



**HAL**  
open science

**Naturellement équipés pour faire face au “stress” ? :  
réponses physiologiques de manchots royaux adultes a  
une augmentation expérimentale des niveaux  
d’hormones glucocorticoïdes**

Emilie Raymond

► **To cite this version:**

Emilie Raymond. Naturellement équipés pour faire face au “stress” ? : réponses physiologiques de manchots royaux adultes a une augmentation expérimentale des niveaux d’hormones glucocorticoïdes. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04414294

**HAL Id: dumas-04414294**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04414294>**

Submitted on 24 Jan 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# NATURELLEMENT ÉQUIPÉS POUR FAIRE FACE AU “STRESS” ? RÉPONSES PHYSIOLOGIQUES DE MANCHOTS ROYAUX ADULTES A UNE AUGMENTATION EXPÉRIMENTALE DES NIVEAUX D’HORMONES GLUCOCORTICOÏDES

---

THESE D’EXERCICE

pour obtenir le titre de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D’ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l’Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**RAYMOND Emilie, Charlotte**

**Directrice de thèse : Mme Annabelle MEYNADIER**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Jean-Luc GUERIN**

Professeur à l’Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**Mme Annabelle MEYNADIER**  
**M. Guillaume LE LOC’H**

Professeure à l’Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences à l’Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITEE :  
**Mme Valérie FILLON**

Docteure Vétérinaire, INRAE de CASTANET-TOLOSAN



**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation  
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

**Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire**

**Directeur : Professeur Pierre SANS**

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*

**PROFESSEURS 2<sup>ème</sup> CLASSE**

- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

## MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **COMBARROS Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- M. **FERCHIOU Ahmed**, *Economie de santé des bovins*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **FUSADE-BOYER Maxime**, *Microbiologie et infectiologie*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Anatomie pathologique*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

## INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
- Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Felipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*
- Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*



# Remerciements

**Aux membres du jury,**

**A Monsieur le Professeur Jean-Luc Guérin,**

Directeur de recherche scientifique

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,

*Aviculture et pathologie aviaire*

Pour avoir accepté avec enthousiasme de présider le jury de cette thèse, hommages respectueux.

**A Madame le Docteur Vétérinaire et Docteur en nutrition moléculaire et cellulaire, Annabelle Meynadier,**

Directrice de recherche scientifique,

Professeure de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,

*Alimentation animale*

Pour avoir accepté de diriger cette thèse et m'avoir fait confiance, sincères remerciements.

**A Madame le Docteur Vétérinaire et Docteur en biochimie et biologie moléculaire, Valérie Fillon,**

Chercheuse, unité Génétique Physiologie et Systèmes d'Elevage de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, Toulouse

Pour avoir accepté avec gentillesse de codiriger cette thèse, sincères remerciements.

**A Monsieur le Docteur Vétérinaire Guillaume le Loc'h,**

Chercheur

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,

*Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*

Pour avoir très aimablement accepté de faire partie de mon jury de thèse, sincères remerciements.

**A ceux qui ont participé à la réalisation de cette thèse,**

**A Monsieur le Docteur en écophysiologie Antoine Stier,**

Chargé de recherches au Département d'Écologie, de Physiologie et d'Éthologie à l'Institut pluridisciplinaire Hubert Curien - Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg,

Pour m'avoir guidée sur le chemin sinueux de l'élaboration de ce travail,

Pour sa bienveillance et son investissement sans faille, ma sincère gratitude.

**Au Laboratoire d'Écologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés et particulièrement à l'équipe Ecophysiologie, Comportement et Conservation de l'université Claude Bernard - Lyon I,**

Pour leur gentillesse, les moments de partage et de science, mes très sincères remerciements.



# Table des matières

Remerciements	5
Liste des abréviations	11
Annexes	12
Table des figures	14
Table des tableaux	16
Table des diagrammes	17
Publications scientifiques	19
Introduction	23
<b>1. Aptenodytes patagonicus : Le Manchot royal</b>	<b>27</b>
1.1. Généralités et systématique de l'espèce	28
1.2. Distribution	30
1.3. Un oiseau marin : contraintes d'un plongeur	32
1.3.1. Thermogenèse	32
1.3.2. Hypoxie	32
1.4. L'alimentation du Manchot royal	33
1.5. Un cycle d'alimentation particulier: le jeûne	34
1.6. L'originalité du cycle de reproduction	35
1.7. Un oiseau très territorial	38
1.8. La pression des prédateurs	39
1.9. Maladies et parasitisme	41
1.9.1. Pathologies connues	41
1.9.2. Ectoparasites	41
1.9.3. Endoparasites	42
1.10. Anthropisation et changement climatique : un impact sur les manchots	43
1.11. Un environnement stressant ?	44
<b>2. La physiologie du stress</b>	<b>46</b>
2.1. L'axe sympathique-adréno-médullaire	48
2.2. L'axe corticotrope : un pilier du stress	50
2.3. La surrénale : production et fonctions biologiques des hormones	52
2.4. Les théories du stress	55
2.4.1. Les pionniers des théories du stress	55
2.4.2. Emergency life-history stage : le stade biologique d'urgence : une nouvelle réponse au stress	56
2.4.3. Evolution de la notion d'homéostasie : l'allostasie	57
2.4.4. "CORT-fitness hypothesis" : l'hypothèse corticostérone-valeur sélective	59
2.5. Composés plasmatiques du métabolisme	60
2.5.1. Métabolisme du jeûne	61
2.5.2. Le glucose : premier substrat énergétique	63
2.5.3. Le lactate : témoin de la glycolyse anaérobie	65
2.5.4. Les triglycérides : stock majeur d'énergie	65
2.5.5. L'acide urique : utilisation des protéines	67

<b>3. Le stress oxydant</b>	<b>70</b>
3.1. La production de pro-oxydants	71
3.1.1. Mitochondrie et respiration cellulaire	71
3.1.2. La production d'espèces réactives de l'oxygène ou du nitrate	74
3.2. La contre attaque de l'organisme : système antioxydant et système de protection	77
3.2.1. Une membrane adaptée	77
3.2.2. Les antioxydants : détoxification des radicaux libres	78
3.2.2.1. Les antioxydants endogènes	78
3.2.2.2. Les antioxydants exogènes	82
3.2.3. Moins produire d'espèces réactives de l'oxygène : le découplage	83
3.2.4. Une fois les dégâts causés : réparation ou élimination	83
3.3. Des conséquences de la molécule à l'individu	84
3.3.1. Dégâts oxydants : lipides, ADN et protéines	84
3.3.2. Espèces réactives de l'oxygène et longévité	87
3.3.2.1. La théorie radicalaire du vieillissement	87
3.3.2.2. Les télomères, une portion du chromosome sensible aux espèces réactives de l'oxygène	88
3.3.2.3. Mitochondrie et vieillissement	90
3.4. Application chez le Manchot	92
<b>4. Expérimentation</b>	<b>96</b>
4.1. Lieu d'étude, l'archipel de Crozet	97
4.2. Stratégie expérimentale	100
4.3. Expérimentation animale	101
4.4. Matériels et méthodes	104
4.4.1. Conception de l'étude	104
4.4.2. Implantation des Manchots royaux avec un implant de corticostérone	108
4.4.3. Prélèvements sanguins	109
4.4.4. Dosage des protéines : kit Pierce® BiCinchoninic acid Assay, Thermo Fisher Scientific.	110
4.4.5. Dosage de la corticostérone et des métabolites plasmatiques	111
4.4.5.1. Dosage de la corticostérone plasmatique : Enzyme immunoassay kit detect X® Arbor Assays.	111
4.4.5.2. Dosage du glucose : Glucose GLUC-PAP, Randox laboratories	112
4.4.5.3. Dosage du lactate : L-Lactate (LAC) Randox laboratories	112
4.4.5.4. Dosage des triglycérides : Triglycerides (TRIGS), Randox laboratories	113
4.4.5.5. Dosage de l'acide urique : uric acid (UA) Randox laboratories	114
4.4.6. Biomarqueurs du stress oxydant	115
4.4.6.1. Les antioxydants	115
4.4.6.1.1. OXY test : capacité antioxydante totale du plasma, DIACRON (Stier et al. 2012)	115
4.4.6.1.2. Dosage de la superoxide dismutase : RANSOD, Randox laboratories	116
4.4.6.1.3. Dosage de la glutathione peroxydase : RANSEL, Randox laboratories	117
4.4.6.2. Marqueurs de stress oxydant	118
4.4.6.2.1. Dosage des métabolites réactifs de l'oxygène dans le plasma, DIACRON (Stier et al. 2012)	118

4.4.6.2.2. Mesures du stress oxydant sur l'ADN	119
4.4.6.2.2.1. Extraction ADN pour qPCR : NucleoSpin® Blood QuickPure	119
4.4.6.2.2.2. Digestion de l'ADN adapté de Quinlivan et Gregory (2008)	119
4.4.6.2.2.3. Dosage des dommages de l'ADN : 8-OHdG, Arbor Assays	120
4.4.6.2.3. Principe de l'amplification des séquences RAG1.3, CO 2.4 et Télo par qPCR	121
4.4.7. Analyse statistique	123
<b>5. Résultats d'expérimentation</b>	<b>125</b>
5.1. Corticostérone et métabolites plasmatique	127
5.1.1. Corticostérone	127
5.1.2. Glucose	128
5.1.3. Lactate	129
5.1.4. Triglycérides	130
5.1.5. Acide urique	132
5.2. Biomarqueurs du stress oxydant	134
5.2.1. Les antioxydants	134
5.2.1.1. OXY test : capacité antioxydante non enzymatique du plasma	134
5.2.1.2. Superoxyde dismutase	135
5.2.1.3. Glutathione peroxydase	136
5.2.2. Marqueurs de l'oxydation	137
5.2.2.1. dROMs : métabolites réactifs de l'oxygène	137
5.2.2.2. Dégâts de l'ADN : 8-OHdG	138
5.2.2.2.1. Matrice ADN : dégâts non réparés	138
5.2.2.2.2. Matrice plasma : dégâts réparés	139
5.2.2.3. ADN mitochondrial : nombre de copies	140
5.2.2.4. Raccourcissement des télomères	142
5.3. Tentatives expérimentales	143
<b>6. Discussion</b>	<b>145</b>
Conclusion	161
Bibliographie	163
Annexes	187

## Liste des abréviations

**8-OHdG** : 8-hydroxyguanosine

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADP** : adénosine diphosphate

**ATP** : adénosine triphosphate

**B-OH** : bêta-hydroxybutyrate

**dROMs** : reactive oxygen metabolites, métabolites réactifs de l'oxygène

**CORT** : corticostérone

**CTE** : chaîne de transport des électrons

**GABA** : acide gamma aminobutyrique

**GLMM** : generalized linear mixed model, modèle linéaire mixte généralisé

**GPx** : glutathione peroxydase

**GR** : globules rouges

**GSH** : Glutathion réduit

**GSSH/GSSG** : Glutathion oxydé

**I.N.T** : 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride

**NRS** : nitrogen reactive species, espèces réactives de l'azote

**PCR** : polymerase chain reaction, réaction de polymérisation en chaîne

**ROS** : reactive oxygen species, espèces réactives de l'oxygène

**SOD** : superoxyde dismutase

**TMB** : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

**TOOS** : N-éthyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)m-toluidine

**XOD** : xanthine oxidase

## Annexes

<b>Annexe 1 :</b> Protocole chirurgical pour la pose d'un implant sous cutané de Caroline Gérard.	<b>187</b>
<b>Annexe 2 :</b> Protocole expérimental BiCinchoninic acid Assay, mesure des protéines.	<b>190</b>
<b>Annexe 3 :</b> Protocole expérimental de dosage de la corticostérone plasmatique : Enzyme immunoassay kit detect X ® Arbor Assays.	<b>190</b>
<b>Annexe 4 :</b> Protocole expérimental de dosage du glucose Glucose GLUC-PAP, Randox laboratories.	<b>191</b>
<b>Annexe 5 :</b> Protocole expérimental de dosage du lactate L-Lactate (LAC) Randox laboratories.	<b>191</b>
<b>Annexe 6 :</b> Protocole expérimental de dosage des triglycérides : Triglycerides (TRIGS), Randox laboratories.	<b>191</b>
<b>Annexe 7 :</b> Protocole expérimental de dosage de l'acide urique : uric acid (UA) Randox laboratories.	<b>191</b>
<b>Annexe 8 :</b> Protocole expérimental OXY test : capacité antioxydante totale du plasma, DIACRON (Stier et al. 2012).	<b>192</b>
<b>Annexe 9 :</b> Protocole expérimental du dosage de la superoxide dismutase : RANSOD, Randox laboratories.	<b>192</b>
<b>Annexe 10 :</b> Protocole expérimental du dosage de la glutathione peroxydase : RANSEL, Randox laboratories.	<b>193</b>
<b>Annexe 11 :</b> Protocole expérimental du dosage des métabolites réactifs de l'oxygène dans le plasma, DIACRON (Stier et al. 2012).	<b>193</b>
<b>Annexe 12 :</b> Protocole expérimental d'extraction ADN pour qPCR : NucleoSpin® Blood QuickPure.	<b>194</b>
<b>Annexe 13 :</b> Protocole expérimental de digestion de l'ADN adapté de Quinlivan et Gregory (2008).	<b>195</b>
<b>Annexe 14 :</b> Protocole expérimental de dosage des dommages de l'ADN : 8-OHdG, Arbor Assays.	<b>195</b>
<b>Annexe 15 :</b> Protocole expérimental de la qPCR avec micPCR et SYBR green.	<b>196</b>
<b>Annexe 16 :</b> Exemple de plan de plaque de qPCR avec micPCR	<b>198</b>
<b>Annexe 17 :</b> Exemple de résultats d'une PCR micPCR, on retrouve le Cq, l'efficacité et le R2 des duplicats	<b>199</b>
<b>Annexe 18 :</b> Exemple de quantification des échantillons avec courbe étalon d'une PCR avec mic PCR	<b>200</b>
<b>Annexe 19 :</b> Effets fixes et effets fixes par stade de la concentration en corticostérone ; Sont étudiés les effets de groupes, de sexe, de stade, de note d'hémolyse ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade, sexe-stade.	<b>201</b>

- Annexe 20** : Effets fixes et effets fixes par stades de la concentration en glucose; Sont étudiés les effets de groupe, de sexe, de stade, de note d'hémolyse ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade, sexe-stade. **202**
- Annexe 21** : Effets fixes de la concentration en lactate; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade. **203**
- Annexe 22** : Effets fixes de la concentration en triglycérides; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade. **204**
- Annexe 23** : Effets fixes et effets fixes par stades de la concentration en acide urique; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade. **205**
- Annexe 24** : Effets fixes de la capacité antioxydante totale; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade, de note d'hémolyse ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade. **206**
- Annexe 25** : Effets fixes de la concentration en SOD; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade, de BCA ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade. **207**
- Annexe 26** : Effets fixes de la concentration en GPx; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe et groupe-stade. **208**
- Annexe 27** : Effets fixes et comparaisons appariées de dROMs; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade, de note d'hémolyse ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade. **209**
- Annexe 28** : Effets fixes de la concentration en 8-OHdG avec matrice ADN; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade. **210**
- Annexe 29** : Effets fixes de la concentration en 8-OHdG avec matrice plasma; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade, de note d'hémolyse ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade. **211**
- Annexe 30** : Effets fixes et comparaisons appariées du nombre de copies de l'ADN mitochondrial; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade. **212**
- Annexe 31** : Effets fixes de la longueur relatives des télomères ; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe et groupe-stade. **213**

## Table des figures

<b>Fig. 1</b> : Illustration du Manchot royal (Miller 1796).	28
<b>Fig. 2</b> : Systématique d’Aptenodytes patagonicus	29
<b>Fig. 3</b> : Manchot royal et son petit (Crozet) © A. Joris	30
<b>Fig. 4</b> : Manchot empereur et son petit © V. Silver	30
<b>Fig. 5</b> : Répartition du Manchot royal	31
<b>Fig. 6</b> : Technique alimentaire du Manchot royal d’après V. Ridoux et al (1988)	33
<b>Fig. 7</b> : Cycle reproducteur du Manchot royal d’après Barrat (1976) et Stahl et al. (1985).	36
<b>Fig. 8</b> : Cycle reproducteur du Manchot empereur détaillé d’après Descamps et al. (2002).	36
<b>Fig. 9</b> : Courbe de croissance d’un poussin de Manchot royal (Stier et al. 2014).	37
<b>Fig. 10</b> : Schéma représentant la colonie de Manchots royaux de la baie du marin (Île de la Possession ; Archipel de Crozet) (Descamps et al. 2009).	40
<b>Fig. 11</b> : Schéma représentant les contraintes environnementales qui pèsent sur le Manchot royal.	44
<b>Fig. 12</b> : Représentation des axes sympathique et corticotrope en réponse au stress.	48
<b>Fig. 13</b> : Enchaînement de neurones du système sympathique.	49
<b>Fig. 14</b> : Axe corticotrope (Turnbull et Rivier 1999)	51
<b>Fig. 15</b> : Couches histologiques de la surrénale	52
<b>Fig. 16</b> : Schéma représentant les notions d’homéostasie réactive, d’homéostasie prédictive et de surcharge homéostatique. (Roméro et al. 2009)	58
<b>Fig. 17</b> : Les fondements théoriques de la “CORT-fitness hypothesis” (Bonier et al. 2009)	60
<b>Fig. 18</b> : Variations de la corticostérone, B-hydroxybutyrate, acide urique (Grocolas et Robin 2001)	62
<b>Fig. 19</b> : Schéma simplifié de la régulation de la glycémie	64
<b>Fig. 20</b> : Schéma du catabolisme protéique	67
<b>Fig. 21</b> : Schéma récapitulatif de la production d’énergie à partir des protéines, des sucres et des lipides.	68
<b>Fig. 22</b> : Schéma représentant la chaîne respiratoire mitochondriale (Bonier et al. 2009)	73
<b>Fig. 23</b> : Origine de la production des espèces réactives de l’oxygène au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Dégletagne 2012).	74
<b>Fig. 24</b> : Origine des espèces réactives de l’oxygène et des espèces réactives de l’azote (Favier 2003).	76
<b>Fig. 25</b> : Enzymes antioxydantes intracellulaires et leurs chaînes de réactions (Indo et al. 2014).	79
<b>Fig. 26</b> : Dommages moléculaires causés par les espèces réactives de l’oxygène (Shields et al. 2021).	85

<b>Fig. 27</b> : Schéma récapitulatif représentant la balance du stress oxydant (adapté de Finkel et Holbrook 2000).	<b>86</b>
<b>Fig. 28</b> : Schéma représentant le “end replication problem” (Hoh 2017)	<b>88</b>
<b>Fig. 29</b> : La théorie radicalaire du vieillissement appliquée aux mitochondries (Adapté de Vendelbo et Nair 2011).	<b>90</b>
<b>Fig. 30</b> : Archipel de Crozet, Sud de l’Océan Pacifique (Schramm et al. 2014)	<b>98</b>
<b>Fig. 31</b> : Photographie de la manchotière de la Baie du Marin (IPEV)	<b>99</b>
<b>Fig. 32</b> : Plan de la zone manchotière en 2020 (Communication personnelle, A. STIER).	<b>99</b>
<b>Fig. 33</b> : Schéma représentant les rotations d'incubation des parents une fois l'œuf pondu ainsi que les prises de sang réalisées en fonction du temps.	<b>106</b>
<b>Fig. 34</b> : Courbe représentant la concentration moyenne de glucose en g/L en fonction du stade et des groupes.	<b>128</b>
<b>Fig. 35</b> : Gel d’électrophorèse après extraction ARN	<b>143</b>

## **Table des tableaux**

<b>Tableau 1</b> : Caractéristiques des zones de reproduction du Manchot royal sur l'île de la Possession (Descamps et <i>al.</i> 2009).	<b>40</b>
<b>Tableau 2</b> : Les différents groupes d'individus étudiés lors de l'expérimentation.	<b>10</b>
<b>Tableau 3</b> : Valeurs acceptables en spectrophotométrie au Nanodrop après extraction d'ADN.	<b>119</b>

## **Table des diagrammes**

<b>Diagramme 1</b> : Concentration moyenne en corticostérone en pg/mL en fonction du stade et des groupes.	<b>127</b>
<b>Diagramme 2</b> : Concentration moyenne de lactate en g/L en fonction du stade et des groupes.	<b>129</b>
<b>Diagramme 3</b> : Concentration moyenne de triglycérides en g/L en fonction du stade et du groupe.	<b>130</b>
<b>Diagramme 4</b> : Concentration moyenne de triglycérides en g/L en fonction du stade et du sexe.	<b>131</b>
<b>Diagramme 5</b> : Concentration moyenne d'acide urique en g/L en fonction du stade et des groupes.	<b>132</b>
<b>Diagramme 6</b> : Concentration moyenne d'acide urique en g/L en fonction du sexe et des stades.	<b>133</b>
<b>Diagramme 7</b> : Valeurs de l'OXY test en fonction du sexe.	<b>134</b>
<b>Diagramme 8</b> : Moyenne des concentrations en SOD en fonction du stade et des groupes.	<b>135</b>
<b>Diagramme 9</b> : Moyenne des concentrations en GPx en fonction du stade et des groupes.	<b>136</b>
<b>Diagramme 10</b> : Moyenne de dROMs en fonction du stade.	<b>137</b>
<b>Diagramme 11</b> : Moyenne des concentrations en 8-OHdG en pg/ug ADN en fonction du stade et des groupes.	<b>138</b>
<b>Diagramme 12</b> : Moyenne des concentrations en 8-OHdG avec matrice plasma en fonction du stade et des groupes.	<b>139</b>
<b>Diagramme 13</b> : Moyenne du nombre de copies d'ADN mitochondrial en fonction du stade.	<b>140</b>
<b>Diagramme 14</b> : Moyenne du nombre de copies d'ADN mitochondrial en fonction du stade et du groupe.	<b>141</b>
<b>Diagramme 15</b> : Moyenne des longueurs relatives des télomères en fonction du stade et des groupes.	<b>142</b>

## **Publications scientifiques**

- Lewden Agnès, Chelsea Ward, Aude Noiret, Sandra Avril, Lucie Abolivier, Caroline Gerard, Tracey Hammer, **Emilie Raymond**, Jean Robin, Vincent Viblanc, Pierre Bize, Antoine Stier, *Surface temperatures are influenced by handling stress independently of glucocorticoid levels in wild king penguins*, 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.06.16.545254>.

