les poussins en fin de première phase de croissance, la taille relative de la cavité médullaire dans l'humérus, le radius et le fémur sont quasiment équivalentes ($0,530 \pm 0,010$; $0,511 \pm 0,031$; $0,471 \pm 0,071$, respectivement). Pour le tibiotarse, ce paramètre est environ 30% inférieur à celui des autres os appendiculaires ($0,336 \pm 0,091$).

Entre la fin de la première phase de croissance et la mue des poussins, la taille relative de la cavité médullaire diminue progressivement pour tous les os étudiés (environ 30% pour l'humérus et le radius, et 20% pour le fémur et le tibiotarse).

Chez les adultes, la taille de la cavité médullaire des deux os du membre antérieur ainsi que du fémur s'est encore réduite par rapport au groupe de poussins en mue. Cette réduction relativement importante dans l'humérus (d'un facteur 3) est moins prononcée pour le radius (facteur 2), le tibiotarse (facteur 1,7) et le fémur (facteur 1,4).

Transition entre le cortex et la cavité médullaire (paramètre S)

Chez les poussins en fin de première phase de croissance, la largeur relative de la transition entre la région médullaire et le cortex semble relativement similaire pour les os des membres antérieurs (humérus et radius) et le tibiotarse ($0,163 \pm 0,015$; $0,172 \pm 0,012$; $0,150 \pm 0,016$, respectivement). En revanche, dans le fémur, le paramètre *S* est plus faible que dans les autres os d'un facteur de 2,5 ; cet os conservant une organisation tubulaire assez nette en dépit de l'épaisseur de son cortex.

Entre les poussins en fin de première phase de croissance et ceux à la sortie de l'hiver, la zone de transition medulla/cortex diminue dans tous les os longs étudiés. Cette réduction est particulièrement importante dans le tibiotarse où ce paramètre perd plus de 50% de sa valeur entre la fin de la première phase de croissance et le début de la deuxième (de $0,150 \pm 0,016$ à $0,060 \pm 0,026$).

Durant la deuxième phase de croissance, la zone de transition entre la medulla et le cortex ne semble pas varier dans les os du membre postérieur (fémur et tibiotarse). Elle est cependant légèrement réduite de 12% environ dans le radius, tandis qu'elle augmente de 14% dans l'humérus.

En comparant les poussins en mue avec le groupe des adultes, la zone de transition medulla/cortex a légèrement augmentée dans le fémur (de $0,034 \pm 0,002$ à $0,043 \pm 0,020$) alors qu'une diminution peu prononcée est observée pour le radius (de $0,127 \pm 0,02$ à $0,119 \pm 0,011$). Pour le tibiotarse et l'humérus adulte, la diminution de ce paramètre est beaucoup plus importante et représente plus de 50% par rapport aux poussins en mue.

Remarque sur le taux de minéralisation des os (Tableau 4)

Les données préliminaires figurant au tableau 4 montrent que les os des adultes sont très sensiblement plus minéralisés que ceux du poussin n° 100 (groupe A, poussin émancipé), notamment dans le cas de l'humérus. Le taux de minéralisation moyen des os des adultes semblent relativement homogènes, avec un écart maximum inférieur à 2% (fémur/radius). Comparativement au taux de minéralisation moyen observé dans les os longs des tétrapodes, (65 à 66 %) les os des manchots paraissent légèrement hyperminéralisés. Cette caractéristique, combinée à une forte compacité, tend à conférer aux os des adultes une densité élevée.

Observations histologiques

Dans cette partie, nous allons décrire l'évolution générale de la microanatomie et de l'histologie des os appendiculaires durant la croissance des poussins (Figures 3 et 4).

Chez les poussins âgés de 1-2 mois, tous les os appendiculaires montrent des corticales spongieuses dont les travées, courtes et épaisses réalisent soit une structure isotrope (en nid d'abeilles), dans la profondeur des corticales, soit une structure fortement anisotrope, avec des travées d'orientation radiaire (périphérie des corticales). Histologiquement, le tissu

osseux formant toutes les travées est de type « à fibres enchevêtrées », avec de grosses lacunes ostéocytaires disposées sans ordre et une réaction de monoréfringence caractéristique en lumière polarisée (absence d'organisation spatiale dominante de la trame collagénique). La zone médullaire contient une spongieuse à texture très lâche. De l'émancipation des poussins jusqu'à la fin de la première phase de croissance, le cortex devient plus compact sous le double effet, d'une part, de la fermeture des espaces inter-trabéculaires par des dépôts centripètes d'os endostéal du type dit « à fibres parallèles » (biréfringence en masse du tissu) et, d'autre part, de l'accrétion sous périostique de tissu osseux d'emblée compact.

Pendant l'hiver, l'accrétion de tissu osseux sur la surface externe de la diaphyse est fortement ralentie, alors qu'un dépôt centripète de tissu dit « lamellaire » (alternance de couches claires et sombres en lumière polarisée) au niveau de la surface interne de la cavité médullaire induit un comblement progressif de la zone médullaire.

À la fin de la deuxième phase de croissance, lorsque les poussins sont en mue, le cortex subit un remaniement haversien général particulièrement intense qui met en place de nombreuses lacunes de résorption. Ce processus induit une augmentation sensible de la porosité corticale au niveau de l'ensemble des os appendiculaires étudiés.

Chez les adultes, toutes les lacunes de résorption ont été comblées par des dépôts endostéaux secondaires. En conséquence, le cortex des os longs est entièrement colonisé par des ostéones secondaires (systèmes de Havers), à l'exception d'une mince couche périphérique non remaniée (système fondamental externe). L'absence caractéristique de baies d'érosion ouvertes dans le cortex des adultes indique que, à ce stade de croissance, le remaniement haversien des corticales a cessé.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les premières données sur la croissance en diamètre indiquent que les os longs des membres antérieur et postérieur atteignent pratiquement l'épaisseur des os adultes à la fin de la première phase de croissance. Dès ce stade, l'essentiel de la croissance staturale des poussins est donc réalisée. L'activité ostéogénique est alors d'un niveau exceptionnel. Les travaux expérimentaux de De Margerie *et al.* (2004) ont montré que le tissu radiaire mis en place par le périoste à ce stade correspond à un dépôt de 171 $\mu\text{m}/\text{jour}$, vitesse d'accrétion parmi les plus rapides décrites à ce jour chez les tétrapodes. Cette rapidité de la croissance des corticales explique la faiblesse du taux de minéralisation constaté chez le poussin n° 100 (poussin émancipé, groupe A) une grande partie du tissu osseux fraîchement déposé par le périoste est sous la forme d'ostéoïde, tissu dont la matrice inter-cellulaire n'est pas encore pleinement minéralisée. D'un point de vue biomécanique ce tissu est très fragile, cependant, d'après De Margerie (2004), l'épaisseur relativement importante du cortex pourrait compenser en partie la faible résistance du tissu osseux.

Chez les poussins en fin de première phase de croissance, la compacité globale du fémur et du tibiotarse est 20% supérieure aux os appendiculaires du membre antérieur. À ce stade, la compacité des os du membre postérieur représente déjà plus de 80% de la valeur qu'elle aura au stade adulte. Bien qu'étant considérée comme une adaptation à la vie aquatique (Habib et Ruff, 2008), la mise en place de la compacité osseuse chez le poussin de manchot royal se produit bien avant le début de la locomotion aquatique et dans des régions du squelette qui ne subiront pas nécessairement de contraintes mécaniques intenses durant le vol subaquatique (os des membres pelviens).

Pendant l'hiver, l'accrétion d'os périostique est fortement ralentie cependant il se produit un comblement progressif de la zone médullaire grâce à un dépôt centripète au niveau de la surface interne de la cavité médullaire.

La résorption générale et intense qui se produit chez les poussins en cours de mue, correspond à un phénomène déjà constaté chez d'autres espèces aviaires adultes comme le bruant à couronne blanche (*Zonotrichia leucophrys*) au cours de la mue post-nuptiale. Murphy *et al.* (1992) ont ainsi démontré que certains os longs, dont le tibiotarse, présentent une augmentation de la surface lacunaire par unité de surface d'os cortical au cours de la mue. Cette résorption suggère une modification du métabolisme du calcium. Qu'elle soit juvénile ou annuelle pour les adultes, la mue est un processus physiologique très coûteux énergétiquement qui requiert une forte disponibilité en protéines, en minéraux et autres nutriments spécifiques (Groscolas, 1982 ; Cherel *et al.*, 1988 ; Murphy *et al.*, 1992). La plupart des espèces aviaires catabolisent alors certains tissus tels que le muscle strié squelettique (Rosser et George, 1987) ou l'os (Murphy *et al.*, 1992) afin de répondre aux demandes énergétiques imposées par la mue.

D'après Habib et Ruff (2008), la compacité des os longs appendiculaires des oiseaux reflète le degré d'adaptation à la vie marine. Ainsi, dans notre étude, le manchot royal possède des os compacts comme cela a déjà été démontré chez d'autres espèces d'oiseaux exclusivement marins tels que le manchot de Magellan (*Spheniscus magellanicus*) ou le cormoran à aigrette (*Phalacrocorax harrisi*) (Habib et Ruff, 2008). À la différence de certains mammifères marins (Siréniens), ce phénomène est qualifié d'ostéosclérose partielle car la compacité des os n'est pas totale. En effet, il persiste une cavité médullaire encombrée de travées osseuses (Figure 2).

Finalement, ces résultats initiaux représentent une première approche de l'étude du développement du tissu osseux chez le poussin de manchot royal. Il faudrait maintenant

envisager de poursuivre cette étude avec des effectifs plus importants pour pouvoir réaliser des analyses statistiques. De plus ce travail devra être complété par l'ajout de spécimens plus jeunes (non-émancipés) afin d'observer plus précisément le développement des os longs des membres antérieurs et postérieurs au cours de l'acquisition progressive de la locomotion bipède.

Tableau 1 : Descriptif des catégories de poussins et d'adultes déterminées pour cette étude.

| Catégories | Gamme de masse corporelle | Description | Effectif |
|-------------------|----------------------------------|---|-----------------|
| Poussins | | | |
| A | 2-3 kg | Poussins émancipés, âge : 1-2 mois | 5 |
| B | 6-7 kg | Poussins en fin de première phase de croissance, âge : 4-5 mois | 3 |
| C | 6-7 kg | Poussins à la sortie de l'hiver austral, âge : 8-9 mois | 3 |
| D | 8-9 kg | Poussins en mue, âge : 10-11 mois | 3 |
| Adultes | | | |
| E | $P \geq 12$ kg | Âge ≥ 2 ans | 8 |

Tableau 2 : Diamètre moyen (en mm, \pm SE) des coupes transversales mi-diaphysaires de l'humérus et du radius (os non cylindriques), du fémur et du tibiotarse réalisées chez des manchots royaux adultes (E) et des poussins à différents stade de développement : poussins émancipés (A), poussins en fin de première phase de croissance (B), poussins à la sortie de l'hiver (C), poussins en mue (D).

| | Diamètres de la section transversale des os longs (mm) | | | |
|-----------------|---|----------------|----------------------------|-------------------|
| | Membres antérieurs | | Membres postérieurs | |
| | Humérus | Radius | Fémur | Tibiotarse |
| Poussins | | | | |
| A | 10,1 \pm 0,6 | 5,8 \pm 0,6 | 8,9 \pm 0,3 | 8,2 \pm 0,4 |
| B | 20,8 \pm 0,8 | 13,7 \pm 0,7 | 12,0 \pm 0,3 | 11,1 \pm 0,4 |
| C | 23,3 \pm 0,3 | 15,6 \pm 0,6 | 12,5 \pm 0,8 | 11,1 \pm 0,5 |
| D | 22,9 \pm 0,4 | 15,9 \pm 0,3 | 12,5 \pm 0,2 | 12,1 \pm 0,2 |
| Adultes | 22,2 \pm 0,3 | 15,8 \pm 0,4 | 12,7 \pm 0,2 | 12,2 \pm 0,1 |

Tableau 3 : Moyennes des données morphométriques (\pm SE) des coupes transversales mi-diaphysaires des os appendiculaires chez le poussin de manchot royal à différents stades de développement : poussins en fin de première phase de croissance (B), poussins à la sortie de l'hiver (C), poussins en mue (D) ainsi que les adultes (E).

Paramètre S : zone de transition entre la cavité médullaire et le cortex

Paramètre P : taille relative de la cavité médullaire

Paramètre Cg : compacité globale de la section transversale

| | Humérus | | | Radius | | |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | S | P | Cg | S | P | Cg |
| B | 0,163 \pm 0,015 | 0,530 \pm 0,010 | 0,681 \pm 0,077 | 0,172 \pm 0,012 | 0,511 \pm 0,031 | 0,639 \pm 0,026 |
| C | 0,137 \pm 0,016 | 0,394 \pm 0,102 | 0,735 \pm 0,041 | 0,144 \pm 0,035 | 0,431 \pm 0,044 | 0,641 \pm 0,061 |
| D | 0,157 \pm 0,032 | 0,396 \pm 0,095 | 0,794 \pm 0,029 | 0,127 \pm 0,024 | 0,354 \pm 0,011 | 0,746 \pm 0,075 |
| E | 0,080 \pm 0,013 | 0,135 \pm 0,022 | 0,930 \pm 0,018 | 0,119 \pm 0,011 | 0,205 \pm 0,027 | 0,836 \pm 0,027 |

| | Fémur | | | Tibiotarse | | |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | S | P | Cg | S | P | Cg |
| B | 0,065 \pm 0,040 | 0,471 \pm 0,071 | 0,761 \pm 0,232 | 0,150 \pm 0,016 | 0,336 \pm 0,091 | 0,826 \pm 0,021 |
| C | 0,034 \pm 0,009 | 0,391 \pm 0,041 | 0,842 \pm 0,047 | 0,060 \pm 0,026 | 0,054 \pm 0,257 | 0,900 \pm 0,062 |
| D | 0,034 \pm 0,002 | 0,370 \pm 0,035 | 0,862 \pm 0,038 | 0,065 \pm 0,006 | 0,070 \pm 0,245 | 0,883 \pm 0,034 |
| E | 0,043 \pm 0,020 | 0,260 \pm 0,038 | 0,940 \pm 0,010 | 0,032 \pm 0,006 | 0,049 \pm 0,412 | 0,893 \pm 0,021 |

Tableau 4 : taux de minéralisation des os chez les adultes et le poussin n° 100. La colonne Diff. indique le surcroît de minéralisation des os des adultes par rapport à celui du poussin.

| | Ad. 5 | Ad. 9 | Ad. 15 | Ad. 16 | Moy. ad. $\pm \sigma$ | Pouss. 100 | Diff. |
|-------------------|-------|-------|--------|--------|-----------------------|------------|-------|
| Humérus | 70,04 | 68,88 | 68,89 | 69,90 | 69,43 \pm 0.6319 | 51,81 | + 35% |
| Radius | 67,97 | 67,02 | 67,19 | 68,53 | 67,68 \pm 0.7029 | | |
| Fémur | 70,53 | 69,27 | 68,99 | 71,03 | 69,95 \pm 0.9809 | 59,41 | +18% |
| Tibiotarse | 69,76 | 67,29 | 68,07 | 70,11 | 68,81 \pm 1,3480 | 58,61 | + 17% |

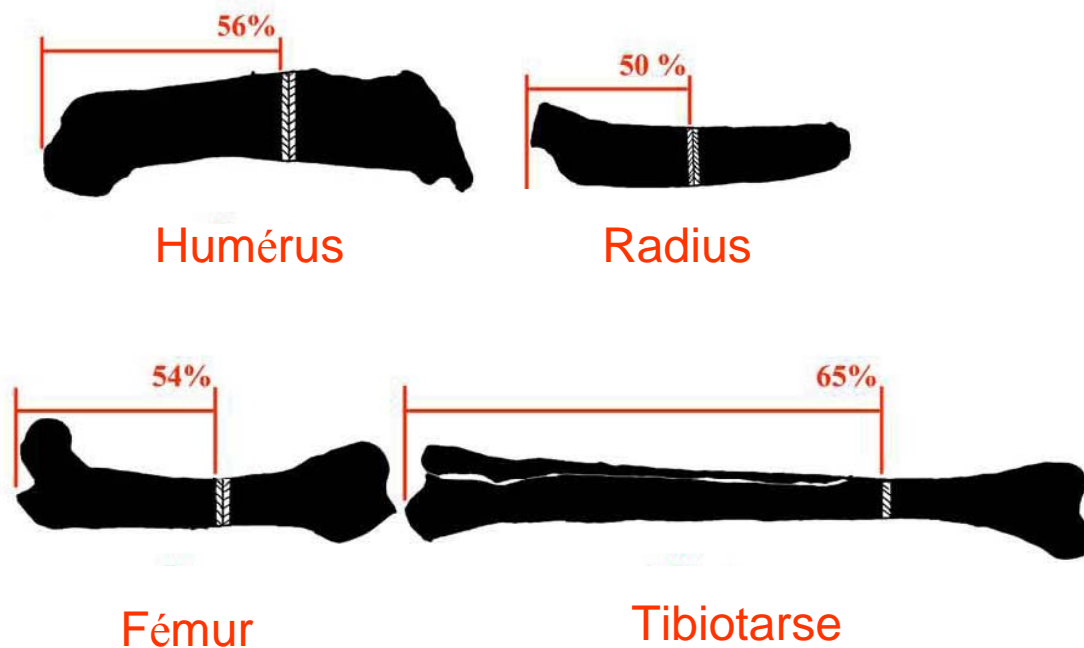


Figure 1 : Os appendiculaires des membres antérieurs (humérus et radius) et postérieurs (fémur et tibiotarse) utilisés pour cette étude. Sur la figure est indiquée la zone mi-diaphysaire préalablement identifié par radiographie.

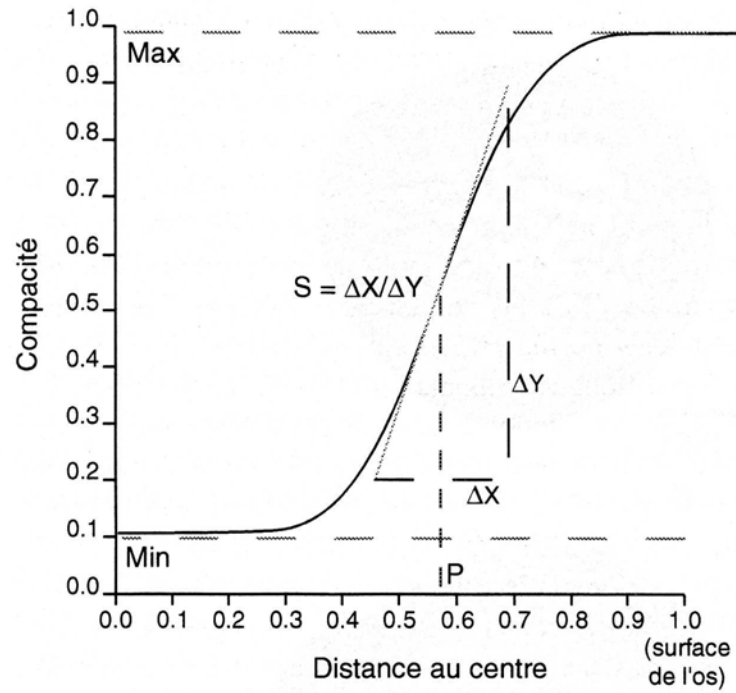


Figure 2 : Modèle mathématique du profil de compacité des os avec les différents paramètres S (zone de transition cavité médullaire/cortex) et P (taille relative de la cavité médullaire) (d'après Laurin *et al.*, 2004).

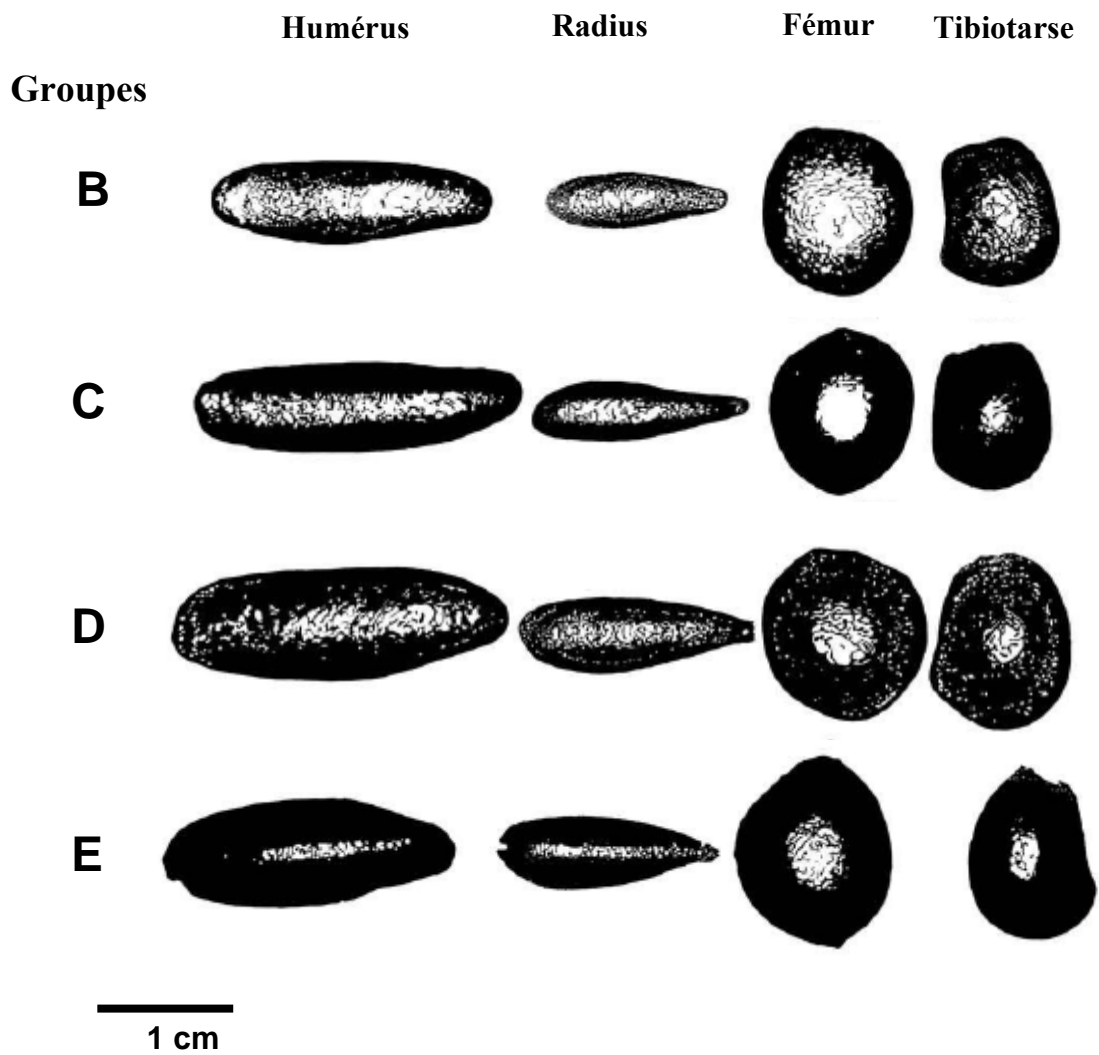


Figure 3 : Images binaires des coupes transversales mi-diaphysaire d'os longs (humérus, radius, fémur et tibiotarse) effectuées à différents stades de développement du poussin de manchot royal : en fin de première phase de croissance (B), au début de la deuxième phase de croissance (C) et pendant la mue (D). Les adultes sont représentés par le groupe E.