- *“Oh you know,  
I had no results during 3 years, that’s  
Science !”*

The man at the first floor, six years ago

University of Aberdeen, Scotland.

## Introduction

L'évolution de notre société moderne et industrialisée expose une grande majorité d'entre nous à une multitude de stimuli stressants dans notre vie quotidienne, par exemple liés à l'urbanisation croissante et à la densité humaine, mais aussi à la pollution.

Les animaux, comme les Manchots royaux, ne sont pas en reste dans leur environnement naturel ; ils sont en effet soumis à de nombreux stressseurs, par exemple, lors de modifications de leur habitat, de climat difficile, ou d'attaque de prédateurs...

Dans les modèles humains et animaux, l'exposition au stress est liée à l'augmentation des taux d'hormones tels que les catécholamines et les glucocorticoïdes qui appartiennent à deux axes physiologiques majeurs, l'axe sympatho-adrénergique et l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien. Ces hormones favorisent la survie de l'individu par des changements de comportements comme la fuite ou l'attaque (Cannon 1929) et des changements physiologiques notamment la mobilisation des réserves énergétiques (Muck *et al.* 1984 ; Wingfield et Romero 2011).

Chez de nombreuses espèces, les facteurs de stress environnementaux impactent négativement les individus, conduisant généralement à une perte de performance reproductive et de valeur sélective ainsi qu'une altération de la santé (Bonier *et al.* 2009 ; Romero *et al.* 2009).

La corticostérone, le glucocorticoïde principal chez les oiseaux, est une hormone centrale dans le maintien de l'homéostasie ; elle entre en jeu dans la gestion de l'équilibre énergétique lors des variations saisonnières et diurnes (Mc Ewen et Wingfield 2003) mais aussi lors de stress environnementaux aigus (Wingfield et Romero 2001 ; Clinchy *et al.* 2013) ou prolongés (Clinchy *et al.* 2012) en réorientant l'énergie vers les fonctions essentielles. Cependant, une exposition chronique à forts taux de glucocorticoïdes peut être délétère.

Au niveau cellulaire, une augmentation prolongée des glucocorticoïdes a été caractérisée par une augmentation des niveaux de stress oxydant et un raccourcissement accéléré des télomères (Slos et Stoks 2008 ; Costantini *et al.* 2011) pouvant potentiellement expliquer un vieillissement accéléré (Costantini *et al.* 2014). Il existe également des effets négatifs sur le système immunitaire.

Une exposition chronique aux glucocorticoïdes pourrait aussi impacter les mitochondries présentes dans les cellules. En effet, la mitochondrie est le lieu de la respiration aérobie et de production des espèces oxydantes. Elle pourrait donc avoir un rôle central dans la réponse au stress et au stress oxydant (Picard *et al.* 2014). Néanmoins, notre compréhension de la façon dont l'exposition au stress/aux glucocorticoïdes impactent l'organisme et accélèrent le raccourcissement des télomères reste limitée et débattue d'un point de vue mécanistique.

La pérennité des espèces animales dépend de leur capacité à s'adapter aux contraintes de l'environnement pour subsister et se reproduire. De ce fait, des adaptations spécifiques au stress environnemental pourraient exister. L'influence de l'exposition à ce stress sur le vieillissement cellulaire et l'homéostasie serait susceptible de différer selon les espèces qui ont évolué dans des conditions environnementales plus ou moins stressantes, mais aussi selon les stratégies de cycle de vie des espèces.

Le Manchot royal est un oiseau vivant en région sub-antarctique. Lors de la reproduction sur terre, son habitat naturel foisonne de facteurs de stress environnementaux : météo difficile, prédation, voisins agressifs, parasites... (Côté 2000 ; Mangin *et al.* 2003 ; Descamps *et al.* 2005). Il a été récemment identifié que les manchots royaux pourraient être naturellement "équipés" pour prévenir l'augmentation du stress oxydant lors d'une exposition aiguë au stress grâce à des changements adaptatifs des défenses antioxydantes endogènes et un découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale (Stier *et al.* 2019).

L'hypothèse de travail pour cette thèse est que le Manchot royal pourrait posséder des mécanismes de protection pour éviter ou limiter l'influence négative de l'exposition chronique à des niveaux élevés de glucocorticoïdes sur le raccourcissement des télomères.

Cette thèse a pour but d'investiguer les effets de niveaux élevés de corticostérone sur les mécanismes énergétiques, le stress oxydant et le vieillissement cellulaire. Pour tester cette hypothèse, des implants sous-cutanés de corticostérone (ou un placebo) ont été administrés en 2018-2019 à des manchots royaux sauvages se reproduisant dans l'archipel de Crozet dans le cadre du programme #119 ECONERGY de l'Institut polaire français (IPEV).

Cette étude débute par des généralités et un exposé des conditions de vie du Manchot royal, notre modèle d'étude ; la seconde partie évoque les grandes lignes du concept de stress biologique et les modifications qu'il engendre sur les organismes. La troisième partie se focalise sur un des effets du stress, le stress oxydant et ses conséquences. La suite de l'étude se penche sur la partie expérimentale du projet avec, classiquement, une partie matériel et méthodes, une présentation des résultats et une discussion.

# **1. Aptenodytes patagonicus : Le Manchot royal**

## 1.1. Généralités et systématique de l'espèce



Le Manchot royal a été décrit pour la première fois en 1768 par T. Pennant (naturaliste gallois) à partir de spécimens rapportés des îles Malouines lors de l'expédition du Capitaine MacBride. C'est le naturaliste britannique J.F. Miller, qui attribua ensuite l'appellation actuelle *Aptenodytes patagonicus* dans son ouvrage *Icones Animalium* publié en 1778 (Stonehouse 1960).

Fig. 1 : Illustration du Manchot royal (Miller 1796).

Le Manchot royal est un oiseau marin trapu avec un corps profilé et fusiforme. Il ne vole pas. Il mesure entre 85 et 95 cm de haut et pèse entre 12 et 14 kg. C'est une espèce pouvant vivre jusqu'à 30 ans et dont la maturité sexuelle est atteinte à 4 ans. Le succès reproducteur est faible : 40% des œufs pondus donnent naissance à un poussin qui survivra jusqu'à son départ de la colonie. La mortalité des adultes est faible, autour de 4 à 10% (Weimerskirch *et al.* 1992).

Le plumage du Manchot royal est identique chez les deux sexes : la partie dorsale du corps est gris argenté, bordée de noir le long de la gorge et des flancs; la partie ventrale du corps est blanche. La queue est courte et de couleur grisâtre. Les pattes sont noires et palmées.

Le Manchot royal est un oiseau appartenant aux Impennes, c'est-à-dire n'ayant pas de rémiges, inapte au vol. L'unique ordre des Impennes forme les Sphenisciformes qui sont en fait le groupe des manchots dont les espèces modernes forment la famille des Spheniscidae. Cette famille regroupe 6 genres et 19 espèces regroupées par la perte de la capacité au vol au profit de la capacité de nage.

Le genre *Aptenodytes*, qui signifie plongeur sans ailes, contient deux espèces : le Manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) et le Manchot empereur (*Aptenodytes forsteri*).

Règne **Animalia**

↳ Sous règne **Bilateria**

↳ Infra-règne **Deuterostomia**

↳ Embranchement des **Chordata**

↳ Sous embranchement des **Vertebrata**

↳ Infra-embranchement des **Gnathostoma**

↳ Super classe des **Tetrapoda**

↳ Classe des **Aves-Oiseaux**

↳ Sous-classe des **Impennes**

↳ Ordre des **Sphénisciformes**

↳ Famille des **Spheniscidae**

↳ Genre **Aptenodytes**

↳ Espèce **Patagonicus**

Fig. 2 : *Systématique d'Aptenodytes patagonicus*

Souvent confondus, les deux espèces se différencient par leur localisation sur le globe, le Manchot royal vit dans les îles australes tandis que le Manchot empereur se trouve sur le continent Antarctique. Par ailleurs, les tailles varient ; le Manchot empereur est le plus grand avec 120 cm de hauteur contre 90 cm pour le Manchot royal. De plus, les taches auriculaires du Manchot royal sont de couleur jaune foncé/orange mais plus foncées que celles de l'empereur et le plumage du poussin Manchot royal est de couleur marron, contrairement à celui du poussin Manchot empereur qui est gris.



*Fig. 3 : Manchot royal et son petit (Crozet)*  
© A. Joris



*Fig. 4 : Manchot empereur et son petit*  
© V. Silver

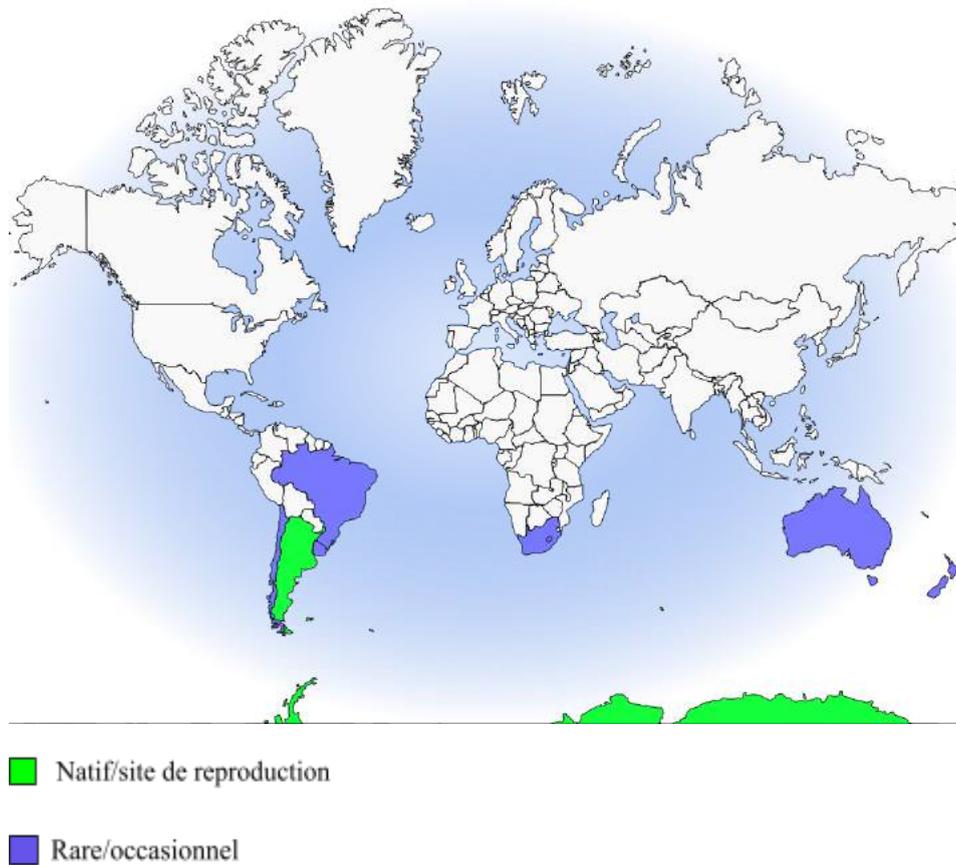
Chez les empereurs, seuls les mâles incubent l'œuf pendant 64 jours consécutifs sans alimentation. Au contraire, chez le Manchot royal, les adultes couvent l'œuf en alternance pendant environ 53 jours.

## 1.2. Distribution

On trouve le Manchot royal dans les archipels subantarctiques comme les îles Kerguelen ou l'archipel de Crozet mais aussi dans les Îles des Shetland du Sud, Îles Malouines, Géorgie du Sud, Archipel du Prince Édouard, Île Heard et Île Macquarie.

La population mondiale est estimée à **1.1 million de couples reproducteurs** (Weimerskirch *et al.* 2018). Les colonies sont pérennes et rassemblent des milliers d'individus. Les sites se trouvent près de la mer où la neige et la glace sont inexistantes. Ces oiseaux vivent essentiellement dans la mer, chassant dans les courants froids. Ils ne viennent à terre que lors de la mue et de la reproduction.

Les adultes arrivent sur les plages vers septembre/octobre pour la reproduction. Leurs aires de reproduction comprennent la Terre de Feu, les îles Malouines, l'archipel de Crozet, les îles Kerguelen et les îles au sud-est de l'Australie et sud-ouest de la Nouvelle-Zélande.



*Fig. 5 : Répartition du Manchot royal (© Avibase )*

## 1.3. Un oiseau marin : contraintes d'un plongeur

### 1.3.1. Thermogenèse

Le manchot est un animal **endotherme**, il doit produire de la chaleur via son métabolisme pour maintenir une température corporelle. Sur terre, les températures sont relativement clémentes mais la forte humidité, le vent et la pluie augmentent fortement les pertes thermiques.

La plongée augmente cette contrainte et crée un stress thermique important. L'eau peut atteindre des températures légèrement négatives (Charrassin et Bost 2001), il y a alors un fort différentiel entre le corps du manchot à 38°C et l'eau. L'animal est soumis à des pertes thermiques par conduction et par convection entre les différents milieux où il se déplace (terre, mer).

Le manchot est un animal parfaitement adapté à son milieu et à ces contraintes thermiques, avec des adaptations telles que : morphologie favorisant un ratio surface/volume faible, duvet isolant, extrémités réduites (loi d'Allen), tissu adipeux sous cutané, système vasculaire d'échangeurs thermiques (Dégletagne 2011).

La thermogenèse peut être assurée par les frissons musculaires, mais également par une thermogenèse sans frisson d'origine musculaire. Ce mécanisme est notamment utilisé par le poussin du Manchot royal (Teulier 2010). La thermogenèse lors de la digestion est aussi un mécanisme permettant de réchauffer l'organisme indirectement (Culik *et al.* 1996).

### 1.3.2. Hypoxie

Outre les contraintes thermiques et énergétiques, il doit faire face à un manque d'oxygène lors de la **plongée en apnée**. Le manchot passe beaucoup de temps dans l'eau lors des voyages alimentaires, les plongées sont longues et peuvent aller en profondeur (jusqu'à 8 min et 300 m de profondeur). Ces plongées sont alternées avec des périodes en surface (généralement moins de 3 min) qui permettent une réoxygénation (Charrassin *et al.* 1998). Cette inadéquation entre les besoins tissulaires et les apports en oxygène contraint l'animal à se retrouver en situation **anaérobie**.

Les manchots dépassent régulièrement les limites théoriques de plongée en aérobie (Ponganis et Kooyman 2000). Ils accumulent alors de forts taux de lactates dont l'élimination a un fort coût énergétique (Ponganis *et al.* 1997). Les tissus de l'animal entrent alors en hypoxie renforcée par des hypoperfusions du fait d'une vasoconstriction périphérique qui permet de garder de la chaleur au centre de l'organisme (Schmidt *et al.* 2006 ; voir thèse Schmidt 2006).

## 1.4. L'alimentation du Manchot royal

Les manchots sont des oiseaux fortement adaptés à leur milieu marin, ils ont donc développé des stratégies de pêche. Leurs capacités de nage exceptionnelles leur permettent d'exploiter les ressources marines dans des zones plus profondes que la plupart des oiseaux marins ce qui permet une distribution des ressources entre les espèces d'oiseaux marins. Un des défis pour ces oiseaux marins est le **coût de la recherche alimentaire**, la nage et la plongée étant plus lentes et plus coûteuses énergétiquement que le vol, coût d'autant plus élevé que la colonie est éloignée des sites de pêche.

Le coût énergétique conséquent de la nage les contraint à s'alimenter sur des proies de petite taille et vivant en bancs. Les voyages alimentaires sont particulièrement longs dans cette espèce, en moyenne 12 jours, mais peuvent aller jusqu'à plus de 20 jours en mer.

Manchot royal	
Intervalle entre deux repas (jours)	6,2
Durée du séjour en mer (jours)	11,9
Vitesse (km/h)	9,8
Rayon maximum théorique (km)	1 400

Fig. 6 : Technique alimentaire du Manchot royal d'après V. Ridoux *et al.* (1988).

Ils capturent les proies sous l'eau après course poursuite parfois sur de longues distances (Bost *et al.* 2002). Ils peuvent pêcher à des profondeurs de 50-240 m (Bost *et al.* 2002 ; Charrassin, Le Maho et Bost 2002) et au maximum durant 15 minutes. La pêche en profondeur s'effectue la journée tandis que la nuit, les profondeurs n'excèdent pas 30 m (Kooyman *et al.* 1992). Ils pêchent plusieurs heures par jour ce qui engendre une forte dépense énergétique à couvrir, d'autant plus que la température de l'eau est basse.

Le Manchot royal se nourrit principalement de poissons pélagiques et particulièrement de Myctophiidées, les **poissons lanternes** (*Lectrona carlsbergi*, *Kreffichthys anderssoni* et *Protomyctophum tenisoni*). Il peut être amené à manger des **céphalopodes** en moindre quantité (Ridoux *et al.* 1988 ; Rodhouse *et al.* 1998). La proportion de céphalopodes consommés augmente durant l'hiver (Adams et Klages 1987).

En raison des zones de pêche et du type de proies, il ne semble pas y avoir de compétition alimentaire avec les autres oiseaux marins vivant sur l'archipel.

Hormis les protéines, les acides gras et autres composés essentiels, on retrouve des molécules **antioxydantes** comme la vitamine E, la vitamine C, le glutathion, les caroténoïdes, l'ubiquinone dans l'alimentation des oiseaux marins notamment dans le krill (Tou *et al.* 2007 ; Manchot Adélie : Beaulieu *et al.* 2010).

## 1.5. Un cycle d'alimentation particulier: le jeûne

Une alternance de phases de **jeûne à terre** et d'**hyperphagie en mer** chez le Manchot royal est imposée par son cycle de reproduction.

Le cycle du Manchot royal est caractérisé par 3 jeûnes :

Durant la **mue prénuptiale** : le manchot ne peut pas plonger du fait de la perméabilité de son plumage et vit alors sur ses réserves sur une période de 32 jours en moyenne (27-36 j) (Barrat 1976 ; Cherel *et al.* 1988 a). La mue annuelle a lieu de novembre à janvier. A la suite de la mue, les oiseaux partent en mer se nourrir pendant 2 à 5 semaines.

Durant la période de **reproduction**, le manchot ne va pas se nourrir durant plusieurs semaines c'est-à-dire de la parade nuptiale à la ponte. Une fois l'œuf pondu, le mâle effectue la première rotation d'incubation. La durée du jeûne pour le mâle peut durer jusqu'à 54 jours (38 jours en moyenne) (Cherel *et al.* 1988 a), tandis que la femelle part se nourrir après la ponte.

Les **poussins** subissent eux aussi des phases de jeûne, une **première fois** durant l'hiver austral où les parents n'effectuent plus de nourrissage et sont en mer ; la croissance du poussin est alors stoppée durant à peu près 3 mois, pouvant aller jusqu'à 5 mois (Barrat 1976). Par la suite, les parents effectuent une seconde phase de nourrissage du poussin avant qu'il n'entame sa mue, période pendant laquelle les parents ne l'alimentent plus : il est donc contraint de jeûner une **seconde fois**.

Le métabolisme du jeûne est étroitement lié aux hormones qui régulent les apports et sources énergétiques corporelles. Des variations d'insuline, glucagon mais aussi de corticostérone ont été étudiées durant les différentes phases du jeûne (Cherel *et al.* 1988 b).

Le jeûne est aussi connu depuis une centaine d'années (Osborne *et al.* 1917) pour être un facteur de longévité. Cependant, les mécanismes ne sont pas encore connus précisément (voir J. Speakman : The Effects of Graded Levels of Calorie Restriction).

## **1.6. L'originalité du cycle de reproduction**

Les oiseaux marins ont pour la plupart des conditions de reproduction très contraignantes, ce qui engendre des caractéristiques de cycle biologique telles qu'ils ont des petites couvées, un rythme de croissance lent, une fréquence d'alimentation des poussins réduite et un faible taux de reproduction (Lack 1968). En moyenne, le taux de reproduction est autour de **28-36%** selon les études.

Lors de la période de reproduction, les parents sont monogames et l'accouplement a lieu après une parade du mâle. Le cycle de reproduction est spécial, il dure **14-16 mois** ce qui équivaut à une reproduction deux fois tous les 3 ans (Stonehouse 1960 ; Barrat 1976 ; Jiguet et Jouventin 1999).

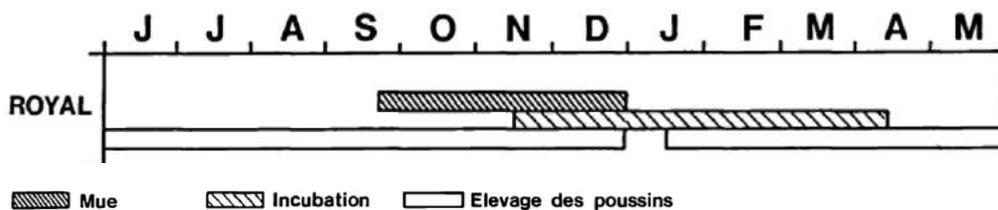


Fig. 7 : Cycle reproducteur du Manchot royal d'après Barrat (1976) et Stahl et al. (1985).

Le cycle de reproduction du Manchot royal débute entre septembre et décembre par une **mue prénuptiale**. Cette phase dure entre 2 et 5 semaines.

Ensuite, les oiseaux partent en mer pour un **voyage alimentaire prénuptial** qui dure de 15 jours à 3 semaines pour constituer des réserves énergétiques. Les adultes sont prêts à s'accoupler au retour du voyage.

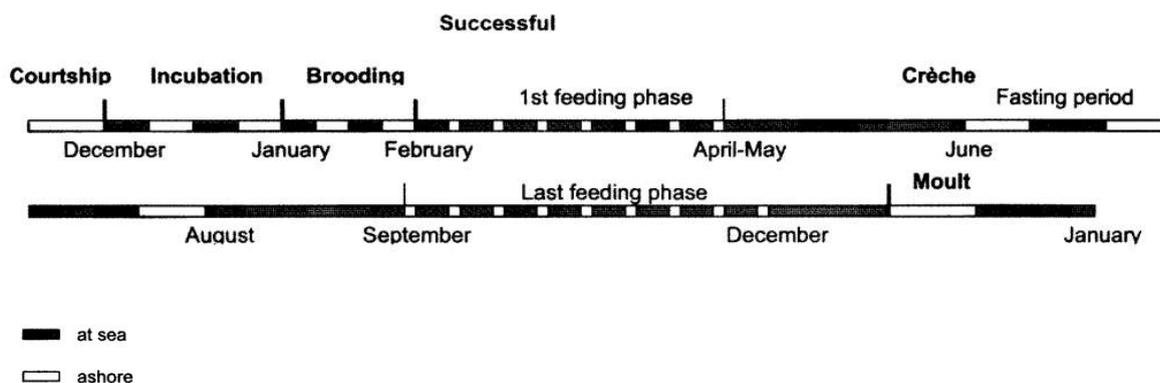


Fig. 8 : Cycle reproducteur du Manchot empereur détaillé d'après Descamps et al. (2002).

L'**accouplement** a lieu au sein de la colonie entre novembre et mars et dure deux semaines durant lesquelles le couple jeûne. Après avoir choisi leurs partenaires et avoir paradé, la copulation a lieu afin de créer un **unique œuf** qui éclot au printemps. La période de ponte s'étale sur 4 mois. Les reproducteurs tardifs arrivent rarement à mener leur poussin jusqu'au sevrage. Cela est dû au fait que les poussins tardifs n'atteignent pas un poids suffisant avant l'hiver, où ils ne sont que peu, voire pas, nourris (Weimerskirch 1992).

L'**incubation de l'œuf** dure 52-54 jours durant lesquels les parents alternent la garde de l'œuf. Le mâle débute l'incubation tandis que la femelle part s'alimenter en mer. À peu près 14 jours après, la femelle revient et le mâle à son tour prend la mer. Il y a ainsi une alternance de rotations d'incubation et de voyages alimentaires pour les deux partenaires. Durant l'incubation, l'œuf est maintenu sur les pattes de l'adulte et couvert par un repli de peau abdominale très vascularisé et déplumé afin de transférer un maximum de chaleur.

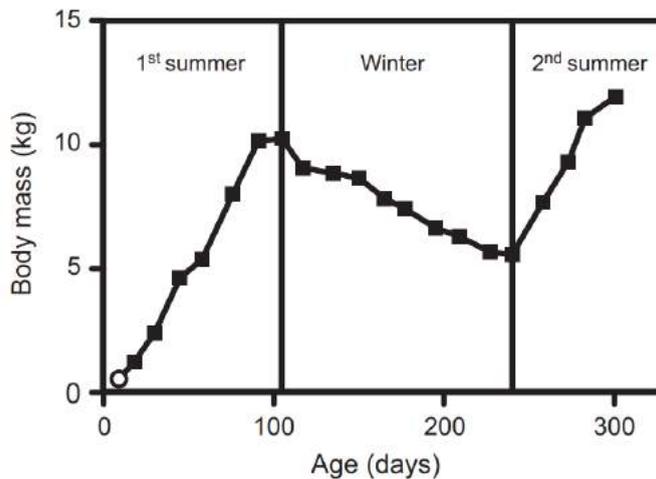


Fig. 9 : Courbe de croissance d'un poussin de Manchot royal (Stier *et al.* 2014).

La croissance du poussin s'articule en trois parties, une première période de **croissance** durant 3-4 mois, une **période d'amaigrissement** lorsqu'il est dans la crèche durant l'hiver austral et enfin une **seconde période de croissance** qui se clôt avec la mue et le départ en mer.

Après l'éclosion, le poussin sera nourri par **régurgitation**. Les aliments sont conservés non digérés dans l'estomac des parents grâce à un peptide antibactérien, la **sphéniscine**, permettant ainsi à l'adulte de nourrir le poussin sur une longue période en attendant le retour de son partenaire (Thouzeau *et al.* 2003).

Les jeunes sont fréquents et peuvent être longs. Vers l'âge de 25 à 35 jours, le poussin arrive à thermoréguler ; les parents peuvent alors quitter la colonie en même temps pour s'alimenter en mer. Les poussins sont alors rassemblés en **crèches** dans lesquelles ils peuvent rester seuls durant les phases de recherche alimentaire des parents. Les jeunes manchots sont capables de partir en mer à l'âge de 10 à 12 mois, après l'acquisition du **plumage de juvénile**, et ainsi de se nourrir seuls (Barrat 1976).

## 1.7. Un oiseau très territorial

Lors de la rotation de reproduction, les adultes défendent près de 0.5 m<sup>2</sup> (Barrat 1976) autour de l'œuf ou du jeune contre les prédateurs et mais aussi contre les autres manchots ; ils restent très statiques autour de leur zone. Le manchot est un oiseau particulièrement territorial, ils tendent à être plus agressifs envers leurs voisins lorsque le poussin est très jeune et juste avant la formation des crèches (Coté *et al.* 1999).

Ce stress aigu lié à la défense territoriale a été souligné par une élévation du rythme cardiaque durant les conflits entre voisins et des augmentations des taux de corticostérone lors de la reproduction dans les zones de forte densité de population (Viblanç *et al.* 2012 ; Viblanç *et al.* 2014). En effet, au centre de la colonie, le nombre et la densité de voisins augmentent, il y a donc moins de distance entre les territoires de reproduction individuels des oiseaux (Viblanç 2014). Les localisations des oiseaux dans la colonie modifient aussi leurs comportements ; le taux de coups de becs et d'ailes augmente du bord vers le centre durant la couvaison.

Les manchots peuvent passer jusqu'à 20% de leur temps à défendre leur territoire avec près de 112 interactions agressives par heure (Coté *et al.* 1999). Les deux partenaires ne montrent pas de différence d'agressivité en fonction du sexe.

## 1.8. La pression des prédateurs

Les principaux prédateurs du Manchot royal en mer sont les **Orques, les Otaries à crinière et les Léopards de mer** qui attaquent les manchots adultes lors des plongées ou sur le rivage (Karine *et al.* 2013).

Sur terre, les **Pétrels géants** (*Macronectes halli* et *Macronectes giganteus*), les **Labbes bruns** (*Catharacta lonnbergi*) et les **Goélands dominicains** (*Larus dominicanus*) sont les principaux prédateurs des poussins et des œufs. Plus rarement, les adultes affaiblis ou blessés sont attaqués par des Pétrels géants. Les Chionis s'attaquent parfois aux œufs voire aux poussins des Manchots royaux.

La proie principale des Pétrels (82%) est le poussin lorsqu'il est dans les crèches. Pour les Labbes, les œufs sont la proie majoritaire à 66% et les poussins couvés représentent 34% (Descamps *et al.* 2004). Les Pétrels attaquent plus lorsqu'il pleut et leur taux de réussite est meilleur tandis que les Labbes ne semblent pas être affectés par les conditions météorologiques. Les Pétrels chassent de jour comme de nuit (Le Bohec *et al.* 2003). Concernant les lieux de prédation, il ne semble pas y avoir de différence pour les Labbes. Pour les Pétrels, l'été, 80% des prédatons réussies ont eu lieu sur la plage tandis que l'hiver, 70 % des prédatons réussies ont eu lieu au centre de la colonie.

Sur 10 000 couples de cette colonie, le **succès reproducteur est de 27%** en moyenne (Descamps *et al.* 2002), soit 7300 paires qui échoueront à se reproduire. La **prédation est la cause de l'échec dans 48 % des cas**, en grande majorité à cause des Pétrels (85%), soit une estimation de près de 3 900 poussins et œufs tués sur une année, près de 3000 par les Pétrels géants et 900 par les Labbes (Descamps 2004).

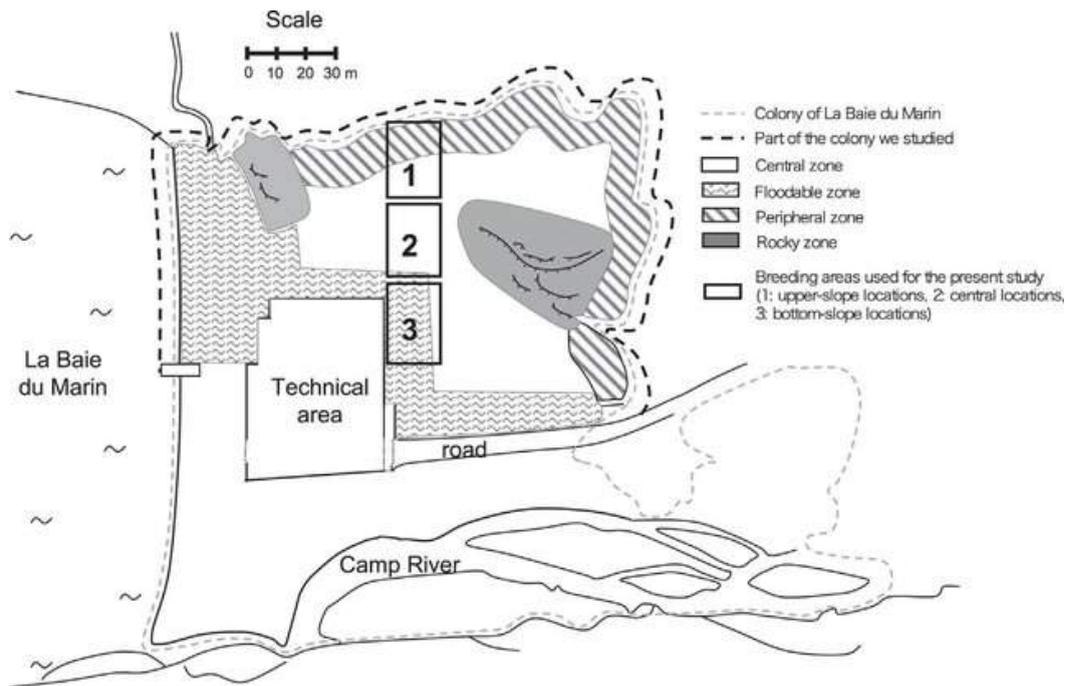


Fig. 10 : Schéma représentant la colonie de Manchots royaux de la baie du marin (Île de la Possession ; Archipel de Crozet) (Descamps et al. 2009).

	Upper slope	Central	Lower slope
Tick infestation	+	-	-
Predation risk	+	-	+
Flooding risk	-	-	+
Penguin aggressiveness	-	+	-

Tableau 1 : Caractéristiques des zones de reproduction du Manchot royal sur l'île de la Possession (Descamps et al. 2009).

La prédation est accentuée sur les zones en hauteur ou basses (1 et 3 dans la figure 10).

Les tiques se trouvent plus sur la zone 1 en hauteur.

Logiquement le risque d'inondation est plus élevé en zone 3 basse près de l'eau.

Les agressions entre voisins sont plus prononcées en zone 2 centrale.

Pour des oiseaux vivant en colonie comme le Manchot royal, le modèle “**centre-périphérie**” est admis ; c'est-à-dire que les oiseaux au centre d'une colonie seraient dans un environnement de meilleure qualité et donc auraient un succès reproducteur supérieur aux oiseaux en périphérie.

Cela pourrait être dû aux contraintes liées à la localisation comme le parasitisme, la prédation ou bien les agressions du voisinage (Coté 2000) (Fig. 10 ; Tableau 1), selon si l'on se place en haut de la colonie, au centre ou en bas. Il faut également savoir que les zones centrales sont les premières occupées par les oiseaux en début de saison, or un reproducteur précoce a plus de chances d'élever un poussin jusqu'au bout. Cependant, les oiseaux en périphérie seraient moins impactés par les variations météorologiques telles que les inondations ou les tempêtes (Bried et Jouventin 2001).

Néanmoins, chez les Manchots royaux, il ne semble pas y avoir de différences significatives quant au succès reproducteur selon la localisation du couple dans la colonie (Descamps *et al.* 2009).

## **1.9. Maladies et parasitisme**

### **1.9.1. Pathologies connues**

Le Manchot royal peut être atteint par des maladies répandues chez les oiseaux. On retrouve notamment la présence de certains virus comme la maladie de Newcastle (paramyxovirus), les flavivirus, mais aussi des bactéries comme *Bacillus spp.*, *Chlamydia spp.* et l'agent de la maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi* ou des fungi comme *Aspergillus spp.* (Clarke et Kerry 2000).

Cependant, il existe peu de données portant sur l'archipel de Crozet et l'île de la Possession.

### **1.9.2. Ectoparasites**

Les principaux ectoparasites retrouvés chez les Manchots royaux sont des tiques : *Ixodes uriae*, probablement *Ixodes kerguelensis*. Ces tiques peuvent transmettre des pathogènes comme la bien connue *Borrelia burgdorferi*, agent de la maladie de Lyme.

Dans une population étudiée, environ 50% des individus sont porteurs de tiques (Gauthier-Clerc *et al.* 1999) et près de 14% des adultes sont porteurs d'anticorps contre la borréliose de Lyme lorsqu'ils sont porteurs de tiques (soit 7% de la population adulte totale, faible séroprévalence confirmée par Schramm *et al.* 2014). Il existe une forte variation d'individus infestés en fonction de leur localisation dans la colonie, les zones périphériques en hauteur seraient les plus touchées. Ils peuvent aussi être touchés par des poux broyeur comme *Austrogoniodes brevipes* ou *Nesiotinus demersus* (Murray *et al.* 1990).

### 1.9.3. Endoparasites

En captivité et dans la nature, certains individus de l'espèce sont infectés par le protozoaire *Plasmodium* transmis par l'anophèle. Cependant, il est fort probable que les conditions environnementales des îles sub-antarctiques ne permettent pas la transmission du parasite. Dans le genre *Aptenodytes*, il n'y a pas d'autres parasites sanguins détectés actuellement. Néanmoins, dans d'autres espèces de Sphéniscidés, on retrouve *Leucocytozoon*, *haemoproteus*, *Babesia*, *Trypanosoma*, *Microfilariae*. D'après les aires de distributions des vecteurs, *Trypanosoma* et *Microfilariae* ne devraient pas pouvoir atteindre les manchots de l'archipel de Crozet (Vanstreels *et al.* 2016).

On trouve également chez le Manchot royal une multitude d'helminthes. Des Cestodes sont décrits dans l'espèce : *Tetrabothrius paulani* (intestin), *Tetrabothrius wrighti* (intestin), *Stomadius spp.* (estomac). Des Nématodes : *Contracaecum spp.* (gastrointestinal), *Contracaecum heardi* (oesophage/estomac), *Tetrameres wetzeli* (oesophage/estomac). Ainsi que deux acanthocéphales, *Corynosoma hamanni* / *Corynosoma pseudohamanni* (Clarke et Kerry 2000 ; Fonteneau *et al.* 2011). Les espèces soulignées sont celles retrouvées à Crozet.

*Tetrabothrius wrighti* constitue près de 97.5% des vers trouvés avec une prévalence d'infestation de 100 % dans l'étude de Fonteneau *et al.* (2011) se déroulant sur l'île de la Possession, Crozet.

## 1.10. Anthropisation et changement climatique : un impact sur les manchots

Le réchauffement climatique impacte aussi les Manchots royaux. En effet, le Front Polaire Antarctique, une zone de résurgence qui sépare les eaux antarctiques et subantarctiques, recule vers le Sud éloignant les manchots de leur zone de pêche privilégiée (Cristofari *et al.* 2018). De ce fait, la distance à parcourir entre la zone de pêche et le lieu de reproduction est voué à s'accroître, laissant le poussin jeûner sur une durée encore plus importante (Péron, Weimerskirch et Bost 2012). Le **manque de nourriture** engendré pourrait faire baisser la survie des adultes (Olsson et van der Jeugd 2002). C'est ce que montre un modèle qui prédit un déclin de la survie des adultes de 9% par 0.26°C de réchauffement (Le Bohec *et al.* 2008).

Le climat à terre a aussi de fortes chances d'évoluer avec le réchauffement climatique global, entraînant une augmentation de la fréquence des **phénomènes météorologiques extrêmes** tels que des vagues de chaleur ou des inondations.

Certaines activités humaines telles que la pêche, les constructions ou bien les marées noires peuvent aussi avoir des impacts sur la population (Moore, Robertson et Wienecke 1998). Actuellement, les manchots royaux ne sont dérangés que par la présence de 33 scientifiques en moyenne et d'une présence militaire à Crozet. Cela dit, le fort développement du **tourisme**, notamment dans des zones reculées, pourrait fortement changer la donne et impacter un peu plus les populations présentes.

On note également des **maladies aviaires importées** pouvant mettre en péril les populations d'oiseaux, comme ce fut le cas du choléra aviaire avec le Gorfou sauteur du Nord sur l'île d'Amsterdam. Le risque d'une épidémie de grippe aviaire H5N1 est toujours à craindre sur ces territoires isolés.

Il y a probablement des impacts cachés de l'anthropisation avec le rejet de **microplastiques** et de **polluants organiques phosphorés** dans l'eau qui impactent directement les populations de krill et poissons, mais on manque actuellement de données dans ce domaine.

## 1.11. Un environnement stressant ?

Cette étude s'intéressera à l'animal lors de ses séjours terrestres entre deux voyages alimentaires. Sur terre, il doit jongler entre différentes contraintes générant du stress et pouvant impacter son cycle de vie :

- des contraintes météorologiques comme des températures en moyenne à 5°C entraînant la nécessité de produire de la chaleur corporelle, la pluie quasi quotidienne avec près de 2 500 mm d'eau de pluie par an, le vent très présent avec 100 jours par an à près de 100 km/h, ainsi que des événements plus extrêmes comme les tempêtes.
- des contraintes liées à son cycle reproductif notamment lors de l'incubation qui engendrent des phases de jeûnes longues et répétées.
- ou encore des contraintes liées au territoire et à la place de l'individu dans la colonie par rapport à ses voisins et aux conflits avec eux.

De plus, les Manchots royaux sont aussi soumis à la pression de la prédation des Pétrels et des Labbes qui déciment les petits et les œufs dès qu'ils en ont l'occasion, ainsi que la pression parasitaire et des autres pathogènes.

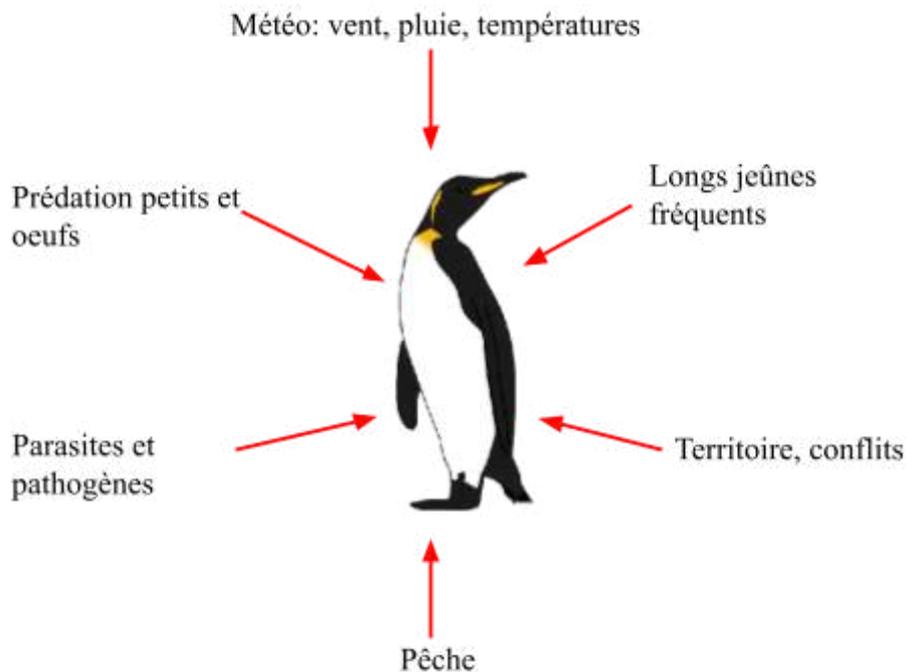


Fig. 11 : Schéma représentant les contraintes environnementales qui pèsent sur le Manchot royal.

Les Manchots royaux font donc face à de nombreux défis environnementaux lorsqu'ils se reproduisent sur terre. Ces événements aléatoires et répétés peuvent alors créer du stress aigu et chronique chez les individus menant à des augmentations d'adrénaline, noradrénaline et corticostérone, les hormones du stress.

Cependant, il faut garder à l'esprit que la majorité des stress perçus par les Manchots royaux sont inhérents à leur environnement et à leur mode de vie. Les Manchots royaux ont évolué dans cet environnement "stressant" et sont donc parfaitement adaptés à leur biotope. D'autre part, depuis plusieurs années de nouveaux stress apparaissent notamment liés au changement climatique : changement de la zone de chasse, phénomènes météorologiques extrêmes... menant à une modification du biotope originel. Le développement du tourisme est également à craindre, bien que limité et encadré actuellement, et un dérangement massif en période de reproduction pourrait s'avérer dangereux pour l'espèce et engendrer un stress alors inconnu à ce stade.