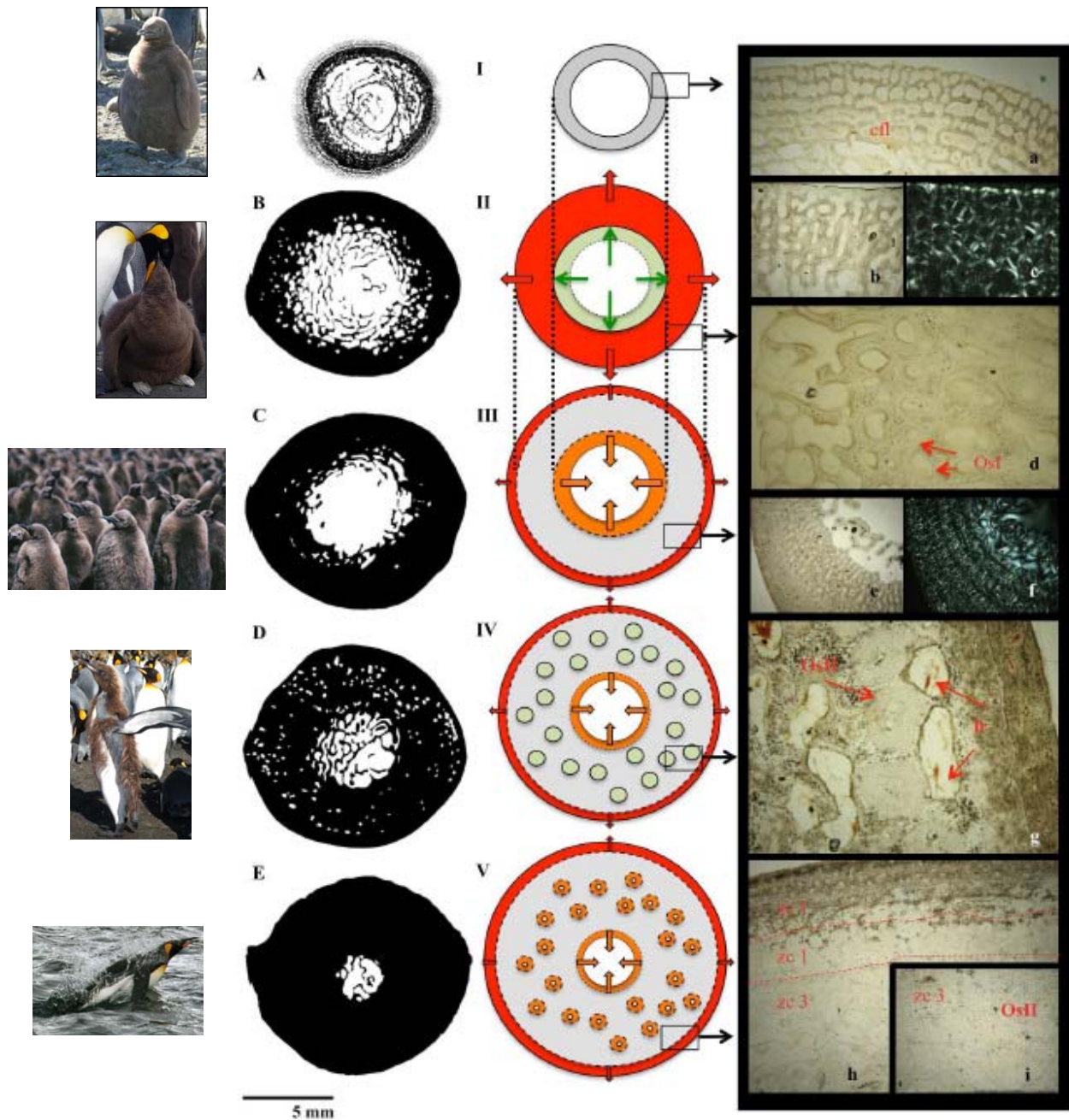


Figure 4 : Évolution de la microanatomie et de l'histologie du fémur. Les sections représentent des coupes transversales mi-diaphysaires à différents stades développementaux du poussin de manchot royal : poussin émancipés, 1-2 mois (A) ; fin de la première phase de croissance des poussins (B) ; poussins à la sortie de l'hiver (C) ; poussins en mue (D). Les adultes sont représentés dans le groupe E. Les parties I à V représentent schématiquement les processus de remaniement osseux au cours de la croissance de l'os.

Partie IV : Discussion générale et perspectives

Lors de ce travail de thèse, nous avons caractérisé les stratégies adaptatives qui se mettent en place en réponse à des contraintes environnementales prévisibles pendant la phase de croissance d'un animal. Nous avons choisi d'étudier la croissance du poussin de manchot royal pour plusieurs raisons. En effet, les poussins naissent au cours de l'été austral. Étant une espèce semi-altriciiale, le poussin à l'éclosion est totalement tributaire des soins parentaux. Les parents nourrissent activement leur progéniture en alternant périodes de couvaision (assurant une protection thermique et contre les prédateurs) et voyages alimentaires en mer. La mise en place des mécanismes de thermorégulation et l'acquisition progressive de la marche un mois après l'éclosion permet au poussin d'acquérir une première forme d'indépendance. Les parents peuvent alors s'investir simultanément dans la recherche alimentaire, laissant le poussin seul dans la colonie. Le jeune manchot émancipé se regroupe avec des congénères du même âge, formant des crèches, leur offrant une certaine protection face à l'attaque des prédateurs (pétrel géant *Macronectes sp*). Cependant la croissance du poussin ne peut s'achever avant le début de l'hiver austral. Durant cette période la disponibilité en proies diminue et les adultes effectuent des voyages alimentaires à de plus grandes distances. Nourri en moins grande quantité et plus épisodiquement, le poussin peut alors être soumis à une restriction alimentaire sévère de plusieurs mois et doit sa survie aux réserves énergétiques (lipidiques et protéiques) accumulées durant l'été. La fréquence de nourrissage augmentera à nouveau à la fin de l'hiver avec la diminution des distances des voyages alimentaires des adultes.

L'élevage du poussin de manchot royal requiert finalement 10 à 12 mois et son développement peut être divisé en 3 phases : une croissance staturale et pondérale rapide suivie d'une période d'arrêt de croissance liée à la sous-alimentation hivernale puis une seconde phase de croissance essentiellement pondérale précédant la mue et l'indépendance du poussin avec le départ en mer. Comme les poussins passent leur première année à terre, il existe un décalage temporel dans la

mise en fonctionnement de l'activité locomotrice des membres postérieurs, indispensables à la locomotion terrestre, et antérieurs, nécessaires pour le vol subaquatique.

Face à ce déroulement atypique de la croissance chez cette espèce semi-altricielle, nous avons étudié la cinétique de développement du système musculo-squelettique des ceintures pelvienne et pectorale. Compte tenu des contraintes sus-citées, nous nous sommes demandés si le développement de la ceinture pectorale serait aussi rapide que celui de la ceinture pelvienne, comme cela a été mis en évidence chez d'autres espèces altriciales.

Pour répondre à ces questionnements, nous avons étudié le déroulement de la croissance des tissus de l'appareil locomoteur au cours de l'acquisition progressive de l'émancipation du poussin, puis de l'émancipation jusqu'au début de l'hiver austral. Enfin nous avons déterminé l'impact de la restriction alimentaire hivernale sur les ceintures pelvienne et pectorale. Parallèlement, un indice d'adiposité a également été déterminé chez l'ensemble de ces poussins.

Nos résultats seront donc discutés en fonction de ces trois étapes de la vie du poussin. Nous traiterons par la suite de l'importance de la présence de contraintes environnementales particulières, durant la période de croissance du poussin, sur le caractère semi-altricial de l'espèce. Puis, nous terminerons par des propositions de perspectives de recherche complémentaires à ce travail.

1) Développement de l'appareil locomoteur pendant la croissance du poussin

1.1 De l'éclosion à l'émancipation

Le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) étant une espèce semi-altricielle, l'oisillon est totalement dépendant de ses parents à l'éclosion. En effet, immobile et incapable de maintenir

sa température corporelle, le jeune manchot est maintenu au chaud sous la poche incubatrice de son parent et il est nourri de manière fréquente et soutenue (Stonehouse, 1960 ; Barrat, 1978). Mâle et femelle se relayent auprès de leur poussin en alternant période de couvaision à terre et voyage alimentaire en mer. Pendant cette période de développement du poussin, il apparaît des différences significatives dans la structure des fibres musculaires des muscles étudiés, dans leur composition en protéines contractiles et leur teneur en protéines.

- Typologie musculaire et morphométrie

L'étude de la typologie en fibres de deux muscles de la ceinture pelvienne (*gastrocnemius lateralis* et *iliotibialis cranialis*) a permis de mettre en évidence les populations de fibres lentes (SO) et rapides de type oxydo-glycolytique (FOG). Dans le *Gastrocnemius lateralis* (GL) la proportion des fibres lentes diminue jusqu'à l'émancipation. Aucun changement typologique significatif n'a été mis en évidence dans l'*Iliotibialis cranialis* (IC). À l'émancipation du poussin, la proportion des fibres rapides et lentes pour les deux muscles étudiés est alors identique à celle des adultes. Un accroissement important de l'aire de la section transversale de ces fibres a également été observé.

Concernant la ceinture pectorale, la partie superficielle du *Pectoralis major* (Pec maj) est constitué exclusivement de fibres rapides de type FOG. La taille de ces fibres augmente jusqu'à l'émancipation mais plus faiblement que celles du GL et de l'IC.

- Protéines contractiles

Dans le GL et l'IC, on observe une variation de l'expression des isoformes de chaînes lourdes de myosine durant les premières semaines après l'éclosion. À l'émancipation, le GL, contrairement à l'IC, exprime les mêmes protéines contractiles que l'adulte.

Le Pec maj possède, dès l'éclosion, les mêmes protéines contractiles que celles détectés chez l'adulte.

- Masse protéique totale

L'augmentation de la masse protéique totale est deux fois plus importante dans les muscles de la ceinture pelvienne que dans ceux de la ceinture pectorale.

Ces différences observées au niveau des deux ceintures peuvent s'expliquer par une mise en place différentielle et progressive de fonctions physiologiques distinctes chez le poussin au cours des premières semaines après l'éclosion.

Tout d'abord, la thermorégulation est un mécanisme physiologique indispensable à la survie des poussins. Ce processus permet au poussin de maintenir sa température corporelle de manière constante face aux variations des conditions climatiques. L'acquisition de la thermorégulation est ainsi nécessaire pour que les parents puissent laisser leur progéniture seule dans la colonie pendant leurs voyages alimentaires. Une étude de Duchamp *et al.* (2002) menée sur le GL et le Pec maj a permis de mettre en évidence le rôle de ces muscles dans le mécanisme de thermorégulation avec frisson chez les poussins en croissance. Cette production de chaleur est issue de contractions asynchrones des muscles squelettiques antagonistes qui n'entraînent aucun mouvement locomoteur (Teulier, 2010). La mise en place de l'endothermie chez les jeunes oiseaux nécessite notamment le développement de l'activité de l'ATPase myofibrillaire dans les fibres musculaires (Hohtola et Visser, 1998). L'activité de cette ATPase est liée à la composition en chaînes lourdes de myosine (Rivero *et al.*, 1996). Or, d'après Lowey *et al.* (1993), les différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) s'exprimant au cours du développement musculaire n'induisent pas la même vitesse de contraction. Ainsi, les modifications de l'expression des isoformes de MyHC se produisant dans le GL des poussins de

manchot royal pourraient être liées à l'acquisition progressive de l'homéothermie dès les premières semaines après l'éclosion. Dans le muscle pectoral, l'activité contractile engendrée par le frisson, mesurée par électromyographie, a été détectée rapidement après la naissance de l'oisillon c'est-à-dire bien avant son émancipation thermique (Duchamp *et al.*, 2002). La maturation précoce des MyHCs du Pec maj pourrait ainsi favoriser les processus de frisson qui se mettent en place dès la naissance. Cependant, l'émancipation thermique proprement dite ne sera acquise qu'après le développement d'un duvet isolant pour limiter les pertes de chaleur (Duchamp *et al.*, 2002).

Avec l'acquisition progressive de la thermorégulation le poussin devient capable, au bout de 1 à 2 semaines, de sortir de plus en plus souvent de la poche incubatrice et il commence à se tenir fréquemment debout devant son parent. La mise en évidence d'une population de fibres lentes dans les deux muscles des pattes (GL et IC) indique leur implication dans le maintien de la posture (McFarland et Meyers, 2008). Dans le *Gastrocnemius lateralis* (GL) la proportion de ces fibres diminue avec l'acquisition progressive de la marche jusqu'à l'émancipation. L'augmentation de la proportion des fibres rapides au dépend des fibres lentes semble traduire le besoin d'augmenter la vitesse de contraction du muscle pour la locomotion bipède. La composition en fibres de l'IC ne varie pas au cours de cette même période. À l'émancipation, la typologie de ces deux muscles est identique à celle chez l'adulte.

Parallèlement, l'aire de la section transversale des fibres lentes et rapides dans les deux muscles pelviens étudiés, ainsi que leur masse protéique augmentent progressivement avec la masse corporelle du poussin. Cette croissance des muscles des deux ceintures associée aux changements d'expression des isoformes de MyHC dans les muscles GL et IC semblent permettre la mise en place rapide d'une locomotion terrestre. Lorsque le poussin commence à marcher, environ 3

semaines après l'éclosion, le muscle GL présente la même composition en isoformes de MyHC que l'adulte ce qui démontrerait la maturité des protéines contractiles du muscle. Dans le cas de l'IC, la maturation de ces protéines semble être plus tardive. En effet, les isoformes de chaînes lourdes de myosine présentes à l'émancipation du poussin ne correspondent pas à celles observées chez l'adulte (Erbrech *et al.*, 2011).