## **2. La physiologie du stress**

Le stress est une notion introduite en 1936 par Hans Selye ; il le définit en médecine humaine comme : *“Agression de l’organisme par un agent physique, psychique, émotionnel entraînant un déséquilibre qui doit être compensé par un travail d’adaptation ; agent qui agresse ; tension nerveuse, contrainte de l’organisme face à un choc (événement soudain, traumatisme, sensation forte, bruit, surmenage) ; état d’une personne soumise à cette tension”*.

Le stress est considéré comme une **réponse non spécifique** à toute demande qui lui est faite face à un stressor. Le mot « **stress** » désigne donc plusieurs concepts : **l’agent qui provoque la réaction, la réaction, l’état résultant de la réaction.**

Le stress est traduit biologiquement par des réactions à court et à long termes de l’organisme, notamment par la sécrétion d’hormones. Lorsqu’un stress est perçu par l’individu/l’organisme, il est intégré par le cerveau (évaluation du risque, maîtrise du risque...) puis des effecteurs entrent en jeu comme l’axe corticotrope, les systèmes nerveux sympathique et parasympathique. Finalement, l’individu va s’adapter face au stress et mobiliser les ressources nécessaires pour réagir.

Le phénomène de stress est considéré comme un dispositif de vigilance salutaire. Cependant, toute sur-vigilance peut engendrer des dommages lorsque la quantité de demandes dépasse la capacité de réponse du sujet.

## 2.1. L'axe sympathique-adréno-médullaire

L'axe sympathique-adréno-médullaire ou axe sympatho-adrénergique est le premier système à se mettre en route lors d'un stress aigu, en **quelques secondes**, avec la production de **catécholamines** (adrénaline/noradrénaline). Les catécholamines permettent une **réaction rapide** de l'animal et une mobilisation rapide des ressources énergétiques pour fuir ou combattre le stress.

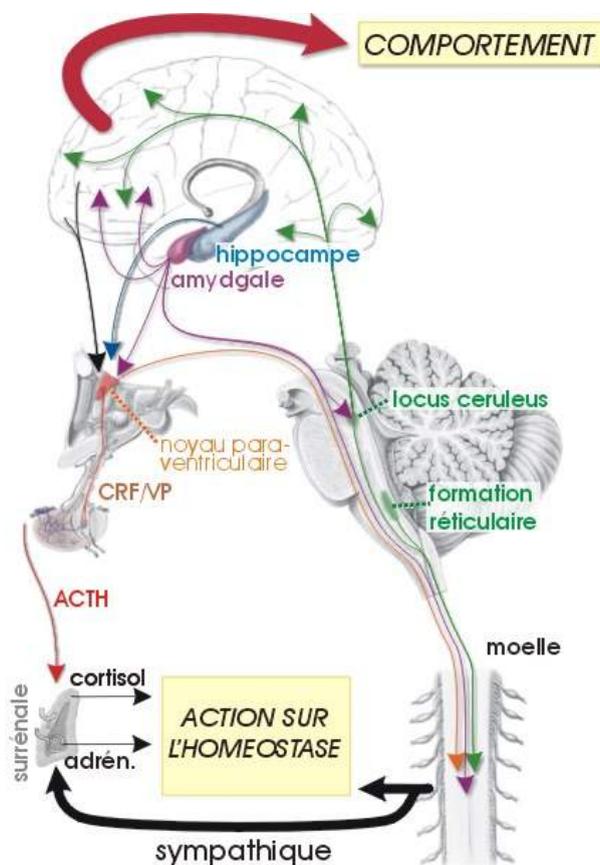


Fig. 12 : Représentation des axes sympathique et corticotrope en réponse au stress. (<http://www.medecine.unige.ch/enseignement/apprentissage/module3/pec/apprentissage/neuroana/stress/stress2.htm>)

Lors de la perception d'un stress, le locus coeruleus et la formation réticulaire présents dans le bulbe rachidien (myélocéphale), qui sont formés de neurones noradrénergiques, activent la division sympathique du système nerveux autonome (**action stimulatrice** : réponse "combat ou fuite") en libérant de la **noradrénaline** dans le système nerveux central.

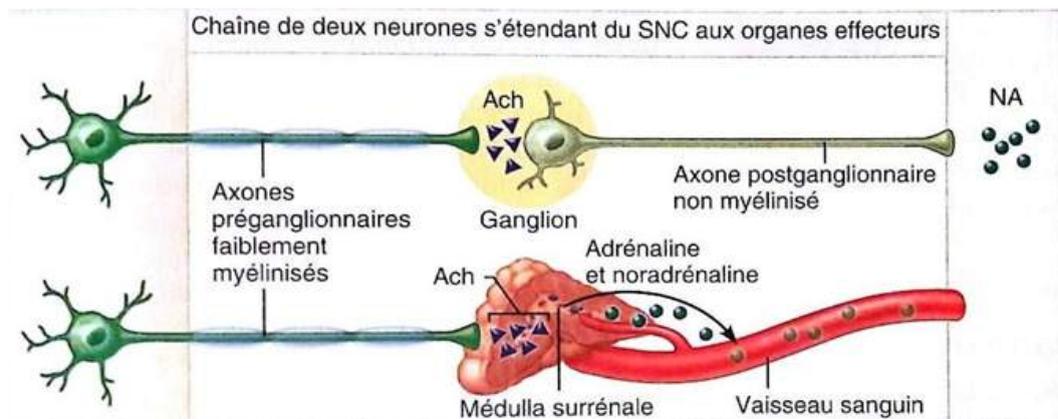


Fig. 13 : Enchaînement de neurones du système sympathique.  
(<https://mystidia.com/resume-adam-m-roumani-sna/>)

*Ach* : acétylcholine  
*NA* : noradrénaline

Du système nerveux central part un groupe de fibres dans une voie descendante (neurones vasomoteurs pré-sympathiques) qui innervent les **neurones pré-ganglionnaires sympathiques** (acétylcholinergiques). Par la suite, les **neurones post-ganglionnaires** (noradrénergiques) lorsqu'ils s'activent, permettent l'activation de la surrénale (mais pas seulement), ce qui engendre une libération d'**adrénaline** dans le sang. Ici la noradrénaline agit comme un neurotransmetteur au niveau des organes effecteurs.

Cet axe a donc une double action : une **action sur le système nerveux central** sur le noyau paraventriculaire, ce qui contribue également au déclenchement de l'**axe corticotrope**, et une action via les fibres sympathiques sur la **médullosurrénale** qui permet la production d'**adrénaline** et de **noradrénaline** (20% de la production ; agit ici comme une hormone).

## 2.2. L'axe corticotrope : un pilier du stress

Lors d'un stress aigu, nous avons vu que les catécholamines engendrent une réponse immédiate en moins d'une minute. Dans un second temps, en moins de 10 minutes, les **corticostéroïdes** entrent en ligne de compte (Sapolsky, Romero et Munck 2000).

L'axe corticotrope ou axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien constitue un des axes endocriniens majeurs. Il est composé de trois structures principales : l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales. L'axe est activé par divers stimuli : rythme circadien, prise alimentaire, activité physique, stimuli homéostatiques ou externes.

Suite aux stimuli extérieurs (stress), des hormones (AVP, CRH, ACTH) et des neurotransmetteurs (adrénaline, noradrénaline, GABA, acétylcholine, glutamate) vont être produits dans le système nerveux central. Ces molécules vont stimuler le **noyau paraventriculaire** de l'hypothalamus qui va libérer de l'**AVP** (vasopressine, hormone antidiurétique) et de la **CRH** (cortico releasing hormone). Ces hormones vont circuler dans la tige pituitaire par l'éminence médiane qui fait partie du système porte hypothalamo-hypophysaire qui arrive dans le lobe antérieur de l'**hypophyse**.

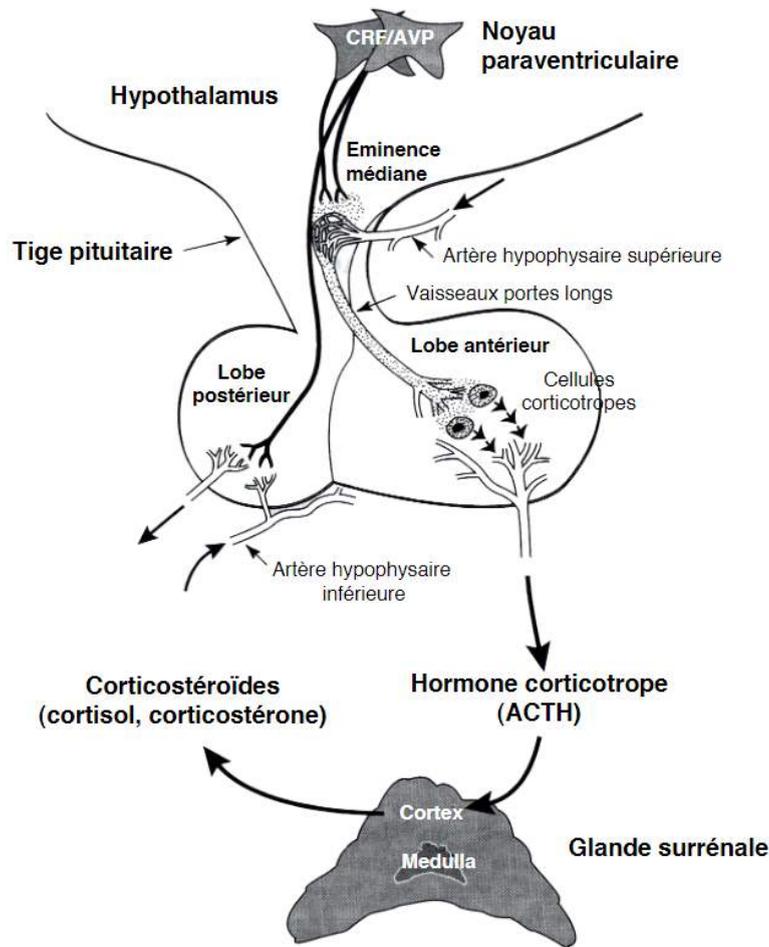


Fig. 14 : Axe corticotrope (Turnbull et Rivier 1999) : les premiers facteurs sont émis dans l'hypothalamus, ils sont ensuite excrétés sur les cellules corticotropes de l'hypophyse ce qui engendre la production ACTH. L'ACTH agit ensuite directement sur le cortex de la surrénale pour produire le corticostéroïde majoritaire : la corticostérone chez les oiseaux.

Une fois dans l'hypophyse, la **CRH** va se trouver dans les capillaires de l'antéhypophyse et va agir sur les cellules corticotropes qui vont à leur tour produire de l'**hormone corticotrope** (ACTH: Adrenocorticotropic hormone). Cette ACTH va par la suite stimuler le **cortex des glandes surrénales** qui vont alors produire des **corticostéroïdes**.

Le cycle possède un **rétrocontrôle négatif** à plusieurs niveaux : hypothalamus, hypophyse et hippocampe, ce qui évite un emballement et permet un retour aux concentrations basales de corticostéroïdes. Autrement dit, les corticostéroïdes produits vont, à partir d'un certain seuil, freiner la production de nouveaux corticostéroïdes.

## 2.3. La surrénale : production et fonctions biologiques des hormones

Les surrénales sont des glandes endocrines situées au-dessus des reins. Elles ont un rôle majeur dans les sécrétions lors de stress et dans la régulation de l'homéostasie hydrosodée. Ici nous détaillerons seulement les productions liées aux réactions de stress.

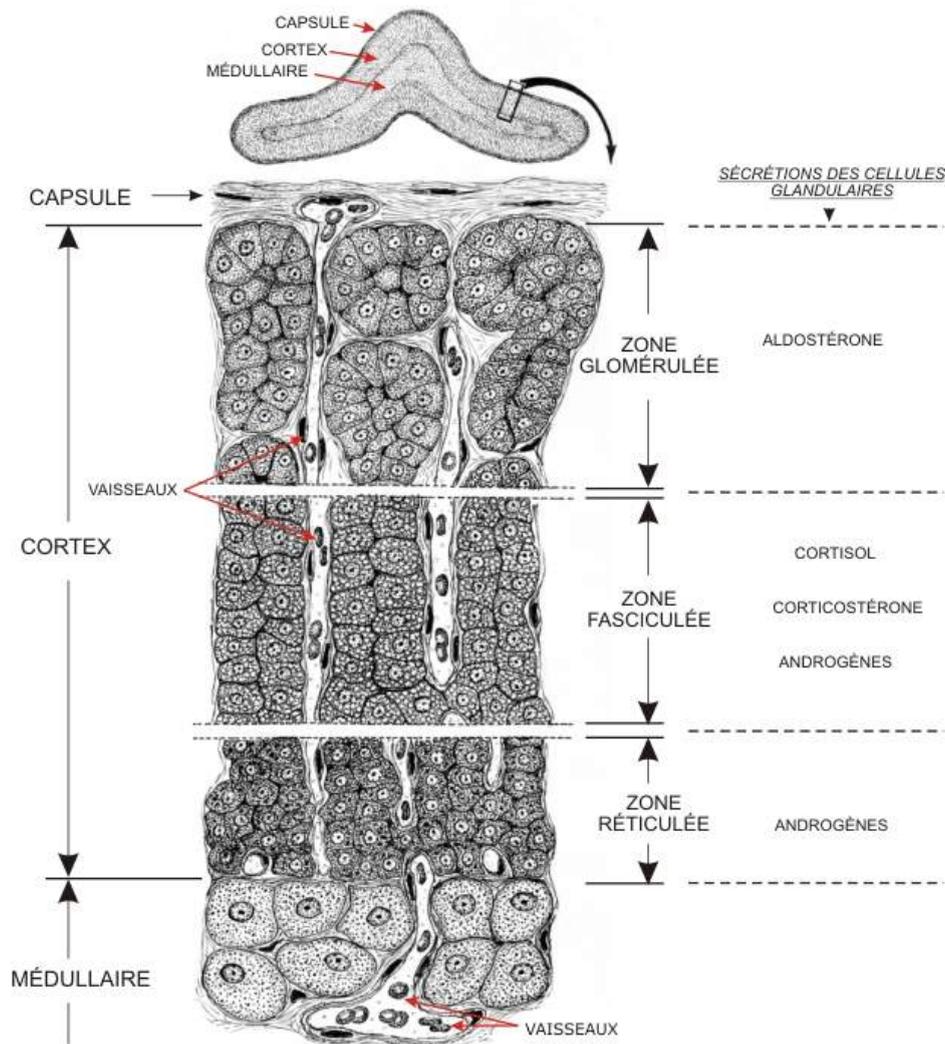


Fig. 15 : Couches histologiques de la surrénale

(<https://blogglophys.wordpress.com/2015/04/23/glande-surrenale/>)

La **médullosurrénale** sous l'action de stress aigu produit de l'**adrénaline** ( $C_9H_{13}NO_3$ )/**noradrénaline** ( $C_8H_{11}NO_3$ ) qui engendrent :

- Augmentation de la glycémie,
- Augmentation de la fréquence cardiaque,
- Vasoconstriction,
- Mobilisation des acides gras.

La médullosurrénale est aussi stimulée par le système nerveux sympathique (via l'acétylcholine).

La partie périphérique de la surrénale, la **corticosurrénale**, produit des **stéroïdes** tels que :

- Zone glomérulée : minéralocorticoïdes dont l'aldostérone sous contrôle du système rénine-angiotensine-aldostérone ;
- Zone fasciculée : produit la **corticostérone** ( $C_{21}H_{30}O_4$ ), stéroïde dominant chez les rongeurs, les reptiles, les amphibiens et les oiseaux sous contrôle de la CRH / ACTH et du cortisol ;
- Zone réticulée : produit des androgènes.

Nous nous intéressons plus précisément aux glucocorticoïdes, représentés majoritairement par la **corticostérone** chez les oiseaux.

Les **glucocorticoïdes** ont des rôles dans (Munck *et al.* 1984) :

- le **métabolisme énergétique** :
  - Augmentation de la glycogénolyse et néoglucogenèse,
  - Inhibition de la consommation de glucose par les tissus périphériques,
  - Inhibition de la production d'insuline,
  - Augmentation du catabolisme protéique,
  - Mobilisation des acides gras,
- Fonction immunosuppressive : diminue les lymphocytes circulants ;
- Fonction anti-inflammatoire : diminue l'inflammation ;
- Potentialisation des effets du système sympathique : vasoconstriction ;
- Métabolisme musculaire et osseux : atrophie, ostéoporose ;

- Déclenchement de la mise bas chez les Mammifères : augmentation du cortisol foetal qui est transformé par le placenta en oestrogènes ; l'augmentation de cortisol stimule la production de prostaglandines qui conduit à la production d'ocytocine et à la chute des taux de progestérone ce qui induit la mise bas ;
- Croissance et développement: accélération de la croissance, maturation foetale ;

La corticostérone est aussi l'hormone dominante lors d'un **stress chronique**, elle permet une **adaptation** de l'individu et une **mémorisation** des évènements stressants.

Les glucocorticoïdes agissent aussi sur le cerveau pour **augmenter l'appétit** (Feillet *et al.* 2006), augmenter le **comportement de recherche alimentaire** (Astheimer *et al.* 1992 ; Sapolsky *et al.* 2000) et l'activité locomotrice (Challet *et al.* 1995). Mais aussi, ils inhibent certains comportements non vitaux comme la reproduction (Sapolsky *et al.* 2000).

La corticostérone a aussi d'autres fonctions spécifiques aux oiseaux : un fort taux de corticostérone ralentit la croissance des plumes en période de mue, et donc allonge la période où l'oiseau ne peut voler. Naturellement, les oiseaux ont des niveaux réduits de corticostérone lors de la mue (Romero, Strohlic et Wingfield 2005).

Chez les poussins, elle a aussi cette action orexigène et bénéfique pour leur propre survie : une augmentation de son taux entraîne une augmentation de la demande de nourriture aux parents et un comportement agressif, ce qui se traduit par une plus grande chance d'obtenir de la nourriture à court terme.

Cependant, à long terme, un taux de corticostérone augmenté lors du développement du poussin peut impacter son fonctionnement cognitif (visualisation de la nourriture dans l'environnement ; résolution de problèmes) et sa croissance (Kitaysky *et al.* 2003).

## 2.4. Les théories du stress

### 2.4.1. Les pionniers des théories du stress

Le stress est un objet d'étude depuis le 19ème siècle notamment avec les travaux de Bernard puis plus tard de Cannon et de Selye.

En 1865, Claude **Bernard**, suite à des observations sur le foie, émet l'hypothèse que la capacité d'un organisme à maintenir un environnement constant où baignent les cellules du corps ("milieu intérieur") est essentielle à la vie indépendamment de l'environnement extérieur.

Dans les années 1930/1940, **Cannon** a ensuite inventé le terme « **homéostasie** » qui décrit la capacité d'un organisme à maintenir dans des plages acceptables des variables physiologiques, comme la glycémie, la température centrale... Il décrit que l'organisme doit posséder des détecteurs de ces variations et des phénomènes de régulation comme les systèmes de feedback négatif et décrit le **système sympatho-adrénalien**.

Par la suite, il décrit les variations de sécrétions aiguës de la surrénale face à un stress, avec la notion de "**fight or flight**" : lorsqu'un animal se trouve face à un stress, il a deux types de réponse, soit il prend la fuite, soit il combat (Goldstein et Kopin 2009).

Dans les années 50/70, **Selye** définit le stress comme "la réponse non spécifique de l'organisme à toute demande qui lui est faite", l'agent agresseur lui-même étant qualifié d'agent stressant. En 1956, il publie «The stress of life» et décrit le mécanisme du **syndrome d'adaptation** comme «*l'ensemble des modifications qui permettent à un organisme de supporter les conséquences d'un traumatisme naturel ou opératoire*».

Il décrit 3 phases dans le **syndrome d'adaptation** biologique :

- **L'alarme : Fight or flight** (Cannon 1929)

L'organisme libère des catécholamines dont l'adrénaline, pour se préparer, ce qui a pour effet d'augmenter la fréquence cardiaque, la tension artérielle, les niveaux de vigilance, la température corporelle...

- **Persistance du stress : phase de résistance**

Rapidement après, les glucocorticoïdes sont sécrétés dans le but d'avoir un apport d'énergie à l'organisme pour affronter la situation.

- **Prolongation ou intensification du stress : phase d'épuisement**

Les capacités de l'organisme sont dépassées, l'autorégulation des glucocorticoïdes ne fonctionne plus. L'organisme est imbibé d'hormones activatrices ayant, à ce stade, des effets délétères sur la santé.

### **2.4.2. Emergency life-history stage : le stade biologique d'urgence : une nouvelle réponse au stress**

Wingfield propose en 1998 la "**Emergency life-history stage**": stade biologique d'urgence (Wingfield *et al.* 1998), un ajout au "Fight or flight" de Cannon.

Il suggère donc que les animaux peuvent avoir un troisième type de réponse lors d'un stress aigu. Cette réponse au stress interromprait le cycle biologique de l'animal pour rediriger la physiologie de son organisme et son comportement pour survivre. Cette réponse mettrait quelques minutes/heures à se développer et aurait des effets à long terme sur la vie de l'animal pouvant aller de quelques heures à plusieurs semaines, avec par exemple des effets sur sa reproduction.

Cet "Emergency life-history stage" pourrait être déclenché par l'augmentation de la **corticostérone**. Ce mécanisme aurait pour but de se soustraire au stress par certains comportements (désactivation des comportements territoriaux, recherche de refuge, fuite de la source de stress, mobilisation des réserves énergétiques, abandon de la progéniture) et **favoriser la survie et le succès reproductif sur le long terme**.