Nous avons également montré que l'accrétion protéique dans les muscles de la ceinture pectorale est deux fois plus faible que dans la ceinture pelvienne. De plus, la taille des fibres musculaires du Pec maj, conjointement à la masse protéique, augmente plus faiblement que celles du GL et de l'IC. Ainsi, la taille des fibres musculaire est nettement inférieure à celle de l'adulte (facteur 30) pour les poussins âgés de 3-4 semaines. D'un point de vue de la typologie des fibres, la partie superficielle du Pec maj est constitué exclusivement de fibres rapides de type oxydo-glycolytique (FOG) chez les jeunes poussins et les adultes. Cette composition de fibres se retrouve communément chez les espèces aviaires de petite taille telles que les Passériformes (Rosser *et al.*, 1996) mais aussi chez le manchot empereur adulte (*Aptenodytes forsteri*) (Ponganis *et al.*, 1997) et elle a été associée à la capacité de ces espèces à soutenir un effort prolongé pendant le vol (aérien ou subaquatique). Concernant les protéines contractiles, le Pec maj présente, dès la naissance du poussin, une composition en isoformes de MyHC identique à celle de l'adulte. La dimension des fibres musculaires étant un facteur déterminant pour la production d'une force mécanique efficace (Olson, 2001), la taille des fibres FOG du Pec maj chez le jeune manchot ne permet pas de fournir une force de contraction suffisante pour la locomotion et ce malgré la maturation précoce des MyHCs. Ainsi, chez le poussin, le sous développement du Pec maj constaté par rapport aux muscles des pattes ne parait pas être lié à la composition en protéines contractiles.

Durant les premières semaines de vie du poussin, le développement précoce des muscles de la ceinture pelvienne accompagné d'une croissance intense des os longs (De Margerie, 2004 ; étude

III) permet au poussin de se mettre rapidement debout et d'acquérir une locomotion bipède efficace. Ces résultats sont en accord avec une étude déjà menée sur la croissance du manchot royal démontrant un développement plus rapide du tarse par rapport à l'aile (Verrier, 2003).

Ce processus est essentiel pour la survie du jeune poussin qui, alors émancipé, est laissé seul dans la colonie pendant les voyages alimentaires des deux parents. Le jeune manchot peut se regrouper avec d'autres congénères du même âge formant ainsi des crèches assurant une protection contre d'éventuels prédateurs (pétrel géant *Macronectes sp.*). Les poussins sont également capables de suivre les parents pour quémander de la nourriture au cours de leurs visites alimentaires à terre (Stonehouse, 1960 ; Barrat, 1976).

1.2 De l'émancipation à la fin de la première phase de croissance

Cette première forme d'indépendance du poussin permet aux deux parents de s'investir simultanément dans l'approvisionnement alimentaire de leur progéniture. L'efficacité du nourrissage est donc accrue (Cherel et Ridoux, 1992).

- Développement de l'appareil locomoteur

Nos résultats montrent tout d'abord que l'accrétion de la masse protéique des muscles de la ceinture pelvienne se poursuit de façon progressive et constante avec la masse corporelle du poussin (Figure 1). De manière plus précise, la masse protéique du GL augmente également en fonction de la masse corporelle du jeune manchot, cependant la proportion des fibres lentes et rapides ainsi que l'aire de la section transversale de ces dernières n'évoluent pas. Ces résultats semblent nous indiquer que la croissance de ce muscle se fait uniquement de manière longitudinale par l'ajout d'unité de base des myofibrilles (sarcomères).

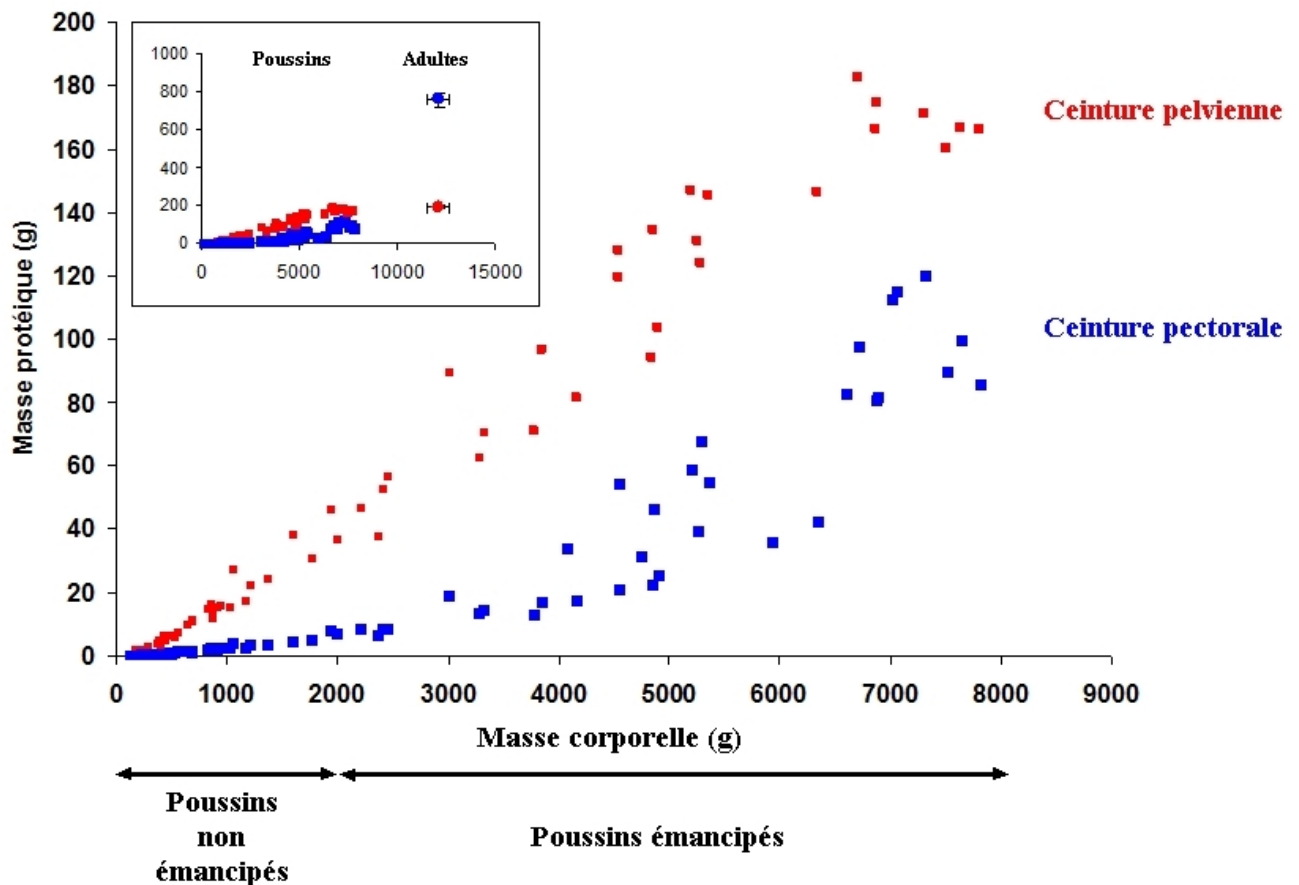


Figure 1 : Évolution de la masse protéique totale en fonction de la masse corporelle (g) des poussins pendant la première phase de croissance. L'encadré représente ces mêmes données avec les valeurs moyennes des adultes (\pm erreur standard).

La diminution du rapport de la masse protéique totale de la ceinture pelvienne sur celle de la pectorale semble indiquer une accréation protéique plus rapide au niveau des muscles pectoraux. La dynamique de croissance relative de ces deux ceintures s'inverse chez les poussins marcheurs par rapport aux individus non émancipés (Figure 2). Ces derniers restent cependant largement sous-développés (d'un facteur 10) par rapport aux adultes (Figure 1). La masse protéique du Pec maj ainsi que l'aire des fibres rapides suivent la même évolution que l'ensemble de la ceinture. Toutefois, malgré une augmentation importante de ces deux paramètres (facteur 25 et 7, respectivement), les valeurs restent en deçà de celles mesurées chez l'adulte.

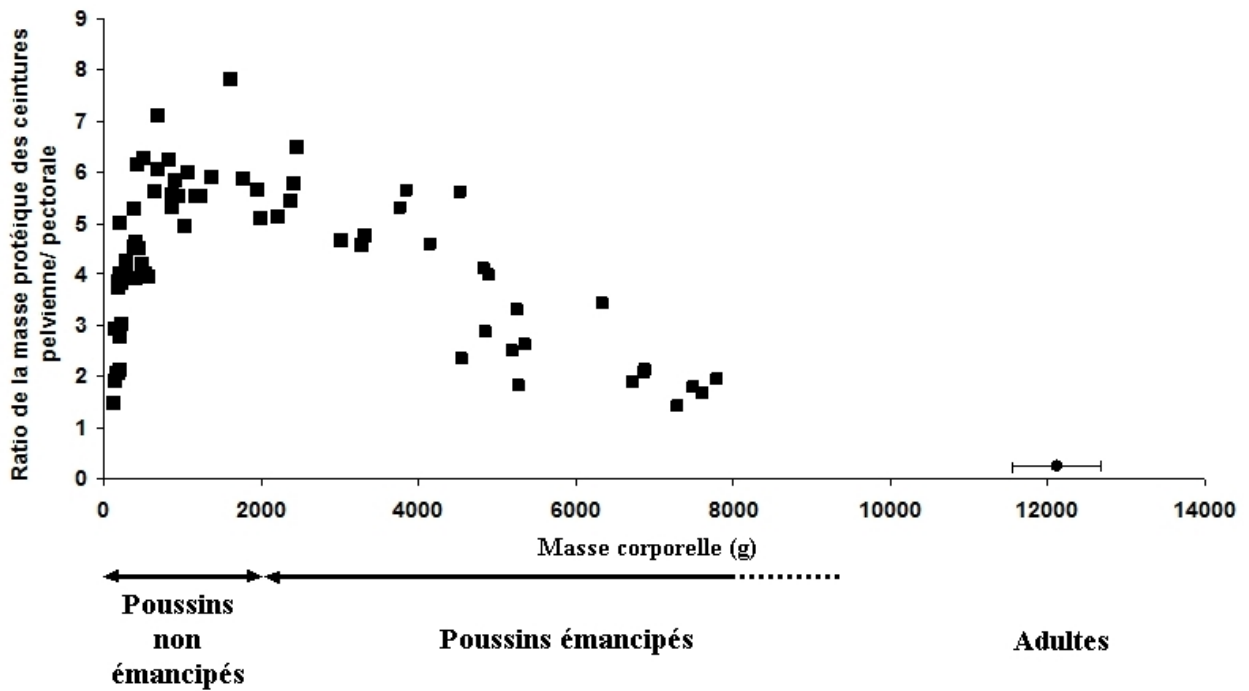


Figure 2 : Évolution du ratio de la masse protéique totale de la ceinture pelvienne sur la masse protéique totale de la ceinture pectorale en fonction de la masse corporelle (g) des poussins pendant la première phase de croissance. Pour les adultes, le ratio moyen est donné en fonction de la masse corporelle moyenne (\pm erreur standard).

À l'entrée de l'hiver, les données sur la croissance en diamètre nous indiquent que les os longs des membres antérieurs et postérieurs atteignent pratiquement l'épaisseur des os adultes. À ce stade, les jeunes manchots présentent aussi une stature proche de l'adulte comme l'a déjà démontré Verrier (2003) dans une précédente étude. La compacité globale des os longs des membres postérieurs et antérieurs représente déjà plus de 80% de la valeur qu'elle aura au stade adulte.

- Préparation à l'hiver

L'adiposité des poussins, apparemment déjà équivalente aux adultes à l'émancipation d'après nos résultats de l'étude I, augmente fortement jusqu'au début de l'hiver austral. À ce stade, l'indice

d'adiposité des jeunes manchots représente en moyenne le double de celui des adultes (Figure 3). Ceci résulte d'une prise alimentaire importante et riche en nutriments à haute valeur énergétique (Cherel et Ridoux, 1992). En effet, pendant l'été, de petits poissons gras de la famille des Myctophidés, communément appelés poissons-lanternes, représentent plus de 90% du régime alimentaire du jeune manchot (Verrier, 2003). Par ailleurs, une allocation préférentielle de l'apport énergétique vers le stockage de réserves adipeuses (Groscolas, 1990 ; Cherel *et al.* (1993) peut être considérée comme une réponse adaptative directe aux conditions hivernales, car il conditionne la survie des poussins (Cherel *et al.*, 1993).