### 2.4.3. Evolution de la notion d'homéostasie : l'allostasie

Le principe de l'**homéostasie** soutient que pour maintenir la stabilité d'un organisme, celui-ci doit maintenir tous les paramètres de son milieu intérieur constant. (Bernard 1865 ; Cannon 1932). Les déviations hors des seuils normaux sont régulées automatiquement par des systèmes de régulation efficaces.

Le concept d'**allostasie** tente d'étendre la vision de la notion d'homéostasie. L'allostasie signifie “ la stabilité au travers du changement” ; c'est-à-dire que l'organisme doit faire varier tous les paramètres de son milieu intérieur afin de correspondre aux demandes du milieu extérieur. Ces adaptations sont régulées via le cerveau qui centralise une réévaluation continue des besoins et des ajustements autour de **nouveaux seuils qui évoluent en permanence** (Eyer et Sterling 1988 ; Mc Ewen et Wingfield 2003). L'axe corticotrope, les catécholamines et les cytokines sont alors les premiers médiateurs de l'allostasie.

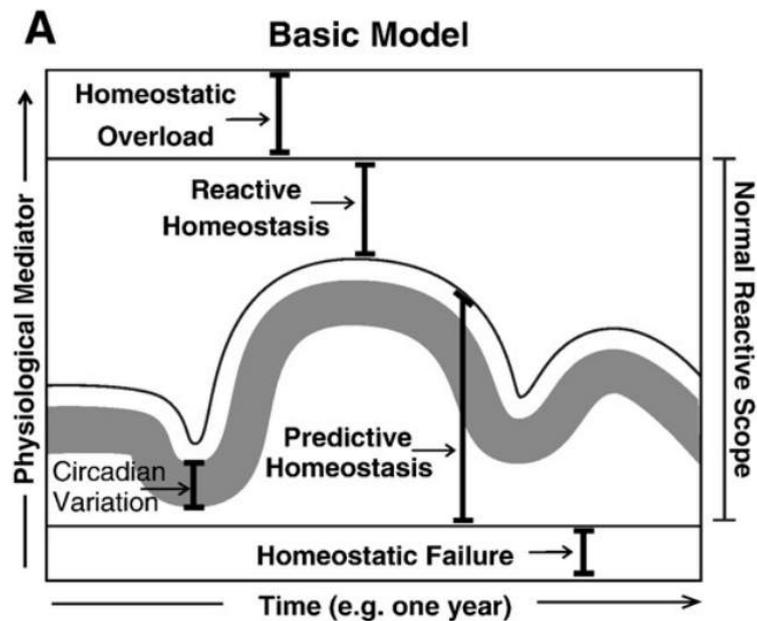


Fig. 16 : Schéma représentant les notions d'homéostasie réactive, d'homéostasie prédictive et de surcharge homéostatique. (Romero et al. 2009)

La gamme la plus basse du graphique montre que lorsqu'un organisme a ses médiateurs physiologiques qui sont en concentration trop basse, il n'arrive pas à maintenir l'homéostasie : c'est l'échec homéostatique.

Lorsque l'on est au-dessus du seuil minimal, l'homéostasie varie selon les changements des cycles biologiques, comme lors du cycle circadien : c'est l'homéostasie prédictive.

Lorsqu'un événement vient perturber l'homéostasie, les médiateurs physiologiques vont réagir pour maintenir l'homéostasie : c'est l'homéostasie réactive.

Les homéostasies prédictive et réactive forment le champ d'application normal des médiateurs physiologiques.

Lorsque les médiateurs réagissent à des niveaux/concentrations trop élevés, ils deviennent alors délétères et peuvent causer des dégâts : c'est la surcharge homéostatique.

Les animaux ont naturellement des variations de la corticostérone basale ce qui permet d'ajuster leur métabolisme, leur comportement face à la demande énergétique imposée par l'environnement lors des cycles jour/nuit ou saisonniers par exemple. On peut considérer que la corticostérone est un **médiateur physiologique**. On peut parler alors d'**homéostasie prédictive** ou **allostasie** car il y a une anticipation du changement de l'organisme calé par des cycles biologiques (Romero et al. 2009).

Lors des situations d'urgence comme la prédation ou la capture par l'homme par exemple ou lors d'un changement saisonnier comme lors de la mue, la reproduction ou la migration qui représentent une adaptation ponctuelle, les variations des taux de corticostérone aident à une réponse rapide de l'organisme.

On peut parler d'**homéostasie réactive** ou de **charge allostatique**, les médiateurs aident à rétablir l'homéostasie (Romero *et al.* 2009). C'est aussi ce type d'évènement qui peut déclencher l'**emergency life-history stage**.

Lorsque les perturbations se multiplient, la charge allostatique peut devenir trop importante et chronique, c'est la **surcharge homéostatique** ou **surcharge allostatique**. Cela signifie que les médiateurs comme les glucocorticoïdes sont présents en quantités anormalement élevées et/ou en durée prolongée (Mc Ewen et Wingfield 2003). Lors d'une surcharge à long terme, l'organisme peut subir des conséquences délétères comme des maladies cardiaques, de l'ostéoporose, diabète, amyotrophie, hypertension...

#### 2.4.4. “CORT-fitness hypothesis” : l'hypothèse corticostérone-valeur sélective

Des taux de glucocorticoïdes élevés et prolongés dans le temps comme lors d'un **stress chronique** sont connus pour engendrer des pathologies, une baisse des chances de survie et potentiellement de la **valeur sélective (fitness)**, c'est-à-dire la capacité d'un individu d'un certain génotype à se reproduire (Bonier *et al.* 2009).

L'hypothèse proposée par Bonier *et al.* (2009) s'articule autour de 3 principes :

- La corticostérone basale est corrélée positivement avec les contraintes environnementales ;
- L'augmentation des challenges environnementaux fait baisser la fitness car les ressources de l'animal doivent être réaffectées pour la survie ;
- La corticostérone basale et la fitness sont corrélées négativement (Tilbrook 2000 ; Wingfield et Sapolsky 2003).

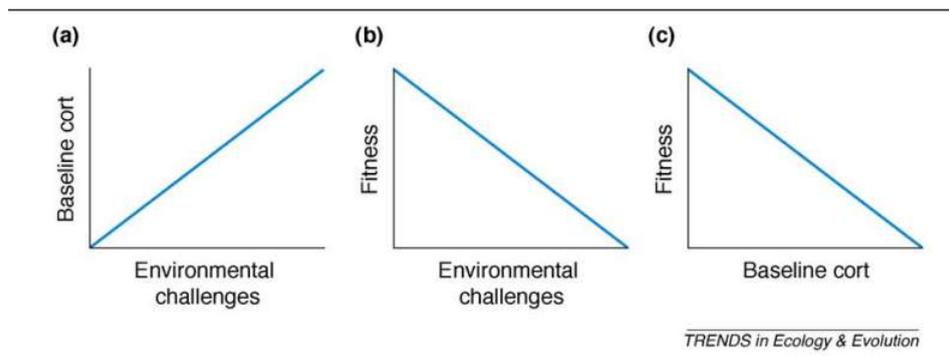


Fig. 17 : Les fondements théoriques de la “CORT-fitness hypothesis” (Bonier *et al.* 2009) :

- (a) On prédit que la BASE CORT augmente en concomitance avec les défis environnementaux (principe 1).
- (b) L'augmentation des défis environnementaux est associée à la diminution de la fitness car les ressources doivent être réaffectées aux dépens de reproduction/ auto-entretien (principe 2).
- (c) Ensemble, ces deux principes conduisent à la prédiction centrale de l'hypothèse de Cort-Fitness : une relation négative entre la BASE CORT et la fitness.

Cependant, la relation entre corticostérone et fitness semble bien plus complexe que cela, les études montrant des résultats très variables et n'adhérant pas forcément à l'hypothèse CORT-fitness (Manchot royal : Groscolas *et al.* 2008 ; Bonier *et al.* 2009 pour une compilation de 53 études examinant fitness et niveaux de corticostérone).

## 2.5. Composés plasmatiques du métabolisme

Lors de stress, les sécrétions des axes sympathique et corticotrope vont agir sur d'autres organes permettant à l'organisme de s'adapter pour réagir au stress. Ces adaptations passent par la libération d'énergie dans l'organisme et donc la libération de certains composés dans le sang. Il est donc intéressant d'étudier les variations de ces composés qui témoignent des adaptations physiologiques de l'organisme face au stress.

Dans notre étude, nous serons amenés à quantifier des métabolites plasmatiques relatifs au stockage énergétique : outre la glycémie, nous quantifierons le lactate issu principalement de la voie de glycolyse anaérobie, les triglycérides mobilisés qui subiront ensuite la lipolyse (libération d'acides gras et de glycérol), et l'acide urique issu de la voie de protéolyse.

### **2.5.1. Métabolisme du jeûne**

Le jeûne est un mécanisme contraignant pour les organismes, pour subsister, les Manchots royaux mobilisent leurs réserves énergétiques.

Le métabolisme du jeûne utilise trois stocks de substrats énergétiques : le glycogène (1%), les protéines (17-23%) et les lipides (82-76%) dans le but de produire du glucose ou d'autres composés pouvant être utilisés pour produire de l'ATP lors de la respiration cellulaire. Chez le mâle Manchot royal, au début du jeûne de reproduction, la réserve lipidique représente 18 % de la masse corporelle et 60 % de l'énergie corporelle (Cherel *et al.* 1993). Le jeûne prolongé cherche à utiliser les réserves lipidiques et à limiter l'impact sur le stock protéique. Il y a une anticipation des jeûnes avec un stockage préférentiel des lipides lors du jeûne d'incubation (Groscolas et Robin 2001).

On peut suivre leurs évolutions dans le temps avec des marqueurs. Pour le glucose, on peut suivre la glycémie ; les lipides peuvent être mesurés avec les triglycérides, les acides gras non estérifiés ou les bêta-hydroxy-butyrate (produits lors de la cétogenèse) ; les protéines avec l'acide urique qui témoigne de leur catabolisme. Les réserves métaboliques sont modulées par nombre d'hormones comme l'insuline et le glucagon mais aussi les hormones thyroïdiennes, la leptine et les glucocorticoïdes.

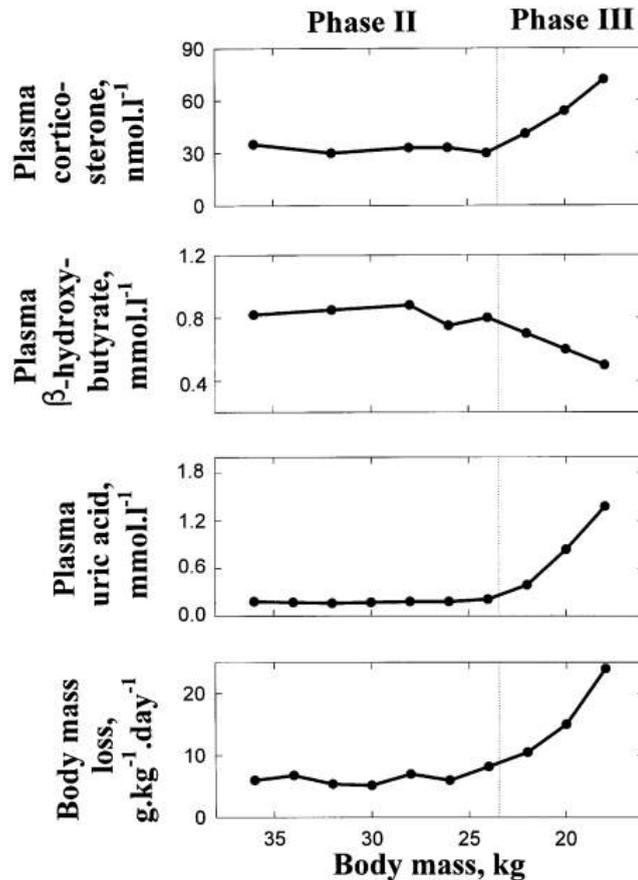


Fig. 18 : Variations de la corticostérone,  $\beta$ -hydroxybutyrate, acide urique et perte de poids journalière en fonction de la perte de poids sur les phases II et III du jeûne du Manchot royal (Groscolas et Robin 2001).

Le jeûne comprend 3 phases distinctes (Cherel *et al.* 1988 ; Groscolas et Robin 2001 ; Thèse A. Gamble 2016) :

### Phase I : adaptation

- Utilisation du **glucose** comme source principale d'énergie, activation de la néoglucogenèse ;
- Début d'utilisation des acides gras et augmentation du  $\beta$ -OH ;
- Les niveaux de corticostérone et d'acide urique baissent.

### Phase II: économie

- La glycémie est stable ;
- L'utilisation des **lipides** s'intensifie, le  $\beta$ -OH augmentent ;
- La corticostérone et l'acide urique sont stables.

### Phase III : critique

- La glycémie et le  $\beta$ -OH baissent ;
- Les **protéines** deviennent la source d'énergie principale, ce qui se traduit par une augmentation de l'acide urique sanguin ;
- Les réserves adipeuses s'épuisent ;
- La corticostérone augmente.

La rupture du jeûne est conditionnée par le retour du partenaire mais aussi par les réserves énergétiques en lipides (Cherel et Groscolas 1999). Généralement, lors de la rupture du jeûne, la majorité des oiseaux sont en phase II et plus rarement en phase III du jeûne (Groscolas et Robin 2001).

Si le partenaire tarde et que l'individu qui couve se trouve en déficit énergétique, avant que cela ne puisse mettre sa vie en danger, un signal de survie, appelé **signal de réalimentation** endogène pousse l'animal à l'abandon progressif de l'œuf et à la recherche alimentaire (Groscolas *et al.* 2000 ; Groscolas et Robin 2001). Lors de l'abandon, l'oiseau est en phase III du jeûne depuis environ une semaine (Groscolas *et al.* 2000).

### 2.5.2. Le glucose : premier substrat énergétique

Le glucose est l'ose le plus présent dans l'organisme. Il est issu de la digestion des glucides alimentaires ou de la production endogène. Le glucose peut être produit à partir de composés non glucidiques (glycérol, acides aminés, lactate...) lors de la **néoglucogenèse** qui se déroule dans le foie principalement.

Il est consommé dans les voies métaboliques comme substrat de la **respiration cellulaire**, processus par lequel les cellules transforment le glucose en énergie.

La glycémie est régulée principalement par l'insuline qui a une action hypoglycémiante et par le glucagon qui a une action hyperglycémiante. Sous l'effet de l'insuline lorsque le glucose est en excès, il peut être stocké lors de la **glycogénogenèse** dans le foie et les muscles sous forme de glycogène et libéré ultérieurement quand cela est nécessaire. Lorsque les stocks de glycogène sont à leur maximum, le glucose peut être stocké dans les tissus adipeux sous forme de triglycérides lors de la **lipogenèse**.

Lors de stress, l'organisme libère des **catécholamines** et de la **corticostérone**, l'individu entre alors dans un état d'hypervigilance : son rythme cardiaque s'accélère, l'anxiété augmente, les muscles se contractent... le métabolisme a alors besoin d'énergie pour faire face au stress et potentiellement répondre par la fuite ou le combat. Ces hormones du stress ont donc une action **hyperglycémiant**e pour couvrir ce nouveau besoin énergétique.

Cette cascade métabolique est montrée chez le Manchot royal lors de stress aigu dans l'étude de Viblan *et al.* (2018).

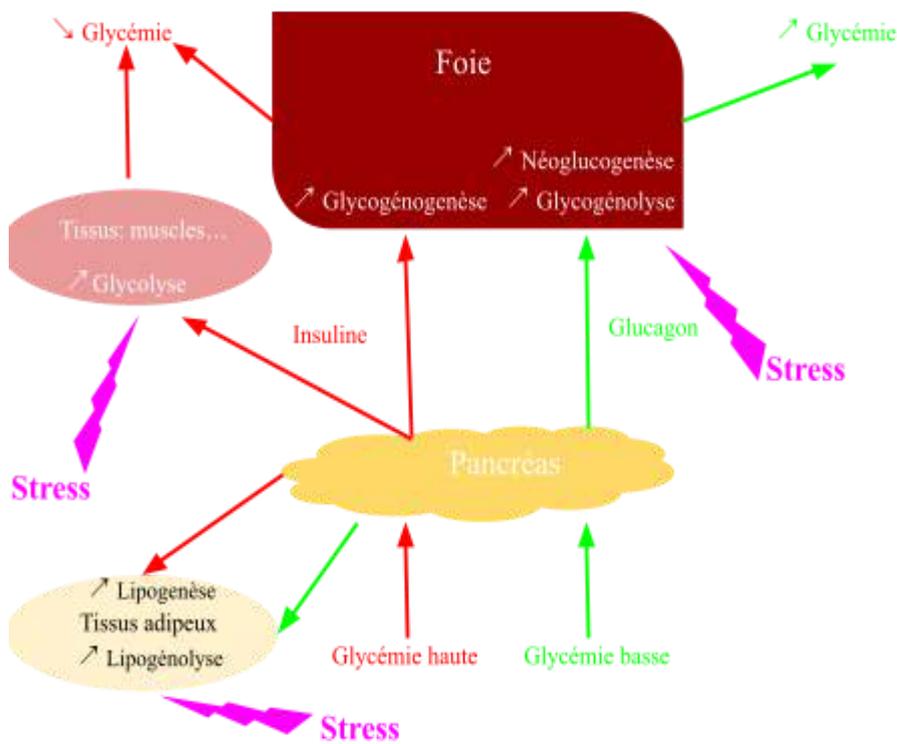


Fig. 19 : Schéma simplifié de la régulation de la glycémie.

Les glucocorticoïdes agissent sur l'augmentation de la glycémie simultanément sur le foie, les muscles squelettiques et le tissu adipeux (Magomedova et Cummins 2016) ; ces tissus cibles possèdent des **récepteurs à glucocorticoïdes**.

### 2.5.3. Le lactate : témoin de la glycolyse anaérobie

Le lactate est le produit final de la **glycolyse anaérobie**. Il est formé à partir du pyruvate sous l'action de la lactate déshydrogénase, essentiellement dans le muscle, le cerveau, la peau et les globules rouges. Cette réaction s'effectue lors d'efforts intenses lorsque la consommation de glucose est supérieure à l'apport d'oxygène. Ainsi, le glucose peut être oxydé dans la mitochondrie pour produire de l'ATP.

Cette réaction est très dépendante de l'oxygénation des tissus, et donc, elle est nettement accrue en cas d'hypoxie.

Sur les Manchots royaux, le lactate a été majoritairement étudié en conditions de plongée donc d'hypoxie. Il est suggéré que les Manchots royaux accumulent probablement le lactate durant les longues plongées et retrouvent un équilibre métabolique en restant plus à la surface ou en venant régulièrement à la surface (Kooyman *et al.* 1992). Cependant, leur schéma de plongée montre qu'ils dépassent régulièrement la limite de plongée aérobie sans durée de récupération adéquate ensuite (Ponganis et Kooyman 2000). Les mécanismes lui permettant de récupérer et d'éviter les effets délétères d'une hypoxie prolongée ne sont pas actuellement élucidés.

Lors d'un stress, les besoins en oxygène augmentent fortement pouvant mener à l'hypoxie. Les voies métaboliques cherchent à produire plus d'énergie, elles produisent donc aussi plus de lactate via la glycolyse anaérobie (Viblanç *et al.* 2018).

### 2.5.4. Les triglycérides : stock majeur d'énergie

Les triglycérides sont le principal composant des graisses animales, ils sont stockés dans les adipocytes et permettent de **produire de l'énergie** par libération d'acides gras lors de la lipolyse.

Ces tissus ont une fonction capitale lors des périodes de **jeûne** du Manchot royal, ils permettent d'avoir un stockage très efficace pour subsister pendant ces phases. Le manchot peut alors maigrir drastiquement lors du jeûne.

Le tissu adipeux joue aussi d'autres rôles : sécrétion d'hormones, immunité ... (Grégoire *et al.* 1998).

Quand la demande énergétique augmente, les lipides sont apportés par le sang aux tissus par des lipoprotéines (VLDL : very low density lipoprotein, lipoprotéine de très basse densité). Par la suite, les lipases tissulaires effectuent la lipolyse des triglycérides présents sur les VLDL ce qui aboutit à la libération d'acides gras et de glycérol.

Le glycérol est acheminé jusqu'au foie par le sang où il est converti, le produit final du métabolisme par le foie ira rejoindre la glycolyse ou la néoglucogenèse.

Les acides gras issus de la lipolyse sont ensuite métabolisés principalement selon une des deux voies suivantes :

- $\beta$ -oxydation (mitochondrie) : produit de l'acétyl-CoA qui, en présence d'oxygène est intégrée au cycle de Krebs ;
- Cétogenèse (foie) : en période de jeûne, le cycle de Krebs ne fonctionne plus car il est détourné pour produire du glucose (néoglucogenèse).

La  $\beta$ -oxydation des acides gras provoque alors l'accumulation d'acétyl-CoA qui est converti en corps cétoniques qui sont exportés dans le sang pour être utilisés comme substituts au glucose.

Le tissu adipeux est notamment régulé par la leptine, qui permet de contrôler la prise alimentaire lors de variations de la masse grasseuse, ainsi que le glucagon qui augmente les concentrations plasmatiques de triglycérides (Grande et Prigge 1970).

Chez l'humain, il est montré que des niveaux croissants de corticoïdes sont corrélés avec des niveaux croissants de triglycérides et de glucose sanguin (Picard *et al.* 2018) et qu'une augmentation en glucocorticoïde fait augmenter les niveaux de glucose et de triglycérides en quelques minutes (De Feo *et al.* 1989).

Comme le glucose, cette réserve énergétique est mobilisée lors de stress aigu chez le Manchot royal lors de la lipolyse comme le montrent Viblanç *et al.* (2018).