Chez les poussins à l'entrée de l'hiver, le sous développement des muscles de la ceinture pectorale, qui n'a aucun rôle locomoteur, pourrait être interprété comme une stratégie adaptative afin de réduire les dépenses énergétiques pendant la restriction alimentaire hivernale (Cherel *et al.*, 1993). En effet, d'après Scott et Evans (1992), limiter la masse maigre permet de minimiser les dépenses énergétiques durant une période de jeûne.

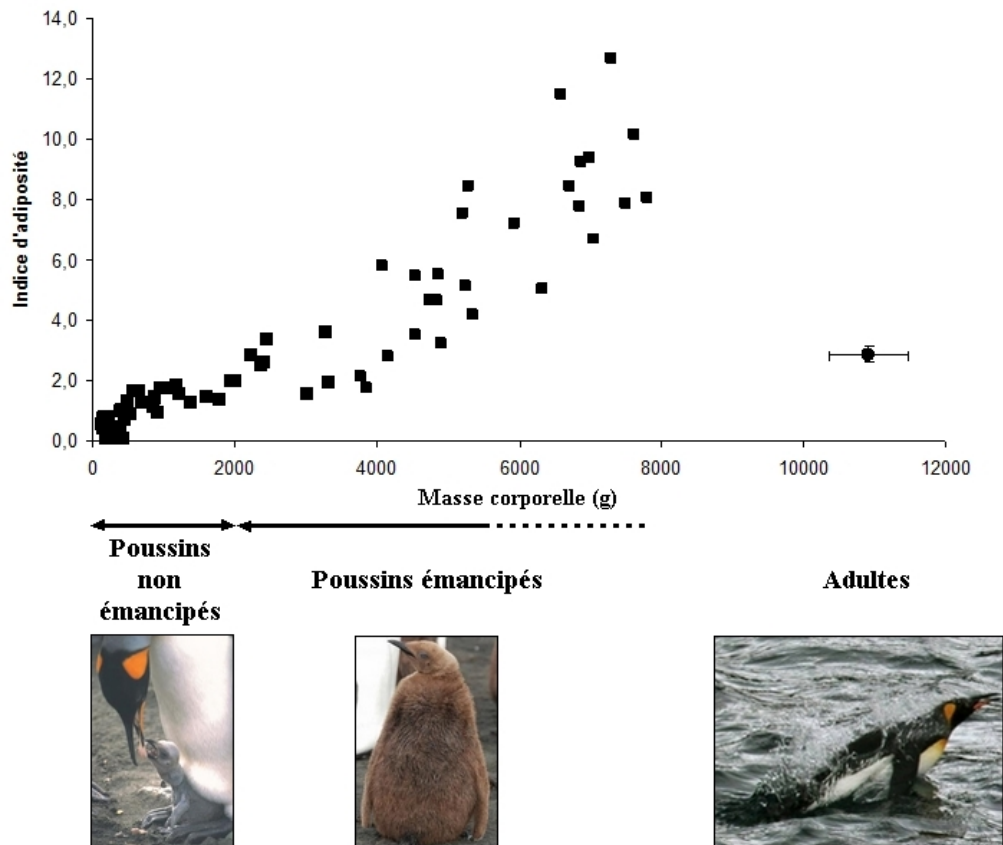


Figure 3 : Évolution de l'indice d'adiposité (masse lipidique sur la masse protéique de la peau) en fonction de la masse corporelle (g) des poussins pendant la première phase de croissance. Pour les adultes, l'indice d'adiposité moyen est donné en fonction de la masse corporelle moyenne (\pm erreur standard).

1.3 Impact de l'hiver austral

- Muscles des ceintures pelvienne et pectorale

La masse protéique totale de la ceinture pelvienne des poussins à la sortie de l'hiver se maintient par rapport à celle des poussins en fin de première phase de croissance. De manière plus précise, dans le GL, l'analyse morpho-fonctionnelle ne montre aucune variation de l'aire de la section transversale des fibres musculaires (rapides et lentes) et de la composition en isoformes de chaînes lourdes de myosine. L'impact de la restriction alimentaire est très minime pour les muscles de la ceinture pelvienne. De plus, dans l'IC, les poussins après hiver expriment les

mêmes isoformes de myosine que les adultes. Au début de la deuxième phase de croissance, les muscles des membres postérieurs ont pratiquement atteint le même niveau de développement que ceux des adultes.

La quasi absence de l'influence de la restriction alimentaire sur les membres postérieurs semble indiquer l'importance du maintien d'une fonction locomotrice efficace. Le poussin doit en effet être capable d'échapper aux prédateurs, et être prêt à suivre ses parents pour quémander de la nourriture lors de leurs retours occasionnels pendant l'hiver et à la fin de l'hiver, au cours de la reprise du nourrissage intensif.

Les muscles de la ceinture pectorale sont, en revanche, plus altérés que ceux de la ceinture pelvienne. En effet, la période hivernale entraîne une baisse de la masse protéique totale des muscles pectoraux d'un facteur de 1,5 environ. Cette diminution est également observée dans le Pect maj malgré le fait que la taille des fibres rapides ne soit significativement pas réduite. Cependant, notre étude morphométrique des fibres musculaires ne s'est portée que sur la partie superficielle du Pec maj. Il faudrait envisager de vérifier si la perte de masse protéique se répercute sur la taille des fibres rapides dans les zones plus profondes du muscle.

Au vue de ces résultats et en accord avec Duchamp *et al.* (1991), les protéines des muscles de la ceinture pectorale semblent être mobilisées pendant le jeûne hivernal afin de fournir les acides aminés nécessaires à la survie et à la maintenance des fonctions vitales des jeunes poussins. L'augmentation progressive du taux plasmatique d'acide urique chez les poussins en restriction alimentaire témoigne de la métabolisation des protéines pendant la deuxième moitié de l'hiver, les réserves lipidiques étant surtout utilisées au début de la restriction alimentaire (Cherel *et al.*, 2004). Cette utilisation des réserves protéiques des muscles pectoraux indique que les muscles de la ceinture pelvienne sont relativement épargnés afin que le jeune manchot puisse conserver une locomotion terrestre efficace.

- Indice d'adiposité

Les jeunes manchots que nous avons étudiés à la sortie de l'hiver ont un indice d'adiposité beaucoup plus faible que les poussins en fin de première phase de croissance. Ce résultat, en accord avec les travaux de Cherel *et al.* (2004), semble indiquer une mobilisation importante des réserves lipidiques pendant l'hiver austral. Durant cette période, la disponibilité alimentaire océanique diminue également, obligeant les adultes à entreprendre des voyages alimentaires beaucoup plus longs (Stonehouse, 1960 ; Barrat, 1976 ; Verrier, 2003). Les poussins sont ainsi nourris au mieux une fois toutes les 5 à 6 semaines (Cherel *et al.*, 1987 ; Descamps *et al.*, 2002). La qualité nutritionnelle des proies apportées au poussin est également modifiée. Les céphalopodes, d'une valeur énergétique inférieure à celle des Myctophidés deviennent majoritaires dans le régime alimentaire des jeunes manchots (Cherel *et al.*, 1996). Les contraintes énergétiques sont donc importantes tant pour les adultes en prospection alimentaire en mer que pour les poussins en restriction alimentaire à terre. Chez les oiseaux, un tel exemple de tolérance face à une longue restriction alimentaire semble uniquement comparable au jeûne prolongé de 4 mois que subissent les manchots empereurs mâles au début de leur cycle de reproduction (Isenmann, 1971).

La reprise du nourrissage parental intensif permet aux poussins de restaurer leurs réserves lipidiques et d'achever la croissance de l'aile et du tarse (Verrier, 2003). Durant cette phase, le développement des muscles de la ceinture pectorale est indispensable pour la préparation au vol- subaquatique. Avant le premier départ en mer, le poussin doit également muer et revêtir un plumage très semblable à celui de l'adulte (Stonehouse, 1960 ; Barrat, 1976 ; Verrier, 2003). La mue est un processus très coûteux d'un point de vue énergétique (Lindström *et al.*, 1993) qui requiert une haute disponibilité en protéines et minéraux (Groscolas, 1982 ; Cherel *et al.*, 1988 ; Murphy *et al.*, 1992).

L'étude de la structure des os longs des poussins en mue a permis de mettre en évidence de nombreuses cavités de résorption au niveau du cortex. Ceci suggère une modification du métabolisme du calcium osseux alors même que les parents arrêtent de nourrir le poussin pendant la mue, en moyenne 16 jours avant son départ en mer (Corbel *et al.*, 2009).

2) Effet de l'environnement sur le mode de développement du poussin

D'après Nice (1962), le poussin de manchot royal est classé comme étant une espèce semi-altriciale. Peu d'études se sont intéressées au développement musculaire chez d'autres oiseaux semi-altriciaux. Nous pouvons cependant tenter de comparer la croissance de notre modèle avec des espèces altriciales plus étudiées. À l'éclosion, les poussins altriciaux et semi-altriciaux, immobiles et incapables de maintenir leur température corporelle, sont totalement tributaires des soins parentaux (Starck et Ricklefs, 1998). Cependant, ces espèces dotées d'un mode de développement altricial établissent leur nid en hauteur, ce qui constitue une protection contre les prédateurs pour ces poussins.

La cinétique de développement des muscles de la ceinture pectorale et pelvienne pendant la première phase de croissance du poussin de manchot ne semble pas identique à celle observée chez d'autres oiseaux altriciaux tels que l'Hirondelle, le Carouge à épaulette ou encore le Cormoran huppé (Marsh et Wickler, 1982 ; Olson, 2001 ; Moe *et al.*, 2004). En effet, après l'éclosion, ces espèces développent les muscles des deux ceintures à la même vitesse, puis la croissance du muscle pectoral s'intensifie jusqu'à l'émancipation totale du jeune oiseau (Hohtola et Visser, 1998). Contrairement aux espèces altriciales étudiées, qui établissent leur nid en hauteur assurant ainsi une protection des poussins contre les prédateurs, le poussin de manchot royal est tributaire du milieu terrestre pendant sa première année de vie (Stonehouse, 1960 ; Barrat, 1976 ; Verrier, 2003). Le cycle de développement relativement long chez cette espèce contraint le poussin à faire face aussi à l'hiver austral. Durant cette saison, la disponibilité

alimentaire océanique diminue et les adultes sont contraints d'entreprendre de longs voyages en mer pour se nourrir (Guinet *et al.*, 1997 ; Bost *et al.*, 1997). Pendant cette période, les adultes diminuent drastiquement le ravitaillement alimentaire de leur poussin. Pour garantir leur succès reproducteur, les parents doivent nourrir intensément leur progéniture pour que celui-ci puisse accumuler des réserves énergétiques (protéiques et lipidiques) suffisantes pour assurer sa survie pendant la restriction alimentaire au cours de l'hiver austral (Cherel *et al.*, 1993). Pendant la période d'abondance alimentaire, à savoir l'été, les parents sont contraints de s'investir simultanément dans le nourrissage intensif du poussin, le laissant seul dans la colonie. Le poussin doit alors être capable de maintenir sa température corporelle constante et d'échapper à l'attaque d'éventuels prédateurs. Ceci est rendu possible grâce à l'acquisition rapide d'une première forme d'émancipation du poussin, émancipation garantie par le développement précoce de la thermorégulation et de la locomotion bipède.

Les contraintes environnementales influencent donc le développement post-embryonnaire du poussin de manchot royal indépendamment du caractère semi-altricial de l'espèce.

3) Perspectives

Dans cette étude, nous avons mis en évidence un décalage de croissance entre les muscles des ceintures pectorale et pelvienne au cours de la première phase de croissance du poussin de manchot royal. Ce décalage de croissance permet au poussin de s'adapter aux contraintes environnementales auxquelles il doit faire face au cours de son développement post-natal. Ces résultats, néanmoins, posent un certain nombre de questions qu'il serait intéressant d'approfondir dans un proche avenir.

Tout d'abord, il manque actuellement des données sur l'évolution du développement musculaire pendant la deuxième phase de croissance qui débute après l'hiver austral. En effet, cette étape

représente la phase finale pour la préparation à la vie aquatique. Nous nous attendons donc à ce que les muscles de la ceinture pectorale se développent rapidement (augmentation de la masse protéique et de l'aire de la section transversale des fibres musculaires) afin de combler leur retard. Cependant, avant le départ en mer, le jeune manchot change son duvet au profit d'un plumage très semblable à celui des adultes. La mue dure entre 34 et 78 jours (Verrier, 2003) et les parents arrêtent de nourrir leur poussin 16 jours en moyenne avant la fin de la mue (Corbel *et al.*, 2009). Sachant que notre étude a déjà permis de mettre en évidence l'effet de la mue sur le tissu osseux chez le poussin (apparition de points de résorption au niveau du cortex), il serait intéressant d'étudier l'impact de ce processus biologique coûteux d'un point de vue énergétique sur les muscles des deux ceintures. Par ailleurs, les muscles pectoraux, nécessaires au vol sub-aquatique, sont-ils aussi bien développés que ceux des adultes lors du départ en mer ? Il faut donc poursuivre notre étude au cours de la deuxième phase de croissance des poussins, c'est-à-dire de la fin de l'hiver à leur premier départ en mer.

Ensuite des études complémentaires seraient nécessaires pour étudier de manière plus approfondie la fonctionnalité des fibres musculaires au cours du développement du manchot royal.

- Les propriétés métaboliques énergétiques des muscles pourraient être plus approfondie en mesurant par exemple l'activité enzymatique de la succino-déshydrogénase. Cet enzyme du cycle de Krebs, est impliqué dans le métabolisme oxydatif des fibres musculaires aérobies. Des mesures de son activité dans les fibres musculaires apporterait des informations plus précises sur le degré de maturité des muscles que la seule composition en isoforme de chaîne lourde de myosine (Rathgeber et Rosser, 1998).
- La mesure de la contractilité musculaire *in vitro* permettrait de connaître la force de contraction musculaire que ces tissus peuvent développer au cours du développement.

- Il serait également pertinent de caractériser de manière plus fine l'expression des différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine en utilisant des anticorps spécifiques (par des techniques immunohistologiques, Bandman et Rosser, 2000).

Par ailleurs, l'étude sur la croissance osseuse devra être complétée par l'ajout d'individus supplémentaires.

Ces études posent, de manière aigüe, le problème d'un modèle de poussin victime de prédation. Il est évident que l'étude de la musculature d'un poussin qui n'a pas subi l'action de prédateurs serait indispensable. Bien que conscients des limites de ce travail, l'éthique nous interdit néanmoins d'envisager l'euthanasie d'espèces protégées.

De manière plus générale, il serait intéressant de comparer la croissance du manchot royal avec celle d'autres espèces de manchots comme les manchots empereurs (*Aptenodytes forsteri*) ou Adélie (*Pygoscelis adeliae*). Le poussin de manchot royal étant le seul parmi les sphéniscidés à connaître une restriction alimentaire sévère au cours d'un développement long, ceci permettrait de mieux définir si ce type de programme développemental est seulement une adaptation aux contraintes environnementales, ou plus généralement spécifique à la famille des sphéniscidés

Le manchot royal n'est pas la seule espèce d'oiseaux à posséder un cycle reproducteur long (11 à 12 mois). En effet, celui de l'Albatros hurleur (*Diomedea exulans*) et du Condor des Andes (*Vultur gryphus*) est d'une durée supérieure à un an (Barrat, 1976 ; Van Heezik *et al.*, 1994). La longueur de leur cycle pourrait induire des variations dans l'apport alimentaire parental à une certaine période de leur élevage, nécessitant, comme dans le cas du manchot royal, la mise en place de stratégies adaptatives face aux contraintes environnementales. Il serait donc intéressant

de comparer ces espèces à cycle reproducteur long pour observer l'influence de l'environnement sur la croissance des poussins. Cependant, le besoin de travailler sur des espèces sauvages pour étudier le mode de développement adapté aux contraintes environnementales nous oblige à prendre en compte le statut des espèces protégées et à adapter nos programmes de recherche en tenant compte des règles d'éthique et de la réglementation internationale.

Bibliographie

A-

D'Albis, A., Pantaloni, C. et Bechet, J. J. (1979). An electrophoretic study of native myosin isozymes and of their subunit content. *European Journal of Biochemistry* **99**, 261-272.

Arlettaz, R., Schaad, M., Reichlin, T.S. et Schaub, M. (2010) Impact of weather and climate variation on Hoopoe reproductive ecology and population growth. *Journal of Ornithology* **151**, 889-899.

Aulie, A. et Toien, O. (1988) Threshold for shivering in aerobic and anaerobic muscles in bantam cocks and incubating hens. *Journal of Comparative Physiology B* **158**, 431-435.

B-

Bacou, F. et Vigneron, P. (1988) Properties of skeletal muscle fibers: 1. Influence of motor innervation. *Reproduction, nutrition, development*. **28**, 1387-1453.

Bandman, E. (1999) Functional properties of myosin isoforms in avian muscle. *Poultry Science*, **78**, 729-734.

Bandman, E. et Bennet, T. (1988) Diversity of myosin heavy chain expression during the development of the gastrocnemius, bicep brachii and posterior latissimus dorsi of the normal and dystrophic chicken. *Developmental Biology* **130**, 220-231.

Bandman, E. et Rosser B.W.C. (2000) Evolutionary significance of myosin heavy chain heterogeneity in birds. *Microscopy Research and Technique*. **50**, 473-491.

Bannasch, R. (1995). Hydrodynamics of penguins - an experimental approach. In *The Penguins*, pp. 141-176: Surrey Beatty & Sons.

- Barany, M.** (1967) ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *Journal of General Physiology* **50**, 197-218.
- Barbut, S.** (2002). *Poultry products processing: An industry guide*, 1 edn. CRC Press LLC, Florida, 564 pp.
- Barnard, E.A., Lyles, J.M. et Pizzey, J.A.** (1982) Fibre types in chicken skeletal muscles and their changes in muscular dystrophy. *The Journal of Physiology* **331**,333-354
- Barrat, A.** (1976) Quelques aspects de la biologie et de l'écologie du manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) des îles Crozet. *Comité National Français des Recherches Antarctiques* **40**, 9-51.
- Barré, H.** (1976) Etude de la dépense énergétique du poussin de Manchot royal (*Aptenodytes patagonicus* J.F. Miller) dans les conditions climatiques ambiantes naturelles. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris* **282**, 89-92.
- Barrett, R.T. et Krasnov, Y.V.** (1996) Recent responses to changes in stocks of prey species by seabirds breeding in the southern Barents Sea. *Journal of Marina Science.* **53**, 713-722.
- Bartnik, B.L., Waldbillig, D.M., Bandman, E. et Rosser, B.W.C.** (1999) Persistent expression of developmental myosin heavy chain isoforms in the tapered ends of adult pigeon pectoralis muscle fibres. *The Histochemical Journal* **31**, 321-329.
- Beaumont, A., Cassier, P., Truchot, J.-P. et Dauça, M.** (2004). Chapitre 21 Les muscles et la concentration musculaire. In: *Biologie et physiologie animales*, 2edn. Dunod, Paris.
- Bennett, M.B.** (2006) Post-hatching growth and development of the pectoral and pelvic limbs in the black noddy, *Anous minutus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **150**, 159-168.
- Beresford, B.** (1983) Brachial muscles in the chick embryo: the fate of individual somites. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **77**, 99-116.

- Bisha, J.G. et Bader, D.** (1991) Identification and characterization of a ventricular-specific avian myosin heavy chain, VMHC1: expression in differentiating cardiac and skeletal muscle. *Developmental Biology* **148**, 355–364.
- Block, B.A.** (1994) Thermogenesis in muscle. *Annual Review of Physiology* **56**, 535-577.
- Bonier, F., Martin, P.R., Jensen, J.P., Butler, L.K., Ramenofsky M. et Wingfield, J.C.** (2007) Premigratory life history stage of juvenile arctic birds: costs, constraints, and trade-off. *Ecology* **88**, 2729-2735.
- Bost, C.-A., Georges, J.-Y., Guinet, C., Cherel, Y., Pütz, K., Charrassin, J.-B., Handrich, Y., Zorn, T., Lage J. et Le Maho, Y.** (1997) Foraging habitat and food intake of satellite-tracked penguins during the austral summer at Crozet Archipelago. *Marine Ecology-Progress Series* **150**, 21-33.
- Bradford, M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- De Buffrénil, V. et Mazin, J.M.** (1989) Bone histology of *Claudiosaurus germaini* (reptilia, claudiosauridae) and the problem of pachyostosis in aquatic tetrapods. *Historical Biology* **2**, 311-322.
- De Buffrénil, V., Canovilla, A., d’Anastasio, R. et Domning, D.P.** (2010) Evolution of sirenian pachyosteosclerosis, a model-case for the study of bone structure in aquatic tetrapods. *Journal of Mammalian Evolution* **17**, 101-120.
- De Buffrénil, V. et Schoevaert, D.** (1989) Données quantitatives et observations histologiques sur la pachyostose du squelette du dugong, *Dugong dugon* (Müller) (Sirenia, Dugongidae). *Canadian Journal of Zoology* **67**, 2107-2119.

C-

Case, T.J. (1978) On the evolution and adaptive significance of postnatal growth rates in the terrestrial vertebrates. *The Quarterly Review of Biology*, **53**, 243-282.

Campbell, P.N. et Smith, A.N. (2002) Biochimie illustrée. Édition Maloine, Paris.

Campbell, R.R. et Leatherland, J.F. (1980) Estimating body protein and fat from water content in lesser snow geese. *Journal of Wildlife Management*, **44**, 438-446.

Cherel, Y., Charrassin, J.B. et Handrich, Y. (1993) Comparaison of body reserve buildup in prefasting chicks and adults of king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *Physiological Zoology* **66**, 750-770.

Cherel, Y., Durant, J.M. et Lacroix, A. (2004) Plasma thyroid hormone pattern in king penguin chicks: a semi-altricial bird with an extended posthatching developmental period. *General and Comparative Endocrinology* **136**, 398-405.

Cherel, Y., Leloup, J. et Le Maho, Y. (1988) Fasting in king penguin. II. Hormonal and metabolic changes during molt. *American Journal of Physiology* **254**, R178-R184.

Cherel, Y. et Le Maho, Y. (1985) Five months of fasting in king penguin chicks: body mass loss and fuel metabolism. *American Physiological Society*, **249**, 387-392.

Cherel, Y. et Ridoux, V. (1992) Prey species and nutritive value of food fed during summer to King penguin *Aptenodytes patagonicus* chicks at Possession Island, Crozet Archipelago. *Ibis* **134**, 118-127.

Cherel, Y., Ridoux, V. et Rodhouse, P.G. (1996) Fish and squid in the diet of king penguin chicks, *Aptenodytes patagonicus*, during winter at sub-antarctic Crozet Islands. *Marine Biology* **126**, 559-570

Cherel, Y., Stahl, J.C. et Le Maho, Y. (1987) Ecology and physiology of fasting in King penguin chicks. *The Auk*, **104**, 254-262.

Choi, I., Ricklefs, R.E. et Shea, R.E. (1993) Skeletal muscle growth, enzyme activities, and the development of thermogenesis: a comparison between altricial and precocial birds. *Physiological Zoology* **66**, 455-473.

Clerquin, Y. (1998) Stratégie alimentaire du Manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) durant l'hiver austral. Mémoire de DEA, Université Claude Bernard, Lyon.

Cole, L.C. (1954). The population consequences of life history phenomenon. *Quarterly Review of Biology* **29**, 103-37.

Concon, J.M. et Soltess, D. (1973) Rapid micro-kjedahl digestion of cereal grains and other biological materials. *Analytical Biochemistry*, **53**, 35-41.

Corbel, H., Morlon, F., Geiger, S. et Groscolas, R. (2009) State-dependent decisions during the fledging process of king penguin chicks. *Animal Behaviour* **78**, 829-838.

Cribier, N.G. (2003) Myologie de l'aile chez la buse variable, *Buteo Buteo* Linné. Thèse pour le doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Crow, M.T. et Stockdale, F.E. (1986) Myosin expression and specialisation among the earliest muscle fibers of the developing avian limb. *Developmental Biology* **113**, 238-254

Cubo, J. et Casinos, A. (2000) Incidence and mechanical significance of pneumatisation in the long bones of birds. *Zoological Journal of the Linnean Society* **130**, 499-5010.