### 2.5.5. L'acide urique : utilisation des protéines

Comme la plupart des reptiles, les oiseaux excrètent de l'acide urique, ils sont uricotéliques. Cette excrétion solide limite les pertes en eau en comparaison avec l'excrétion azotée sous forme d'urée. Chez les oiseaux, il existe aussi une voie de transformation de l'acide urique par l'oxydation en allantoiné, mais de faible importance du fait du déficit en urate oxydase, l'enzyme catalysant la réaction (Kaur et Halliwell 1990).

Cet acide urique est le principal **déchet azoté** chez les oiseaux (Wright 1995), il est issu principalement de la dégradation de produits azotés c'est-à-dire du **catabolisme des protéines** (Fig. 20). Il constitue entre 60-80% de l'azote excrété dans la fiente (Skadhauge 1981). L'acide urique est synthétisé par le foie et 90% est sécrété par excrétion urinaire (Skadhauge 1981).

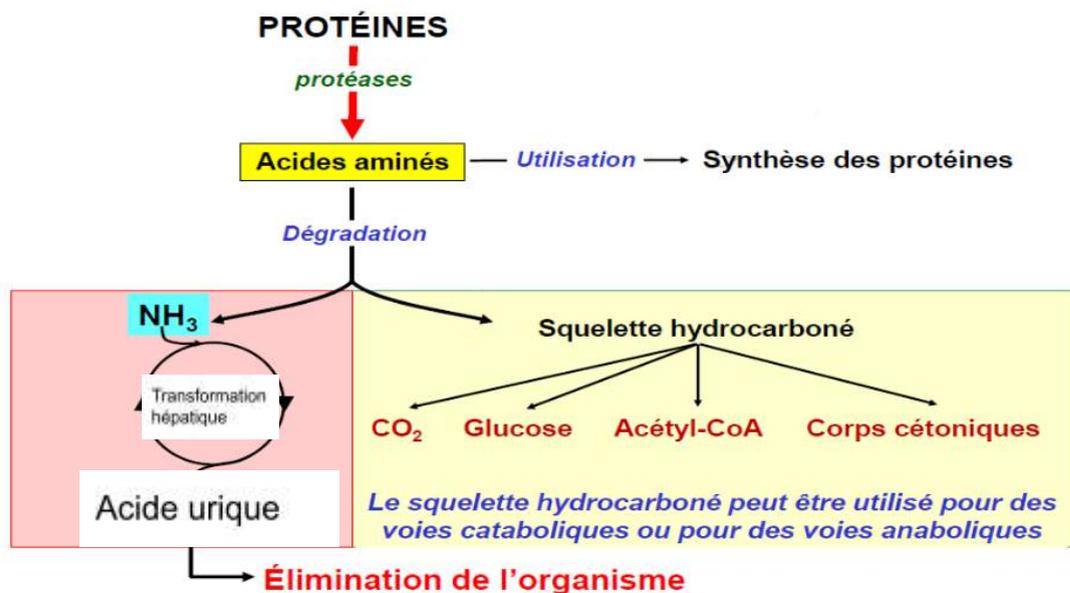


Fig. 20 : Schéma du catabolisme protéique adapté de <https://studylibfr.com/doc/1028958/catabolisme-des-acides-amin%C3%A9s>

Lors de stress, les protéines peuvent être consommées dans le cadre de la mobilisation énergétique de l'organisme, et, de ce fait, de l'acide urique est produit suite à leur catabolisme et se retrouve dans la circulation sanguine, ce qui en fait un marqueur facile d'accès lors d'expérimentations.

De plus, il semble qu'il y ait une corrélation entre stress aigu et taux d'acide urique chez le Manchot royal (Viblanç *et al.* 2018).

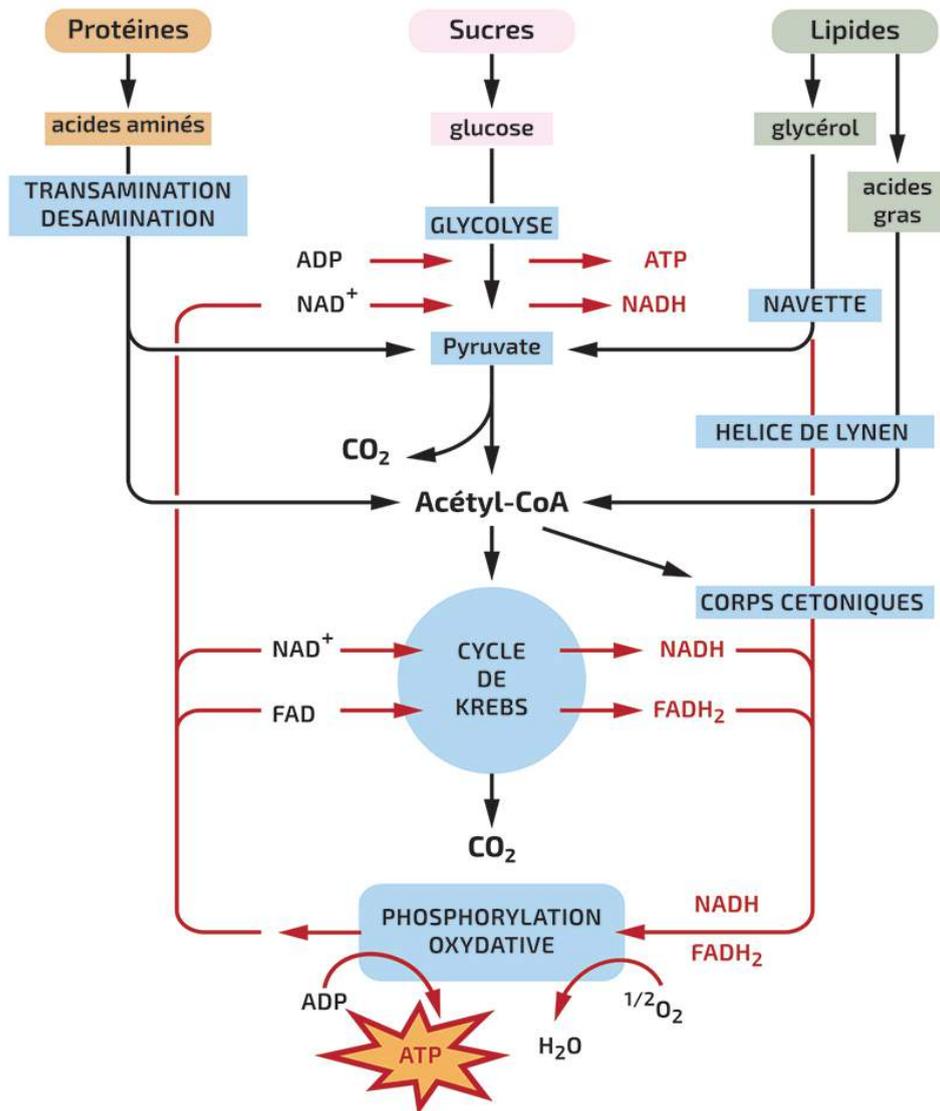


Fig. 21 : Schéma récapitulatif de la production d'énergie à partir des protéines, des sucres et des lipides. <https://rnbio.sorbonne-universite.fr> Droits réservés

Il est admis que les glucocorticoïdes jouent un rôle majeur dans la réponse au stress de l'animal en mobilisant les substrats énergétiques par la glycolyse, la glycogénolyse, la lipolyse, la protéolyse et la néoglucogenèse (Pilkis and Granner 1992 ; Hasselgren 1999 ; Campbell et al. 2011 ; Peckett et al. 2011).

Pour le Manchot royal, quelques études se sont penchées sur la réponse métabolique lors d'un stress aigu dans leur environnement naturel (Corbel et al. 2010 ; Viblanç et al. 2018 ; Stier et al. 2019), avec notamment une augmentation des taux de corticostérone, ainsi que des taux de glucose, des triglycérides et de l'acide urique dans le sang.

Mais que se passe-t-il lors de stress sur une durée prolongée? Lorsque les systèmes de réponse aux stress sont stimulés régulièrement, l'organisme ne peut plus réguler sa réponse au stress et entre alors dans un état de surcharge. On peut dire que les glucocorticoïdes passent de la gamme d'homéostasie réactive à la surcharge homéostatique/allostatique ; la concentration est au-dessus de la "normale" ou la concentration reste dans la plage d'homéostasie réactive pendant une période prolongée.

Cet état de stress chronique très étudié particulièrement chez l'Homme est associé à une augmentation du risque de survenue de pathologies liées au stress comme l'hypertension, le diabète, les maladies cardiaques, problèmes de reproduction et d'immunité (Sapolsky 2011).

Ces niveaux de glucocorticoïdes élevés ne sont donc pas seulement des déclencheurs de réponses adaptatives d'un individu face à des stressseurs mais pourraient aussi impacter sa survie et son fitness (Romero et al. 2009). Les liens entre fitness et glucocorticoïdes ne sont, à ce jour, pas totalement déchiffrés (Bonier et al. 2009).

Une des conséquences fortement supposées de cette surcharge allostatique en glucocorticoïdes lors de stress chronique est le **stress oxydant**.

Le stress oxydant est défini comme le déséquilibre entre la production d'**espèces réactives de l'oxygène ou du nitrate** (ROS/RNS) et la capacité des **défenses antioxydantes** et des **mécanismes de réparation** (Monaghan et al. 2009).

Le stress oxydant pourrait être une des explications majeures des conséquences délétères d'une exposition prolongée aux glucocorticoïdes menant à une baisse de fitness.

### **3. Le stress oxydant**

Les espèces réactives de l'oxygène et du nitrate (ROS/RNS) sont normalement produites dans les organismes vivants en condition aérobie et leur production ne constitue pas en soit un stress oxydant. Les ROS/RNS possèdent des électrons non appariés, leur donnant un **fort pouvoir oxydant** : ils soustraient alors des électrons à d'autres molécules les rendant à leur tour instables. A des niveaux physiologiques, les ROS permettent l'oxydation des éléments vieillissants tels que les protéines ou les lipides ce qui permet leur élimination. Les ROS servent également à stimuler l'activité mitochondriale et la quantité de mitochondries (biogenèse mitochondriale). Les espèces réactives de l'oxygène sont aussi utiles aux macrophages qui les utilisent pour détruire les pathogènes qu'ils ont ingérés.

Cependant, lorsque le système de protection est submergé par ces molécules instables et cytotoxiques, l'organisme est en situation de **stress oxydant**.

Des **mécanismes de protection** comme les antioxydants existent et permettent de prévenir, limiter et de réparer les dégâts oxydatifs occasionnés et d'éviter alors la situation de stress oxydant.

## 3.1. La production de pro-oxydants

### 3.1.1. Mitochondrie et respiration cellulaire

Le rôle principal de la mitochondrie est de **produire de l'énergie** sous forme d'ATP lors de la phosphorylation oxydative, du cycle de Krebs ou de la  $\beta$ -oxydation. La mitochondrie participe aussi à la régulation du cycle cellulaire, la signalisation, etc.

La mitochondrie possède des **récepteurs aux glucocorticoïdes** (Scheller *et al.* 2000), ce qui suggère un rôle dans la réponse au stress de l'organisme. Les glucocorticoïdes sont aussi connus pour moduler l'expression génique mitochondriale ce qui peut influencer les productions d'ATP et de ROS (Manoli *et al.* 2007 ; Picard *et al.* 2014).

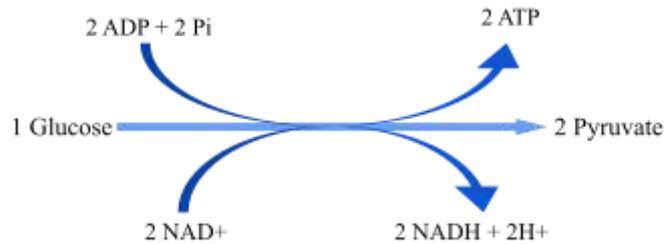
La respiration cellulaire est le mécanisme par lequel les cellules oxydent du glucose pour produire de l'énergie en condition aérobie selon l'équation suivante :



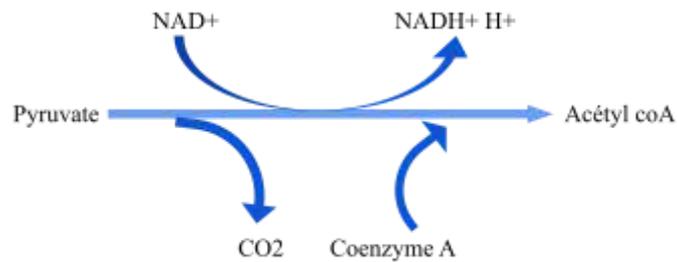
Le début de la respiration se déroule dans le cytoplasme puis continue dans la mitochondrie.

Succinctement, la respiration cellulaire se déroule en 4 grandes phases, le but final étant de produire de l'énergie sous forme d'ATP qui est utilisé au niveau cellulaire :

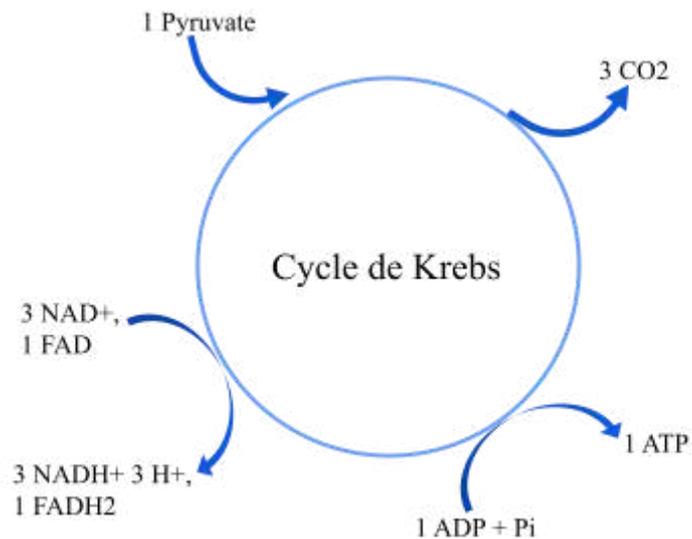
- 1) **Glycolyse** (cytoplasme) : oxydation partielle du glucose qui produit du pyruvate, de l'ATP et du NADH,H+.



- 2) **Oxydation du pyruvate** (mitochondrie) : conversion du pyruvate en acétyl-CoA.



- 3) **Cycle de Krebs** (matrice mitochondriale) : production de NADH à partir d'acétyl-CoA.



4) **Phosphorylation oxydative** (membrane interne mitochondriale) : synthèse de l'ATP via la chaîne de transport d'électrons.

Dans sa membrane interne, la mitochondrie possède une chaîne respiratoire. Cette chaîne respiratoire est en fait une association de complexes protéiques (couples redox) qui effectuent la phosphorylation oxydative par un transport d'électrons. Ce processus associe l'oxydation du NADH et du FADH<sub>2</sub> (formes réduites donneuses d'électrons présentes dans la matrice mitochondriale provenant de la glycolyse / cycle de Krebs /  $\beta$ -oxydation) à la production d'ATP grâce à la formation d'un gradient de protons (Fig. 20).

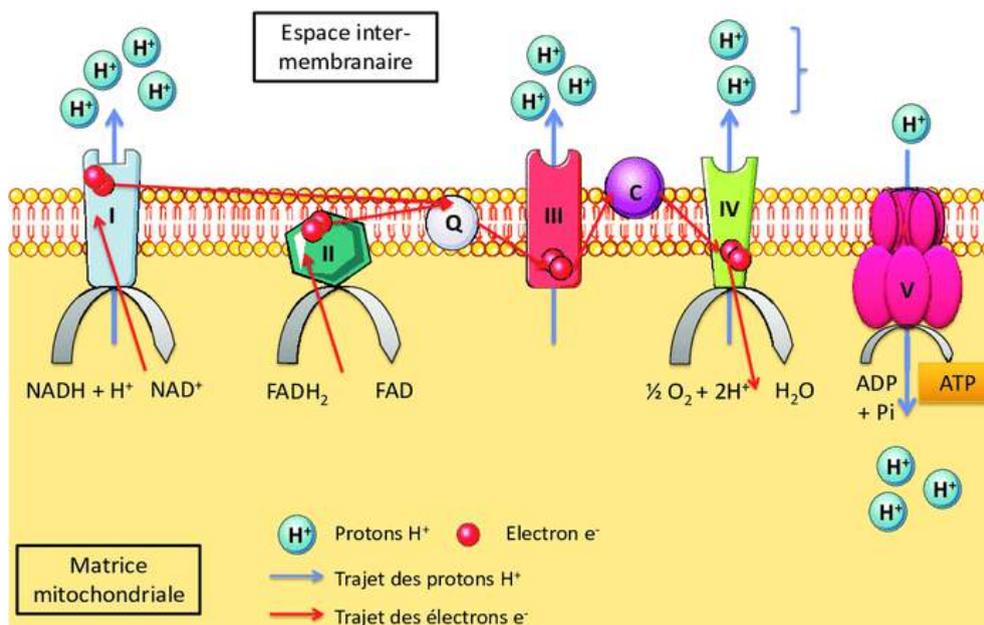


Fig. 22 : Schéma représentant la chaîne respiratoire mitochondriale (Bonier et al. 2009)

Au niveau du complexe I, le NADH + H est réduit en NAD + , libérant ainsi 2 électrons. La réduction du FADH<sub>2</sub> en FAD par le complexe II fournit également 2 électrons. Ceux-ci sont transférés au coenzyme Q (Q) puis vers le complexe III. Celui-ci les transfère au cytochrome c (C) puis au complexe IV. Au niveau du complexe IV, la réaction d'oxydation de l'O<sub>2</sub> et des H + se réalise, produisant ainsi une molécule d'H<sub>2</sub>O. Ceci représente la partie d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire. En parallèle du trajet des électrons (flèches rouges), les protons sont transférés (flèches bleues) de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire, via les complexes I, II et IV. Ceux-ci s'accumulent en créant la force proto-motrice, nécessaire au fonctionnement du complexe V. Les protons sont transférés par le complexe V de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale, induisant ainsi la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi.

Ainsi, les molécules d'oxygène (oxydant fort) qui sont l'accepteur final des électrons, vont les récupérer et s'associer à des protons afin de former des molécules d'eau, passant ainsi d'un état oxydé à un état réduit. Au final, on obtient pour une molécule de glucose, 36 ou 38 molécules d'ATP. Cependant certains électrons échappent à la chaîne respiratoire et deviennent des ROS/RNS.

### 3.1.2. La production d'espèces réactives de l'oxygène ou du nitrate

L'oxygène utilisé lors du métabolisme énergétique peut mener à la production de **dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)**, composés chimiques oxydants au niveau des complexes I (NADH déshydrogénase) et III (cytochrome bc1). Les ROS sont des éléments chimiques très réactifs du fait de la présence d'**électrons de valence non appariés** ; les plus connus sont les radicaux libres mais les peroxydes et les ions oxygénés font eux aussi partie des ROS.

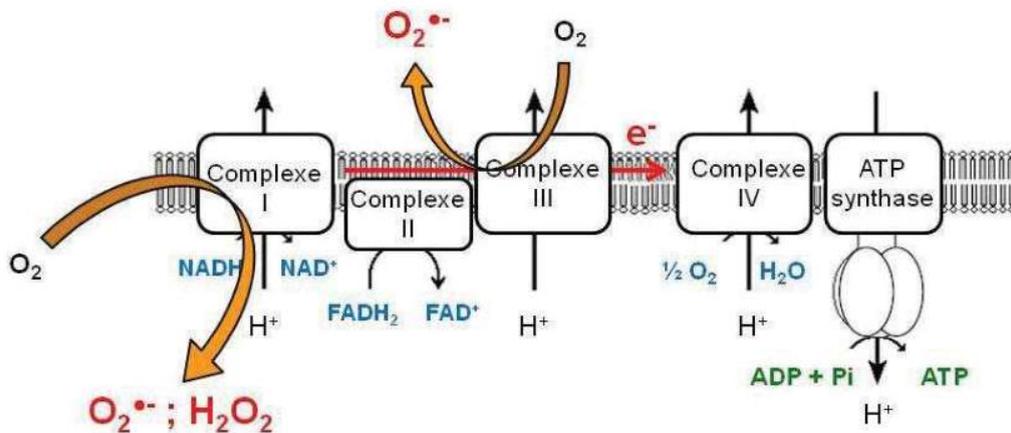
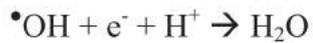
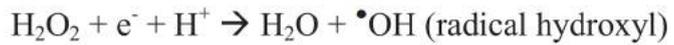
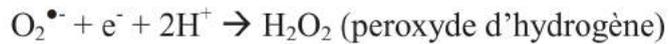
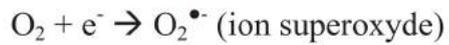


Fig. 23 : Origine de la production des espèces réactives de l'oxygène au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Déglétagne 2012). Les complexes 1 et 3 sont impliqués dans la production des espèces réactives de l'oxygène, l'oxygène, présent dans le milieu, peut capter des électrons présents dans la chaîne respiratoire et former des espèces réactives de l'oxygène .

Lorsque des électrons **échappent à la chaîne respiratoire**, ils sont captés par l'oxygène, en s'associant ils forment les **ROS**. Les ROS sont donc des intermédiaires de la réduction de l'oxygène en eau par la chaîne respiratoire mitochondriale :



Ce dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale peut aussi amener à la production d'**espèces dérivées de l'azote**, les RNS (reactive nitrogen species) comme le monoxyde d'azote (NO) et le peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>). Ils ne sont pas considérés comme des ROS à part entière mais leurs propriétés mènent au même résultat : une oxydation. Les ROS et les RNS ont une origine commune (Hermes-Lima et Zenteno-Savín 2002).