Currey, J.D. et Alexander, R.M. (1985) The thickness of the walls of tubular bones. *Journal of Zoology* (London) **206**, 453-468.

D-

Daan, S. et Tinbergen, J.M. (1997). Adaptation of life histories. In: *Behavioural Ecology: an evolutionary approach* (ed J.R. Krebs & N.B Davies.), 4th Edition. Blackwell Science, Cambridge.

Dawson, W.R. (1975) Avian physiology. *Annual Review of Physiology* 37, 441-465.

Descamps, S., Gauthier-Clerc, M., Gendner, J.-P. et Le Maho, Y. (2002) The annual breeding cycle of unbanded king penguins *Aptenodytes patagonicus* on Possession Island (Crozet). *Avian Science* 2, 1-12.

Duchamp, C. et Barré, H. (1993) Skeletal muscle as the major site of nonshivering thermogenesis in cold-acclimated ducklings *American Journal of Physiology* 265, R1076-1083.

Duchamp, C., Barré, H., Rouanet, J.L., Cohen-Adad, F. et Minaire, Y. (1989) Nonshivering thermogenesis and adaptation to fasting in king penguin chicks. *American Journal of Physiology* 265, R744-751.

Duchamp, C., Barré, H., Rouanet, J. L., Lanni, A., Cohen-Adad, F., Berne, G. et Brebion, P. (1991) Nonshivering thermogenesis in king penguin chicks. I. Role of skeletal muscle. *American Journal of Physiology* 261, R1438-1445.

Duchamp, C., Cohen-Adad, F., Rouanet, J.L. et Barré, H. (1992) Histochemical arguments for muscular non-shivering thermogenesis in Muscovy ducklings. *The Journal of physiology* 457, 27-45.

Duchamp, C., Rouanet, J.L. et Barré, H. (2002). Ontogeny of thermoregulatory mechanisms in king penguin chicks (*Aptenodytes patagonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 131, 765-773

Dumont, E.R. (2010) Bone density and the lightweight skeletons of birds. *Proceedings of the Royal Society B* 277, 1-6.

E-F

Erbrech, A., Robin, J-P., Guérin, N., Groscolas, R., Gilbert, C. et Martrette, J-M. (2011) Differential muscular myosin heavy chain expression of the pectoral and pelvic girdles during early growth in the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) chick. *The Journal of Experimental Biology* **214**, 1829-1835.

Fauconneau, B. (1996) Le déterminisme génétique du développement musculaire. *INRA Productions Animales* **9**, 211-231.

Folch, J., Lees, M. et Sloane Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* **226**, 497-509.

G-

George, J.C. et Berger, A.J. (1966) *Avian Myology*. London and New York: Academic Press.

Girondot, M. et Laurin, M. (2003) Bone Profiler: a tool to quantify, model, and statistically compare bone-section compactness profiles. *Journal of Vertebrate Paleontology* **23**: 458-461.

Guinet, C., Koudil, M., Bost, C.-A., Durbec, J.-P., Georges, J.-Y., Mouchot, M.-C. et Jouventin, P. (1997) Foraging behaviour of satellite-tracked penguins in relation to the sea-surface temperature obtained by satellite telemetry at Crozet Archipelago during the austral summer: a three year study. *Marine Ecology-Progress series* **150**, 11-20.

Groscolas, R. (1982) Changes in plasma lipids during breeding, molting and starvation in male and female Emperor Penguins (*Aptenodytes forsteri*) *Physiological Zoology* **55**, 44-55.

Groscolas, R. (1986) La reproduction des manchots antarctiques: aspects écophysiologicals, endocrinologiques et nutritionnels. *Océanis*, **12**, 85-101.

Groscolas, R. (1990) Metabolic adaptations to fasting in Emperor and King Penguins. In: *Penguin biology* (ed L.S. Davis & J.T Darby), pp. 269-296. Academic Press, London

Guth, L. et Samaha, F.J. (1969) Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Experimental Neurology*, **25**, 138-152.

Guth, L. et Samaha, F.J. (1972) Erroneous interpretations which may result from application of the “myofibrillar ATPase” histochemical procedure to developing muscle. *Experimental Neurology* **34**, 465-475.

H-

Habib, M.B. et Ruff, C.B. (2008) The effects of locomotion on the structural characteristics of avian limb bones. *Zoological Journal of the Linnean Society* **153**, 601-624.

Hamilton, W.D.J. (1964). The genetical evolution of social behavior. *Journal of Theoretical Biology* **7**, 1-53.

Heath, R.G.M. et Randall, R.M. (1985) Growth of jackass penguin chicks (*Spheniscus demersus*) hand reared on different diets. *Journal of Zoology* **A205**, 91-105.

Helmi, C. et Cracraft, J. (1977) The growth patterns of three hindlimb muscles in the chicken. *Journal of Anatomy* **123**, 615-635.

Hémery, G. (2001) Biodiversity and adaptations of extant marine birds : an overview. In : *Secondary adaptation of tetrapods to life in water*, Mazin J.M & Buffrénil V. de (Eds). München : Verlag Dr. Friedrich Pfeil, pp 119-139.

Hocquette, J-F., Ortigues-Marty, I., Damon, M., Herpin, P. et Geay, Y. (2000) Métabolisme Energétique des muscles squelettiques chez les animaux producteurs de viande. *INRA Productions Animales* **13**, 185-200.

Hohtola, E. et Stevens E.D. (1986) The relationship of muscle electrical activity, tremor and heat production to shivering thermogenesis in Japanese quail. *The Journal of Experimental Biology* **125**, 119-135

Hohtola, E. et Visser, G.H. (1998) Development of locomotion and endothermy in altricial and precocial birds. In: *Avian growth and development: Evolution within the altricial-precocial spectrum* (ed. J.M. Starck and R.E Ricklefs), pp. 157-173. Oxford University Press.

I-J-K

Isenmann, P. (1971) Contribution à l'éthologie et à l'écologie du Manchot empereur (*Aptenodytes foresti* Gray) à la colonie de Pointe Géologie (Terre Adélie). *L'Oiseau et la Revue française d'Ornithologie* **41**, 9-64.

Janmot, C. et d'Albis, A. (1994) Electrophoretical separation of developmental and adult rabbit skeletal muscle myosin heavy chain isoforms: example of application to muscle denervation studies. *FEBS Letters* **353**, 13-15.

Jouventin, P. et Lagarde, F. (1995) Evolution ecology of the King penguin (*Aptenodytes patagonicus*): the self regulation of the breeding cycle. In: *The Penguins: Ecology and Management* (ed. P. Dann, I. Norman and P. Reilly), pp. 80-95. Surrey Beatty, Chipping Norton.

Kato, A., Ropert-Coudert, Y., Grémillet, D. et Cannell, B. (2006) Locomotion and foraging strategy in foot-propelled and wing-propelled shallow-diving seabirds. *Marine Ecology Progress Series* **308**, 293-301.

Kitaysky, A.S. (1999) Metabolic and developmental responses of alcid chicks to experimental variation in food intake. *Physiological and Biochemical Zoology* **72**, 462-473.

Kovacs, C. E. et Meyers, R. A. (2000) Anatomy and Histochemistry of Flight Muscles in a Wing-Propelled Diving Bird, the Atlantic Puffin, *Fratercula arctica*. *Journal of Morphology* **244**, 109-125.

L-

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Laurin, M., Girondot, M. et Loth, M.-M. (2004) The evolution of long bone microstructure and lifestyle in lissamphibians *Paleobiology* **30**, 589–613.

Lequette, B. et Weimerskirch, H. (1990). Influence of parental experience on the growth of wandering albatross chicks. *The Condor* **92**: 726–731.

Lewis, S., Elston, D.A., Daunt, F., Cheney, B. et Thompson, P.M. (2009) Effects of extrinsic and intrinsic factors on breeding success in a long lived seabird. *Oikos* **118**, 521-528.

Li, Y., Yuan, L., Yang, X., Ni, Y., Xia, D., Barth, S., Grossmann, R. et Zhao, R-Q. (2007) Effect of early feed restriction on myofibre types and expression of growth-related genes in the gastrocnemius muscle of crossbred broiler chickens. *British Journal of Nutrition* **98**, 310-319.

Lindström, Å., Visser, G.H. et Daan, S. (1993) The energetic cost of feather synthesis is proportional to basal metabolic rate. *Physiological Zoology* **66**, 490-510.

Lowey, S., Fuillermina, S.W. et Trybus, K.M. (1993) Function of skeletal muscle myosin heavy chain and light chain isoforms by an in vitro motility assay. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 20414-20418.

M-

Magrath, R.D. (1990) Hatching asynchrony in altricial birds. *Biological Reviews*, **65**, 587-622.

De Margerie, E. (2004) Histodiversité Osseuse chez les Oiseaux : Signification Fonctionnelle (ontogénique et biomécanique). PhD, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6.

De Margerie, E., Robin, J-P., Verrier, D., Cubot, J., Groscolas, R. et Castanet, J. (2004) Assessing a relationships between bone microstructure and growth rate: a fluorescence labelling study in the king Penguin chick (*Aptenodytes patagonicus*). *Journal of Experimental Biology* **207**, 869-879.

De Margerie, E., Sanchez, S., Cubo, J. et Castanet, J. (2005) Torsional Resistance as a Principal Component of the Structural Design of Long Bones: Comparative Multivariate Evidence in Birds. *The anatomical record part A* **282**, 49-66.

Marsh, R.L. et Wickler S.J. (1982) The role of muscle development in the transition to endothermy in nestling bank swallows, *Riparia riparia*. *Journal of Comparative Physiology B* **149**, 99-105.

Martin, T.E. (1987) Food as a limit on breeding birds: A life-history perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 453-487.

McFarland J.C. et Meyers, R.A. (2008) Anatomy and Histochemistry of Hindlimb Flight Posture in Birds. I. The Extended Hindlimb Posture of Shorebirds. *Journal of Morphology*. **269**, 967-979.

McNabb, F.M.A. et Olson, J.M. (1996) Development of thermoregulation and its hormonal control in precocial and altricial birds. *Poultry and Avian Biology Reviews* **7**, 111-125.

McNabb, F.M.A., Scanes, C.G. et Zeman, M. (1998) Endocrine control of development. In : Starck, J.M., Ricklefs, R.E. (Eds.), *Avian Growth and Development*. Oxford University Press, New York, pp. 174-202.

McNamara, J.M. et Houston, A. I. (1996). State-dependant life histories. *Nature* **380**, 215-221.

Meister, W. (1962) Histological structure of the long bones of penguins. *Anatomical Record* **43**, 377-386.

Ménard, J.J. (1998) Conséquences hormonales et métaboliques du stress de contention chez le Manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*). PhD, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Meyers, R.A. et Mathias, E. (1997) Anatomy and histochemistry of spread-wing posture in birds. 2. Gliding flight in the California gull, *Larus californicus*, a paradox of fast fibers and posture. *Journal of Morphology* **233**, 237-247.

Moe, B. (2004) Energy-Allocation in Avian Nestlings Facing Short-Term Food Shortage. PhD Norwegian University.

Moe, B., Brunvoll, S., Mork, D., Brobakk, T.E. et Bech C. (2004) Developmental plasticity of physiology and morphology in diet-restricted European shag nestlings (*Phalacrocorax aristotelis*). *The Journal of Experimental Biology* **207**, 4067- 4076.

Murphy, M.E., Taruscio, T.G., King, J.R. et Truitt, S.G. (1992) Do molting birds renovate their skeletons as well as their plumages? Osteoporosis during the annual molt in sparrows. *Canadian Journal of Zoology* **70**, 1109-1113.

N-O-P

Nachlas, M.M., Tsou, K.C., De Souza, E., Cheng, C.S. et Seligman, A.M. (1957) Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **5**, 420-436.

Nice, M.M. (1962) Development of behavior in precocial birds. *Linnaean Society of New York. Transactions*

Nichelmann, M. et Tzschentke, B. (2002). Ontogeny of thermoregulation in precocial birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **131**, 751-763.

Olson, J.M. (1994) The ontogeny of shivering thermogenesis in the red-winger blackbird (*Agelaius phoeniceus*). *Journal of Experimental Biology* **191**, 59-88.

Olson, J.M. (2001). Ontogeny of catabolic and morphological properties of skeletal muscle of the red-winged blackbird (*Agelaius phoeniceus*). *Journal of Comparative Physiology B* **171**, 527-542.