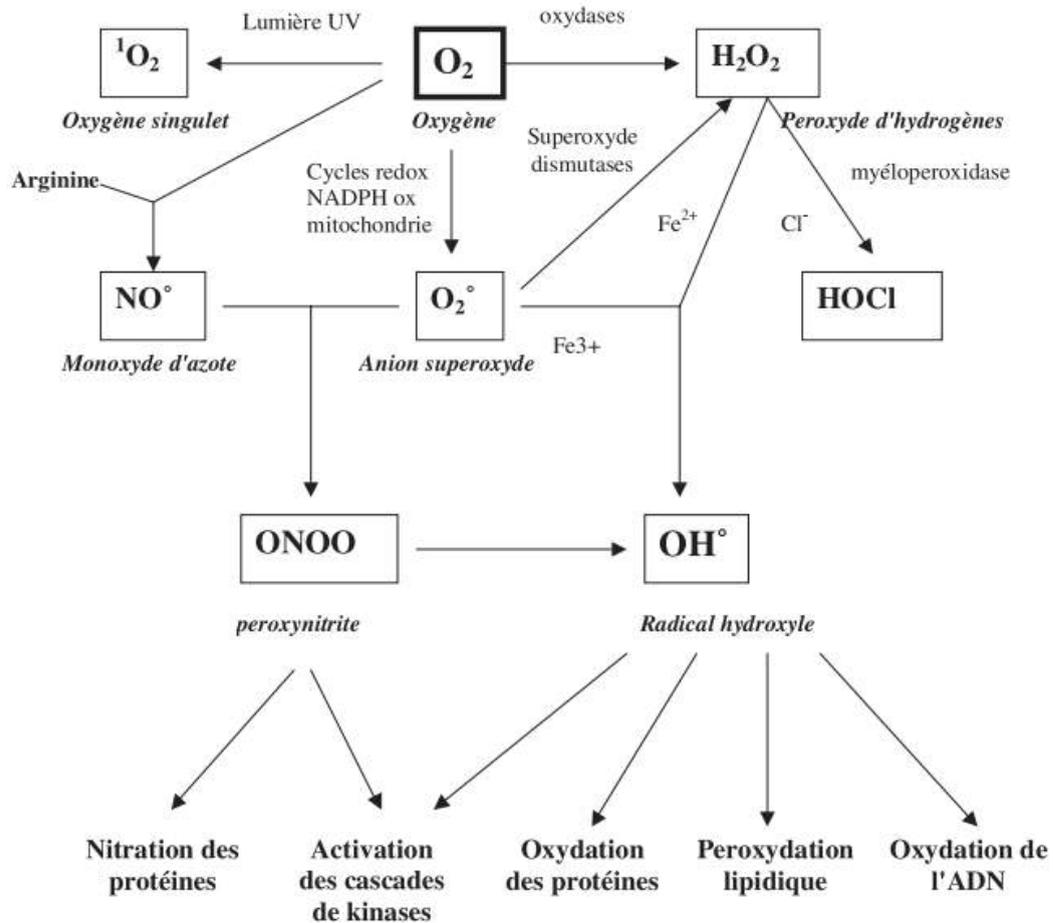


Fig. 24 : Origine des espèces réactives de l'oxygène et des espèces réactives de l'azote (Favier 2003).

La **mitochondrie** est le producteur majoritaire des ROS mais d'autres réactions de l'organisme peuvent aussi produire des ROS ; les leucocytes ("oxidative burst"), peroxysomes (dégradation des acides gras) et le système du cytochrome P450. In vivo, la production de ROS est très réduite, autour de 0,15% des électrons transférés dans la chaîne respiratoire se combinent à l'oxygène pour former des ROS (St-Pierre *et al.* 2002).

## 3.2. La contre attaque de l'organisme : système antioxydant et système de protection

Afin de se prémunir et de se défendre des attaques des ROS, les organismes possèdent des moyens de lutte. Il existe des mécanismes de protection comme les **défenses anti-oxydantes**. Ainsi, des taux élevés de ROS ne veulent pas forcément dire que les dommages seront importants (Monaghan *et al.* 2009).

L'organisme peut se défendre en ayant une membrane cellulaire adaptée ou des moyens "chimiques" de capture des électrons non appariés avec les antioxydants endogènes et exogènes, ou bien encore des mécanismes de découplage. Si les dégâts sont actés, des mécanismes de réparations ou d'élimination entrent en jeu.

### 3.2.1. Une membrane adaptée

La **composition membranaire** des cellules a son rôle à jouer dans la régulation de la production des ROS. Effectivement, les lipides insaturés sont plus susceptibles d'être peroxydés et la présence de lipides mono insaturés permet une plus grande imperméabilité de la membrane. De ce fait, d'après la « membrane pacemaker theory », un **faible degré d'insaturation membranaire** entraîne une résistance à la peroxydation et une imperméabilité qui expliquerait la longévité des oiseaux par rapport aux mammifères de même masse par une limitation de l'action des ROS (Hulbert *et al.* 2007 ; Hulbert 2008 ; Gavazza *et al.* 2008).

### **3.2.2. Les antioxydants : détoxification des radicaux libres**

Un des moyens de l'organisme pour réagir et empêcher le stress oxydant est de mobiliser les **antioxydants**. Par définition, les antioxydants sont des molécules qui **ralentissent ou empêchent l'oxydation** d'autres composés. Ils agissent selon les mécanismes d'oxydoréduction en se réduisant lors de la capture des électrons non appariés des radicaux libres que sont les ROS.

Il en existe plusieurs catégories : les antioxydants endogènes qui peuvent être enzymatiques ou non et les antioxydants exogènes, qui sont apportés par la nourriture.

Ici seront particulièrement détaillés les antioxydants que nous mesurerons dans l'étude, à savoir, la glutathione peroxydase, la superoxyde dismutase et le glutathion.

#### **3.2.2.1. Les antioxydants endogènes**

Les antioxydants endogènes, produits par l'organisme, se séparent en deux parties : les antioxydants endogènes enzymatiques et les antioxydants endogènes non enzymatiques.

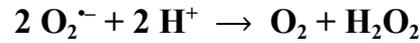
- **La superoxyde dismutase**

La chaîne de transport des électrons (CTE) de la mitochondrie produit des radicaux superoxydes ce qui peut impacter directement l'ADN mitochondrial et de ce fait, conduire à encore plus de superoxydes produit par la CTE. Il est donc capital de limiter les superoxydes. La superoxyde dismutase (SOD) agit ainsi comme le premier antioxydant enzymatique, directement dans la mitochondrie.

La superoxyde dismutase (SOD) est une métallo enzyme découverte en 1969 par Fridovich (Fridovich et McCord 1969). Elle possède des cofacteurs métalliques contenus dans son site actif : cuivre, zinc, manganèse, nickel ou fer.

Elle catalyse la dismutation de l'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , un composé moins réactif :

### SOD



La SOD existe sous 2 formes chez les oiseaux : SOD1 est retrouvée dans le cytoplasme, le noyau et dans la lumière entre les membranes externes et internes des mitochondries ; SOD2 se trouve dans la matrice des mitochondries.

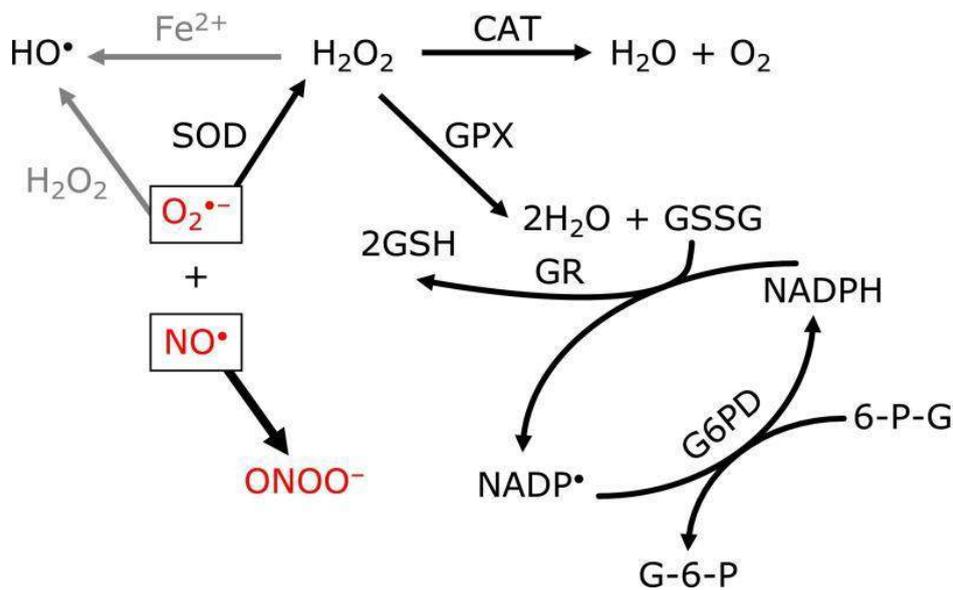


Fig. 25: Enzymes antioxydantes intracellulaires et leurs chaînes de réactions (Indo et al. 2014).

L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) est majoritairement produit par la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. Il réagit avec l'oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$ ) et forme le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ). La SOD catalyse la transformation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et dioxygène évitant ainsi la formation du puissant peroxynitrite.

La catalase et la glutathione peroxydase (GPx) réduisent  $H_2O_2$  en eau et dioxygène. La GPx peut aussi réduire les hydroperoxydes lipidiques. Le glutathion réduit (GSH) est alors converti en glutathion oxydé (GSSG). Le GSSG peut ensuite être réduit par le glutathion réductase (GR) en utilisant la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) comme un donneur d'électron. Le NADPH est fourni par l'activation de la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) dans la voie des pentoses phosphate.

Bien qu'il ait été prouvé que son rôle soit limité du fait d'une faible activité et d'une réactivité médiocre (Sawyer et Valentine 1981), Majima *et al.* (1998) montrent que la SOD protège l'ADN de la mitochondrie en éliminant l'anion superoxyde qui ne peut donc pas réagir avec l'oxyde nitrique pour former le peroxyde nitrite, oxydant très puissant (Fig. 25). Le peroxyde nitrite produit des radicaux hydroxyles et du dioxyde de nitrogène ce qui oxyde l'ADN, les lipides et les protéines menant à une apoptose cellulaire (Indo *et al.* 2015).

- **Glutathion et glutathione peroxydase**

Le glutathion est un peptide découvert en 1888 par De Rey-Paihadé. Il existe sous la forme GSH (monomère réduit) et sous la forme disulfure oxydée, GSSG. Ce couple d'oxydoréduction permet un maintien du potentiel redox et donc d'échange d'électrons.

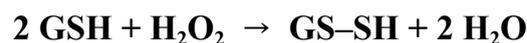
Sous sa forme réduite, le glutathion est considéré comme l'antioxydant majeur dans le compartiment intracellulaire où il est présent en grande quantité (1-10 mM chez les mammifères).

Découverte en 1957 par Mills (Mills 1957), la glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme présente dans les liquides extracellulaires, dans le cytosol et dans les mitochondries. Elle possède un cofacteur sélénium. Elle catalyse la réaction de réduction des hydroperoxydes -ROOH en -ROH notamment le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'ion peroxyde nitrite et les peroxydes lipidiques, par l'oxydation de GSH en sa forme oxydée GSSH.

**GPx**



**GPx**



Ainsi la glutathion peroxydase permet de compléter le cycle antioxydant amorcé par la SOD (Fig. 25) et de transformer le peroxyde d'hydrogène produit par de l'eau.

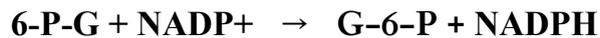
Une autre enzyme, la glutathion réductase permet ensuite de réduire le glutathion oxydé :

### **GR**



La réaction est possible grâce au donneur d'électron NADPH qui est produit par la glucose-6-phosphate déshydrogénase qui agit dans la voie des pentoses phosphates.

### **G6PD**



En expérimentation, on mesure le ratio entre la forme oxydée GSSH et la forme réduite GSH comme un indicateur du stress oxydatif d'un organisme. En médecine humaine, ce ratio est utilisé dans la détection de cancer ou de maladies dégénératives liées à l'âge (Traverso *et al.* 2013 ; Gu *et al.* 2015).

D'autres antioxydants endogènes agissent dans nos cellules mais ne seront pas dosés dans cette étude. Il s'agit de :

- La **catalase** (hème ferrique) qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau. Cependant, cette enzyme possède une faible affinité pour son substrat, elle n'est efficace que pour de fortes concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- La **glutathion-S-transférase** (GST), qui utilise le GSH.
- Les **peroxyredoxines** ou **thiorédoxines** qui dégradent l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le peroxyde d'hydrogène et de nombreux hydroperoxydes.

### 3.2.2.2. Les antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes sont apportés par l'alimentation.

Certaines vitamines, le  **$\beta$ -carotène** (provitamines A), la vitamine **E** (alpha-tocophérol), la vitamine **C** (acide ascorbique) ont des propriétés antioxydantes (Finkel et Holbrook 2000).

Les **polyphénols** sont des métabolites secondaires produits par les végétaux avec des pouvoirs antioxydants (flavonoïdes, tanins, anthocyanes, acides phénoliques).

Les **caroténoïdes** sont des pigments liposolubles synthétisés dans les algues, les végétaux, les champignons, les bactéries possédant des propriétés antioxydantes.

Certains oligo-éléments apportés par l'alimentation sont considérés comme antioxydants : le sélénium, le zinc et le cuivre. Le sélénium intervient dans la composition des sélénoprotéines (dont la glutathion peroxydase) qui ont une action antioxydante. Le cuivre et le zinc sont des cofacteurs de la SOD. Le zinc protège les groupements thiol des protéines et limite la formation d'espèces réactives de l'oxygène.

Nous ne nous intéresserons pas aux antioxydants exogènes dans la suite de cette thèse.

### 3.2.3. Moins produire d'espèces réactives de l'oxygène : le découplage

Une autre façon de produire moins de ROS est le mécanisme de **découplage** de la consommation d'oxygène et la production d'ATP. Cela entraîne une perturbation de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries, en dissociant les réactions de la synthèse de l'ATP de la chaîne de transport des électrons.

En fait, une partie des protons accumulés dans l'espace intermembranaire rejoint la matrice mitochondriale sans participer à la synthèse d'ATP, ce qui permet de **réduire le gradient membranaire de protons** grâce à des protéines découplantes (Abe *et al.* 2006 ; Brand *et al.* 2004). Ce mécanisme est permis par une diffusion membranaire passive des protons, mais aussi par les protéines découplantes qui sont des transporteurs mitochondriaux comme UCP (uncoupling protein) ou ANT (Adénosine Nucleotide Translocase).

Par cela, cette réduction du potentiel transmembranaire limite la fuite des électrons qui pourraient être amenés à générer des ROS. La contrepartie de ce mécanisme est une baisse de la capacité de synthèse en ATP.

### 3.2.4. Une fois les dégâts causés : réparation ou élimination

Enfin des **mécanismes de retrait, réparation ou élimination** de la zone impactée (ADN, lipides, protéines) existent.

Les lipides peroxydés sont pris en charge par des enzymes antioxydantes (GPX, GST, thioredoxine) pour être réduits puis réparés ou éliminés (Hulbert *et al.* 2007).

Pour l'ADN, il existe différents mécanismes : la réparation par excision de base ou de nucléotides, la réparation des mésappariements et la réparation des cassures de brins.

Les protéines endommagées peuvent aussi être réparées ou dégradées notamment par le protéasome (Dröge 2002).

### **3.3. Des conséquences de la molécule à l'individu**

#### **3.3.1. Dégâts oxydants : lipides, ADN et protéines**

À fortes concentrations les ROS entraînent des oxydations délétères notamment sur l'ADN, les protéines ou les lipides. C'est ce qu'on appelle les **dégâts oxydants**.

Les ROS s'attaquent préférentiellement aux **lipides** en induisant une peroxydation, aux **acides nucléiques** en les oxydant, ce qui entraîne des cassures, modifications chimiques des bases, pontages/adduits ADN-Protéines... ainsi qu'aux protéines via la carbonylation des **protéines** ce qui les modifie et entraîne une perte d'activité biologique et/ou une fragmentation (Favier 2003 ; Dröge 2002).

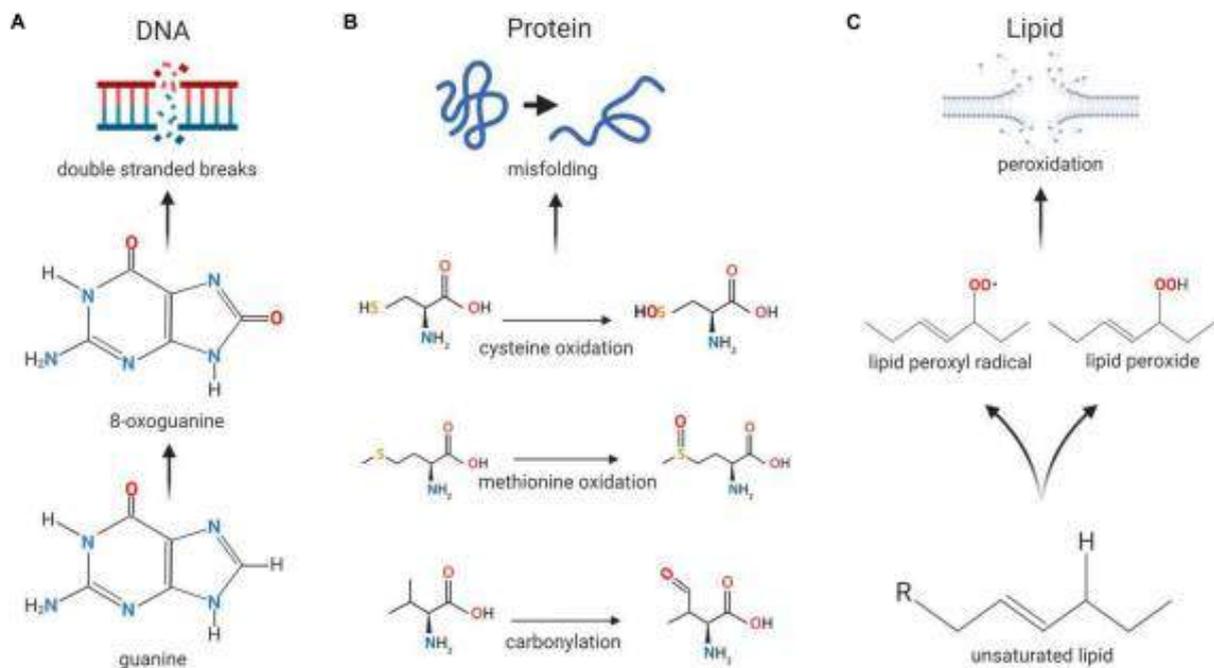


Fig. 26 : Dommages moléculaires causés par les ROS (Shields *et al.* 2021).

- A) Pour l'ADN, les dommages peuvent être des cassures suite à la transformation de la guanine en 8-oxoguanine induite par les ROS. La 8-oxoguanine peut ensuite mal s'associer avec l'adénine créant des mutations transverses et des ruptures après la réplication.
- B) Les protéines peuvent être mal repliées lorsqu'elles sont exposées aux ROS en raison de l'oxydation des acides aminés cystéine et méthionine, ainsi que de la carbonylation du squelette du peptide, entraînant des changements aux interactions moléculaires qui se produisent normalement dans le peptide.
- C) L'exposition aux ROS peut induire des dommages de la membrane lorsqu'il y a de la peroxydation des lipides.

Une des lésions les plus communes de l'ADN est l'apparition d'une base 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) remplaçant l'adénine. Le 8-hydroxydésoxyguanosine (8-OHdG) est un désoxyribonucléotide résultant de l'oxydation de la désoxyguanosine, c'est à dire que cela correspond au produit de réparation de l'ADN (guanine) oxydée par les ROS.

C'est donc un **biomarqueur du stress oxydatif** (Cooke *et al.* 2001) fréquemment utilisé notamment en médecine humaine dans l'urine. En médecine, ce dosage permet d'évaluer des risques de cancers, diabète, maladies cardiaques etc (Wu *et al.* 2004).

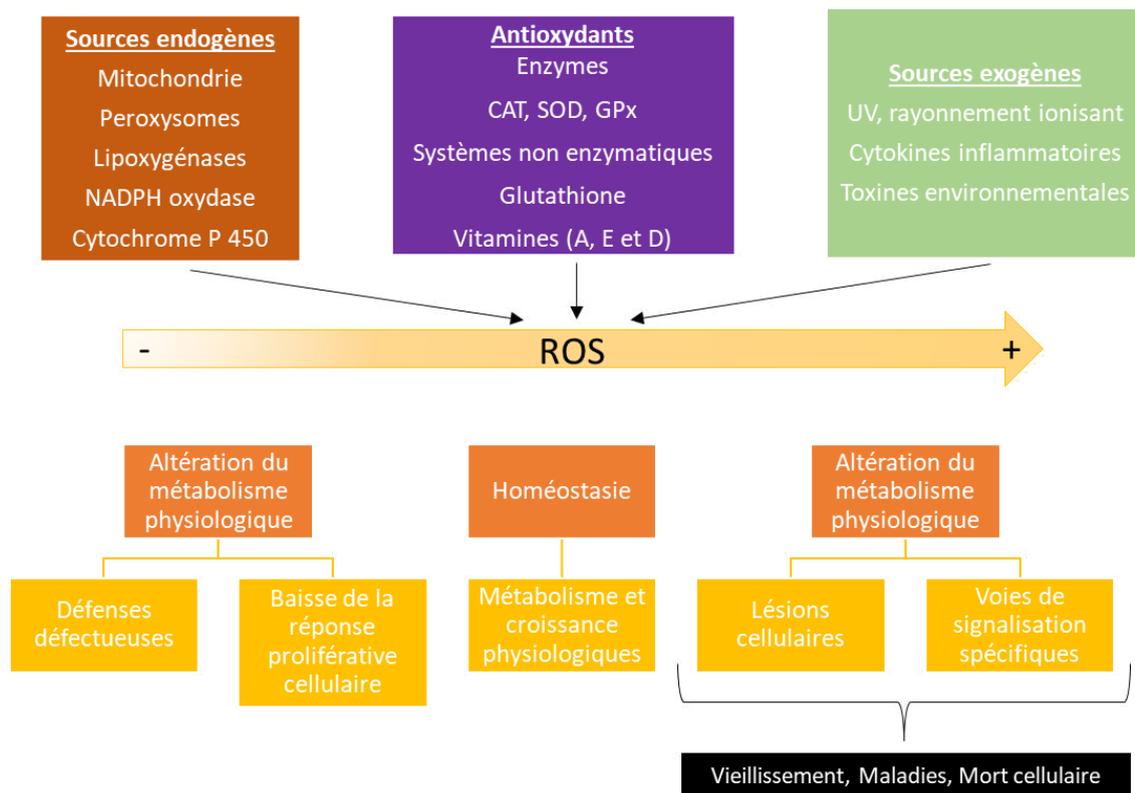


Fig. 27 : Schéma récapitulatif représentant la balance du stress oxydant (adapté de Finkel et Holbrook 2000) : les sources endogènes ou exogènes de ROS font varier leur quantité dans l'organisme ; les ROS sont contrôlés par les antioxydants. Idéalement, la balance s'équilibre et l'organisme est à l'homéostasie. Cependant lorsque les ROS excèdent la capacité antioxydante, l'organisme est en état de stress oxydatif pouvant mener à la mort cellulaire, à une augmentation du risque de déclencher certaines pathologies, à un vieillissement prématuré.