Pette, D. et Staron, R.S. (1990) Cellular and molecular diversities mammalian skeletal muscle fibers. *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology* **116**, 1-76.

Ponganis, P.J., Costello, M.L., Starke, L.N., Mathieu-Costello, O. et Kooyman, G.L. (1997) Structural and biochemical characteristics of locomotory muscles of emperor penguin, *Aptenodytes forsteri*. *Respiration Physiology*, **109**, 73-80.

R-

Rathgeber, E.E. et Rosser, B.W.C. (1998) Increase in oxidative capacity of pigeon pectoralis muscle before and after fledging. *Canadian Journal of Zoology*. **76**, 1778-1782.

Reiser, P.J., Greaser, M.L. et Moss, R.L. (1988) Myosin heavy chain composition of single cells from avian slow skeletal muscle is strongly correlated with velocity of shortening during development. *Developmental Biology* **129**, 400-407.

Reiser, P.J., Greaser, M.L. et Moss, R.L. (1996) Contractile properties and protein isoforms of single fibres from the chicken pectoralis red strip muscle. *Journal of Physiology*, **493**, 553-562.

Ricklefs, R.E. (1973) Pattern of growth in birds. II. Growth rate and mode of development. *Ibis* **115**, 177-201.

Ricklefs, R.E. (1979a) Adaptation, constraint and compromise in avian postnatal development. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **54**, 269-290.

Ricklefs, R.E. (1979b) Patterns of growth in birds. V. A comparative study of development in the Starling, Common Tern, and Japanese quail. *The Auk* **96**, 10-30.

Ricklefs, R.E. (1993) Sibling competition, hatchling asynchrony, incubation periods and lifespan in altricial birds. *Current Ornithology*, **11**, 199-276.

Robelin, J. (1990) Différenciation, croissance et développement cellulaire du tissu musculaire. *INRA Productions Animales* **3**, 253-263.

Roff, D.A. (1992). *The Evolution of Life Histories: theory and analyses*. Chapman & Hall, New York.

Roff, D.A. (2002). *Life History Evolution*. Sinauer Associates Inc., Sunderland.

Rosser, B.W.C. et George, J.C. (1986) The avian pectorali: histochemical characterization and distribution of muscle fiber types. *Canadian Journal of zoology* **64**, 1174-1185.

Rosser, B.W.C. et George, J.C. (1987) Ultrastructural and cytological changes in the muscle fibers of the pectoralis of the giant Canada goose (*Branta canadensis maxima*) in disuse atrophy during molt. *Cell and Tissue research* **247**, 689-696.

Rosser, B.W.C., Waldbillig, D.M., Lovo S.D., Armstrong, J.D. et Bandman, E. (1995) Myosin heavy chain expression within the tapered ends of skeletal muscle fibers. *Anatomical Record* **242**, 462-470.

Rosser, B.W.C., Wick, M., Waldbillig, D.M. et Bandman, E. (1996) Heterogeneity of myosin heavy chain expression in fast-twitch fiber types of mature avian pectoralis muscle. *Biochemistry and Cell Biology*, **74**, 715-728.

Rosser, B.W.C., Wick, M., Waldbillig, D.M., Wright, D-J., Farrar, C.M. et Bandman, E. (1998) Expression of myosin heavy chain isoforms during development of domestic pigeon pectoralis muscle. *The International Journal of Developmental Biology* **42**, 653-661.

S-

Schew, W.A. et Ricklefs, R.E. (1998) Developmental plasticity. *Avian Growth and Development* (eds. J.M. Starck & R.E. Ricklefs), pp. 288-304. Oxford University Press, New York.

Scott, I. et Evans, P.R. (1992) The metabolic output of avian (*Strurnus vulgaris*, *Calidris alpina*) adipose tissue liver and skeletal muscle: implication for BMR/body mass relationships. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **103**, 329-332.

Shear, C.R., Bandman, E. et Rosser, B.W.C. (1988) Myosin heavy chain expression during development and following denervation of fast fibers in the red strip of the chicken pectoralis. *Developmental Biology* **127**, 326-337.

Simpson, S. (1979) The distribution of tonic and twitch muscle fibres in the avian wing. *American Zoologist*. **19**, 929.

Smith, D.P., Fletcher, D.L., Buhr, R.J. et Beyer R.S. (1993) Pekin ducklings and broiler chicken pectoralis muscle structure and composition. *Poultry Science*, **72**, 202-208.

Smith, J.H. (1963) Relation of body size to muscle cell size and number in the chicken. *Poultry Science* **42**, 283-290.

Smith, N.C., Wilson, A.M., Jespers, K.J. et Payne, R.C. (2006) Muscle architecture and functional anatomy of the pelvic limb of the ostrich (*Struthio camelus*). *Journal of Anatomy*, **209**, 765-779.

Sokoloff, A.J., Ryan, J.M., Valerie, E., Wilson, D.S. et Goslow, G.E. Jr. (1998) Neuromuscular organization of avian flight muscle: morphology and contractile properties of motor units in the pectoralis (pars thoracicus) of pigeon (*Columba livia*). *Journal of Morphology* **236**, 179-208.

Starck, J.M. et Ricklefs, R.E. (1998) Pattern of Development: The Altricial-Precocial Spectrum, *Avian Growth and Development* (eds. J.M. Starck & R.E. Ricklefs), pp. 3-30. Oxford University Press, New York.

Stearns, S.C. (1976). Life history tactics: a review of the ideas. *Quarterly Review of Biology* **51**, 3-47.

Stearns, S.C. (1992) *The Evolution of Life Histories*. Oxford University press, Oxford.

Stonehouse, B. (1960) The king penguin *Aptenodytes patagonicus* of South Georgia. I. Breeding behaviour and development. *Scientific Report of the Falklands Island Department Survey*, **23**.

Suzuki, A., Tsuchiya, T., Ohwada, S. et Tamate, H. (1985) Distribution of myofiber types in thigh muscles of chickens. *Journal of Morphology* **185**, 145-154.

Sweeny, L.J., Kennedy, J.M., Zak, R., Kokjohn, J. et Kelley, S.W. (1989) Evidence for expression of a common myosin heavy chain phenotype in future fast and slow skeletal muscle during initial stages of avian embryogenesis. *Developmental Biology* **133**, 361–374.

T-

Talesara, G.L. et Goldspink, G. (1978) A combined histochemical and biochemical study of myofibrillar ATPase in pectoral, leg and cardiac muscle of several species of bird. *The Histochemical Journal* **10**, 695-709.

Talmadge, R.J. et Roy, R. R. (1993) Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *Journal of Applied Physiology*, **75**, 2337-2340.

Teulier, L. (2010) Adaptations métaboliques du caneton de Barbarie (*Cairina moschata*) et du Manchot Royal (*Aptenodytes patagonicus*) en réponse à un stress chronique froid. PhD, Université Claude Bernard-Lyon 1.

Tidyman, W.E., Moore, L.A. et Bandman, E. (1997) Expression of fast myosin heavy chain transcripts in developing and dystrophic chicken skeletal muscle. *Developmental Dynamics* **208**, 491-504.

Toppets, V., Pastoret, V., de Behr, V., Antoine, N., Dessy, C. et Gabriel, A. (2004) Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Annales de Médecine Vétérinaire* **148**, 1-13.

Torrella, J.R., Fouces, V., Palomeque, J. et Viscor, G. (1996) Capillarity and fiber types in locomotory muscles of wild mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **166**, 164-177.

Torrella, J-R., Fouces, V., Palomeque, J. et Viscor, G. (1998) Comparative skeletal muscle fibre morphometry among wild birds with different locomotor behaviour. *Journal of Anatomy* **192**, 211-222.

V-

Van Heezik, Y.M., Seddon, P.J., Cooper, J. et Plös, A.L. (1994) Interrelationships between breeding frequency, timing and outcome in King Penguins. Are King Penguins biennial breeders? *Ibis* **136**, 279-284

Velando, A., Ortega-Ruano, J.E. et Freire, J. (1999) Chick mortality in European shag *Stictocarbo aristotelis* related to food limitations during adverse weather events. *Ardea*. **87**, 51-59.

Verrier, D. (2003) Croissance et mue chez le poussin de manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) : aspects écophysiologiques. PhD, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.

Von Lengerken, G., Maak, S. et Wicke, M. (2002) Muscle metabolism and meat quality of pigs and poultry. *Veterinarija ir Zootechnika* **42**, 82-86.

W-

Watanuki, Y., Niizuma, Y., Gabrielsen, G. W., Sato, K. et Naito, Y. (2003). Stroke and glide of wing-propelled divers: deep diving seabirds adjust surge frequency to buoyancy change with depth. *Proceedings of the Royal Society of London B.* **270**, 483-488.

Weimerskirch, H., Stahl, J.C. et Jouventin, P. (1992) The breeding biology and population dynamics of King Penguin *Aptenodytes patagonica* on the Crozet Islands. *Ibis* **134**, 107-117.

West, G.C. (1965) Shivering and heat production in wild birds. *Physiological Zoology* **38**, 111-120

Williams, G.C. (1966). *Adaptation and Natural Selection*. Princeton University Press, Princeton

Williams, P.E. et Goldspink G. (1978) Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. *Journal of Anatomy* **127**, 459-468.

Crédits Photos:

J.Robelin (1990) INRA Prod. Anim 1990, 3 (4), 253-263

<http://www.lergonomie.com/dossier-structure-et-ultra-structure-du-muscle/>

Jean-Patrice Robin

<http://vessiel.no-ip.biz/>

<http://serlaurefenua.over-blog.com>

<http://www.ornitho.eu>

RESUME :

La période qui sépare la naissance d'un individu de l'acquisition de son indépendance est caractérisée par une croissance rapide marquée par une alimentation parentale soutenue. Lorsque la durée d'élevage est longue, l'apport alimentaire parental peut présenter des variations saisonnières liées à des modifications environnementales et devenir un facteur limitant de la croissance. Dans cette situation peu d'études permettent de comprendre comment est géré le développement des tissus lorsque les apports énergétiques sont limités. Afin de répondre à cette question, nous avons étudié la croissance du poussin de manchot royal. Cet oiseau marin, semi-altricial, se caractérise par un élevage long (environ un an) interrompu par une période de restriction alimentaire sévère durant l'hiver austral. L'objectif de ce travail était d'étudier le développement des ceintures pectorale et pelvienne. La masse protéique, les types de fibre et la composition en chaînes lourdes de myosine ont été déterminés dans les muscles. La compacité des os longs a aussi été mesurée. Nous avons montré que le développement rapide des muscles pelviens permet aux poussins d'acquérir une locomotion terrestre indispensable à leur survie. Tandis que la croissance des muscles pectoraux, utilisés pour la nage, est retardée. Les muscles pelviens sont moins affectés par l'hiver que les muscles pectoraux qui seront sollicités plus tard, lors du départ en mer. Le développement des os semble égal au niveau des deux ceintures et aucun effet de l'hiver n'est observé. Finalement, le manchot royal possède une croissance différente des autres espèces altriciales à mettre en relation avec les contraintes environnementales.

Mots clés : manchot royal, développement, muscle squelettique, masse protéique, fibre musculaire, chaîne lourde de myosine, os longs, compacité osseuse

ABSTRACT:

The period between birth and the acquisition of independence is generally characterized by a rapid and continuous growth, and by a steady parental food supply. When the rearing period is long, parental food provisioning may fluctuate seasonally in relation to environmental changes and food shortage becomes a growth-limiting factor. In such situations little is known on how the development of tissues is ensured when energy is limited. We investigated this question in chicks of the king penguin. This semi-altricial seabird is characterized by a long rearing cycle (about one year) which is interrupted by a period of severe food restriction during the sub-Antarctic winter months. The main of this work was to study the development of the pectoral and pelvic girdles. Protein mass, fibre type and myosin heavy chain content were determined in muscles. The bone area was also measured in long bones. We showed that the development of the pelvic muscles allow nestlings to rapidly acquire an effective pedestrian locomotion that is essential for their survival. The growth of the pectoral muscles, which is required for aquatic locomotion, is delayed. In addition, it appears that pelvic muscles were less affected by winter than pectoral muscles, used later for swimming, at departure to sea. The development of the long bones of the pectoral and pelvic girdles seems equivalent and no effect of the winter is observed. Finally, the king penguin has a different growth from the other altricial species, in relation to the environmental constraints.

Key-words: king penguin, development, skeletal muscle, protein mass, muscle fibre, myosin heavy chain, long bones, bone area