Ainsi l'accumulation de ROS et de dégâts moléculaires finit par avoir des effets cytotoxiques menant à des altérations du métabolisme pouvant entraîner des maladies et un vieillissement prématuré de l'organisme.

Les **télomères**, petites entités non codantes d'ADN se trouvant à l'extrémité des chromosomes, sont aussi très vulnérables aux ROS ainsi que l'ADN mitochondrial. Cela est sûrement dû au fait qu'ils se trouvent proches des zones où ils sont produits et où il y a un faible niveau de réparation (Finkel et Holbrook 2000).

## 3.3.2. Espèces réactives de l'oxygène et longévité

### 3.3.2.1. La théorie radicalaire du vieillissement

La **théorie radicalaire du vieillissement** (Free radical theory of aging, Free radical damage theory, Oxidative stress theory) a été proposée par Harman durant son doctorat (Harman 1956). La production de radicaux libres est connue pour induire un vieillissement et des mutations. Et parce qu'il y a production de radicaux libres normalement dans les cellules, la théorie est que les radicaux libres naturels induiraient des dégâts oxydants qui en s'accumulant pourrait générer le vieillissement. Il a été prouvé que le niveau de radicaux libres augmente lorsque l'activité métabolique augmente (Michaelis 1951). Harman prédit que lorsque le métabolisme est plus élevé, il y a plus d'oxydants et les animaux vivent moins longtemps.

Cependant, il semblerait que les oiseaux et les primates ne suivent que partiellement la théorie de Harman, et vivent plus longtemps que leur métabolisme basal le suggérerait. Par exemple, une activité sportive associée à un métabolisme augmenté n'est pas associée à une réduction de la durée de vie ; la restriction calorique augmente la longévité mais le taux métabolique n'est pas nécessairement diminué (Hulbert 2008).

Une étude montre que les espèces à longévité courte produisent plus de ROS que les espèces à longévité longue chez des mammifères (Ku, Brunk et Sohal 1993). Ce qui permet aussi d'avancer que les taux de ROS, plus que les taux d'antioxydants, sont un indicateur pour la longévité (Sohal R, Sohal B et Brunk 1990).

Depuis, nombre d'études ont eu lieu permettant de montrer que les niveaux de ROS augmentent avec l'âge (Sawada et Carlson 1987 ; Sohal 1991) ainsi que les dommages oxydatifs (Oliver *et al.* 1987 ; Hamilton *et al.* 2001 ; Capel *et al.* 2005). Des hauts niveaux de ROS sont également retrouvés lors de maladies liées à l'âge (Berliner et Heinecke 1996 ; Chung *et al.* 2006). Il est aussi prouvé qu'il y a une augmentation progressive du dysfonctionnement mitochondrial avec l'âge (Trounce 1989 ; Genova *et al.* 2004).

Cependant, il y a aussi nombre d'expérimentations qui posent de nouvelles hypothèses sur des aspects positifs de l'action des ROS (Dröge 2002 ; review de Shields 2021).

Le ROS peuvent aussi impacter les télomères, la portion distale des chromosomes et accélérer le vieillissement.

### 3.3.2.2. Les télomères, une portion du chromosome sensible aux espèces réactives de l'oxygène

Lors de la réplication, lorsque l'ADN est copié, le **brin précoce** est fabriqué en continu. L'autre brin, le **brin tardif** est produit en plusieurs fragments, appelés fragments d'Okazaki qui débutent chacun par leur propre amorce d'ARN.

Ensuite, toujours sur le brin tardif, les amorces des fragments d'Okazaki sont remplacées par de l'ADN et les fragments sont connectés pour former un brin continu. Cependant, lorsque la fourche de réplication atteint l'extrémité du chromosome, une courte portion d'ADN n'est pas couverte par un fragment d'Okazaki. En fait, il n'est pas possible de construire un fragment, car l'amorce se retrouverait dans le vide. De ce fait, la totalité de l'ADN n'est pas copiée à chaque réplication, ce qui expose les extrémités de l'ADN et entraîne, au cours de nombreuses divisions cellulaires, un raccourcissement du chromosome. Cette particularité est nommée le **problème de réplication des fins** (end-replication problem).

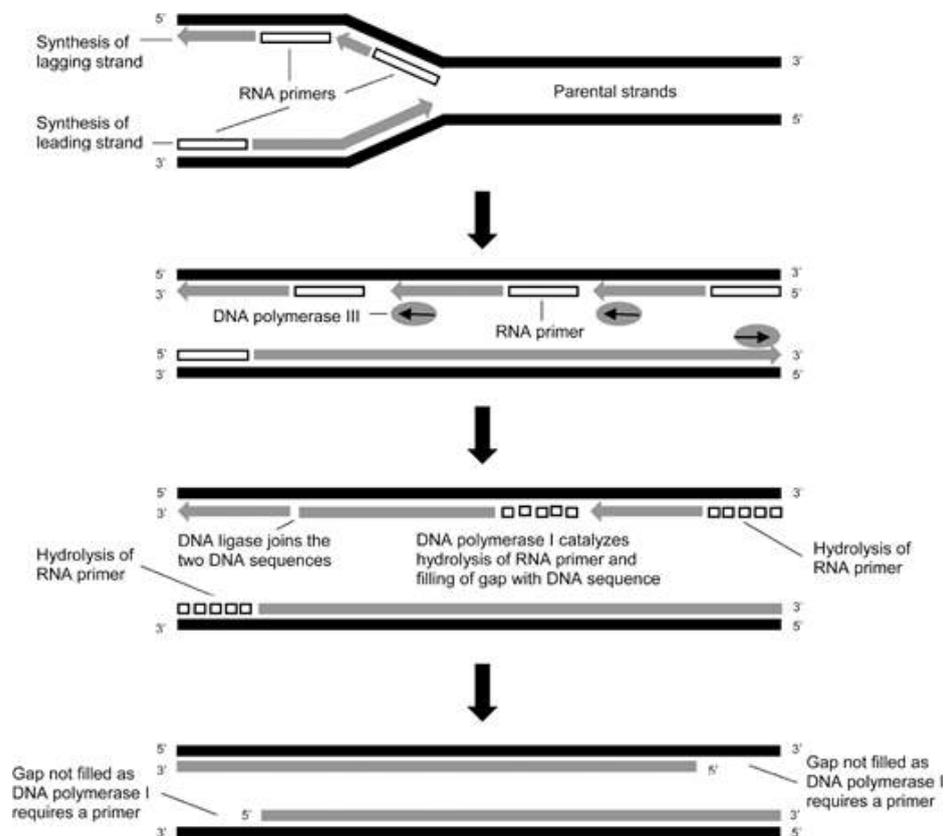


Fig. 28 : Schéma représentant le “end-replication problem” : une courte portion de l'ADN n'est pas répliqué car non couverte par un fragment d'Okazaki, elle est donc perdue. Au fur et à mesure des divisions cellulaires, le chromosome devient donc plus court et le génome exposé (Hoh 2017).

Cependant une enzyme découverte en 1985 (Blackburn, Greider et Szostak 1985), la **téломérase**, permet de pallier ce problème en construisant une extrémité de l'ADN non codante et répétitive : le **téломère**. Le téломère contient de plusieurs centaines à plusieurs milliers (n) de répétitions de la séquence : (TTAGGG)<sub>n</sub>. Ceci permet de conserver l'ADN codant et donc l'intégrité du génome en érodant une partie non codante lors de la réplication.

En 1965, Leonard Hayflick découvre que les cellules somatiques et différenciées ne se multiplient qu'un certain nombre de fois avant de mourir : cela se nomme la **limite de Hayflick**. En 1971, Alekseï Olovnikov émet l'hypothèse que la limite de Hayflick est corrélée à la **perte progressive de séquences téломériques**.

In fine, lors de chaque division cellulaire, les téломères s'érodent progressivement jusqu'à atteindre une taille critique à partir d'un certain nombre de division cellulaire qui déclenche ensuite l'entrée en **sénescence de la cellule**. Ainsi, la plupart des cellules somatiques composant un être vivant vont voir leurs téломères s'éroder lors des multiplications jusqu'à la sénescence de la cellule. Il y a, au final, une **corrélation entre le vieillissement d'un individu et la réduction de la taille de ses téломères** (Blasco 2007). Cependant d'autres facteurs entrent en ligne de compte et des individus du même âge n'ont pas les mêmes longueurs téломériques.

Les téломères sont des structures fragiles au stress, notamment au **stress oxydant**. (Costantini *et al.* 2011). Le stress oxydant induit des ruptures d'ADN lors de la réplication, ce qui entraîne un blocage transitoire de la réplication mais aussi un raccourcissement des téломères (von Zglinicki 2002). Ces réductions de la longueur des téломères peuvent **accélérer la sénescence cellulaire** (Richter et von Zglinicki 2007).

Les expériences de l'individu et le stress tout au long de la vie impactent les téломères, en accélérant leur vitesse d'érosion (Epel *et al.* 2004 ; Kotrschal *et al.* 2007). Par exemple, le téломère est impacté lors de l'exposition à de forts taux de glucocorticoïdes (Hausmann *et al.* 2010) mais il est aussi très vulnérable aux ROS (Hausmann et Marchetto 2010). On peut donc utiliser le taux de perte des téломères comme **biomarqueur du stress oxydant chronique** (Houben *et al.* 2008).

### 3.3.2.3. Mitochondrie et vieillissement

Les mitochondries sont des organites cellulaires impliqués dans nombre de fonctions comme la production d'énergie, la régulation métabolique, l'apoptose, l'homéostasie du calcium... ainsi que la **production de radicaux libres**. Les mitochondries ont la particularité de posséder leur propre ADN. Ce même ADN peut être, comme l'ADN du noyau, atteint par les ROS lorsqu'il y a un **stress oxydant** et mener à la baisse de la quantité de mitochondries.

Les mitochondries sont aussi des organites ayant des récepteurs aux glucocorticoïdes (Psarra et Sekeris 2008) et pourraient être un lien central entre le système endocrinien et le métabolisme (Picard *et al.* 2014).

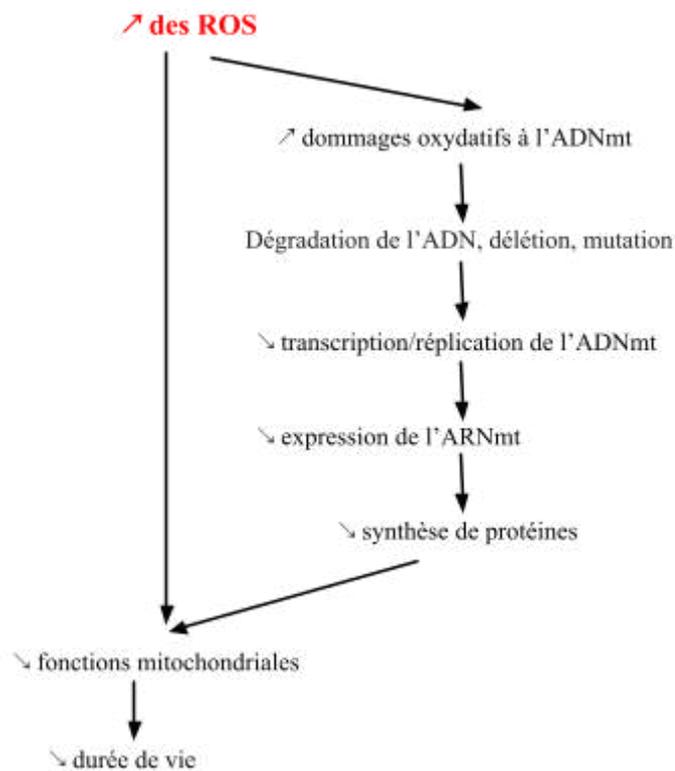


Fig. 29 : La théorie radicalaire du vieillissement appliquée aux mitochondries. (Adapté de Vendelbo et Nair 2011).

ROS: reactive oxygen species, espèces réactives de l'oxygène

ADNmt: ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est présent en milliers de copies par cellule et en quantité spécifique selon les tissus (Robin et Wong 1988). Le nombre de copies d'ADNmt varie également avec l'âge et lors de maladies liées à l'âge. Cet ADNmt est considéré comme un biomarqueur qui reflète les altérations de l'organisme comme par exemple le cancer (Afrifa *et al.* 2019), les maladies cardiovasculaires (Yue *et al.* 2018) ou la dégénérescence du système nerveux (Rice *et al.* 2014).

De plus, des niveaux élevés de corticostérone peuvent marquer un déséquilibre énergétique et donc favoriser la mobilisation énergétique en premier lieu puis l'économie des réserves dans un second temps. Ces économies d'énergie pourraient aboutir à une réduction de la densité mitochondriale.

Ici nous utiliserons la mesure de l'ADNmt comme mesure de la **densité mitochondriale** afin d'explorer les effets de la surcharge allostatique en glucocorticoïdes sur la densité mitochondriale et possiblement les liens entre stress oxydant, métabolisme énergétique et densité mitochondriale. Il est montré que les mesures de densité mitochondriale sont exécutables sur un prélèvement sanguin car les globules rouges des oiseaux possèdent des mitochondries fonctionnelles (Stier *et al.* 2013 ; Stier *et al.* 2015). Ces mesures sont aussi répétables mais surtout qu'elles possèdent une plasticité qui permet d'observer les variations entre les stades biologiques (Stier *et al.* 2019 b).

### 3.4. Application chez le Manchot

Les oiseaux présentent une **longévité supérieure** à celle des mammifères de même masse bien que leur métabolisme soit généralement élevé. Or un métabolisme plus élevé pourrait conduire à plus de ROS ce qui devrait engendrer une sénescence plus rapide, or ce n'est pas le cas (Costantini 2008).

Lors d'un stress, les catécholamines et les glucocorticoïdes vont participer à une augmentation du métabolisme par la **mobilisation des substrats énergétiques** avec la glycolyse, la glycogénolyse, la lipolyse, la protéolyse et la néoglucogenèse (Pilkis et Granner 1992 ; Hasselgren 1999 ; Campbell *et al.* 2011 ; Peckett *et al.* 2011).

Chez le Manchot royal, cette augmentation de métabolisme peut se traduire par un augmentation des **métabolites énergétiques** (glucose, triglycérides, acide urique, lactate) (Corbel *et al.* 2010 ; Viblanc *et al.* 2018 ; Stier *et al.* 2019).

Une des premières hypothèses pour expliquer la résistance à la sénescence malgré un métabolisme élevé a donc été que les **défenses antioxydantes** étaient augmentées (Barja 1998). Cependant il a été montré qu'il y a une corrélation négative entre la quantité d'antioxydants et la longévité ; et que les taux d'antioxydants sont plus faibles chez les oiseaux que chez les mammifères (Barja 1998 ; Pamplona et Costantini 2011).

Une seconde possibilité est que les oiseaux ont un faible taux d'insaturation membranaire comme supposé par Barja et Hulbert (Barja 1998 ; Hulbert *et al.* 2007), rendant la membrane moins perméable et donc moins touchée par la peroxydation.

Cependant, les mécanismes expliquant la remarquable longévité des oiseaux ne sont pas encore totalement élucidés.

Comme nous avons pu le voir, les glucocorticoïdes occupent une place majeure dans la réponse au stress des organismes et régissent en partie leur capacité à faire face aux stressseurs et à s'y adapter. Toutefois, les mécanismes du stress peuvent aussi avoir des effets délétères sur l'organisme et mener à la production de ROS, voire de stress oxydant.

Des études ont montré qu'un **stress aigu** peut élever la production de ROS (Nadeem *et al.* 2006 ; Huber *et al.* 2017), majorer les dommages aux lipides et à l'ADN (Treidel *et al.* 2013 ; Costantini *et al.* 2011) ainsi qu'avoir des effets variables sur les antioxydants (Nadeem *et al.* 2006 ; Costantini *et al.* 2012 ; Treidel *et al.* 2013 ; Huber *et al.* 2017 ; Stier *et al.* 2019). Lors d'un **stress chronique**, les individus subissent une exposition prolongée à de forts taux de glucocorticoïdes. Cette surcharge allostatique en glucocorticoïdes pourrait générer du **stress oxydant** (Costantini *et al.* 2011 ; Hau *et al.* 2015 ; Marasco *et al.* 2017). D'ailleurs, plusieurs études montrent un lien direct entre exposition chronique aux glucocorticoïdes et stress oxydant (Slos et Stoks 2008 ; Zafir et Banu 2008 ; Travers *et al.* 2010 ; Costantini *et al.* 2011).

Il existe quelques études ayant tenté de mettre en évidence une résistance au stress oxydant chez les **Sphéniscidés** ; cependant, les études restent limitées à une vision réduite de la capacité antioxydante d'un organisme avec, comme mesures, l'OXY test (capacité antioxydante totale) ou le TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity : capacité totale de piégeage des radicaux oxydés) chez l'Empereur ou l'Adélie (Corsolini *et al.* 2001 ; Beaulieu *et al.* 2010).

Dans l'étude de Corsolini *et al.* (2001), il est tout de même montré que les manchots ont une capacité de capture des radicaux peroxydes supérieurs à d'autres oiseaux marins leur donnant ainsi une certaine résistance face aux oxydants.

D'autres études ont quant à elles étudié certains tissus : foie et cœur chez l'Adélie (Gavazza *et al.* 2008) ; muscle squelettique et foie chez l'Empereur (Zenteno-Savin *et al.* 2010) et ont pu montrer que les manchots avaient respectivement des acides gras avec un faible degré d'insaturation, donc peu sensible à la peroxydation des lipides, et des taux de catalase, glutathion peroxydase et glutathion-S-transferase plus haut que les autres oiseaux.

Il est aussi supposé que ces capacités antioxydantes sont le reflet d'une pression basale de pro oxydant qui pourrait être par exemple, l'hypoxie de plongée, le jeûne, la prédation etc. (Shick et Dykens 1985). Ce qui pourrait être totalement cohérent chez les manchots avec un système antioxydant performant qui serait le témoin d'une adaptation physiologique à son environnement générateur de pro oxydants.

Concernant le **Manchot royal**, dans l'étude de Stier *et al.* (2019), 24 individus en incubation vivant sur l'île de la Possession (Crozet), ont été étudiés afin d'investiguer les variations des marqueurs du stress oxydant et de marqueurs mitochondriaux ainsi que leurs relations avec les niveaux de base en corticostérone (**BASE CORT**: niveau de base en corticostérone ; potentiellement équivalent à un stress chronique au vu des conditions du milieu) et lors d'une contention créant un stress aigu (**STRESS CORT**: niveau de corticostérone lors d'un stress aigu provoqué par contention).

L'étude montre que les taux de STRESS CORT étaient **12.7 fois plus élevés** que les taux de BASE CORT ; les antioxydants endogènes (GSSG, tGSH, GPx, SOD) montrent une augmentation de leurs taux lors du stress aigu et en relation avec une BASE CORT élevée, tandis que les niveaux de marqueurs liés aux ROS sont majoritairement réduits ou sans variations (ROMs plasmatique, OXY plasmatique sur GR, 8-OHdG sur GR). Il a aussi été montré une relation entre réduction de l'efficacité mitochondriale (réduction de la production d'ATP par la respiration liée à une augmentation de la fuite de protons mitochondriaux pour réduire la production des ROS) et l'ampleur de la réponse aiguë en corticostérone et aussi avec des hauts niveaux de BASE CORT.

Étant donné qu'une baisse de l'efficacité mitochondriale est supposé réduire la production de ROS (Brand 2000), cela pourrait donc dire que cette augmentation des taux de corticostérone en réponse au stress aigu ou forts taux de corticostérone basale pourrait être associée à une réduction de la production de ROS.

Ces résultats renforcent l'hypothèse que les animaux vivant dans des environnements contraignants où les stimuli stressants sont réguliers, possèdent des mécanismes physiologiques d'adaptation pour limiter les dommages liés au stress oxydant.

Cependant, les effets d'un **stress chronique** en conditions environnementales contraignantes et stressantes telles que dans un **habitat naturel**, sont peu étudiés et il n'existe à ce jour que peu de données à ce sujet.

Les études *in vivo* précédant celle de Stier *et al.* (2019) se sont déroulées chez des modèles de laboratoire en conditions contrôlées, donc sans variabilité, avec nourriture et eau à volonté, températures stables, absence de prédateurs, pathogènes... ce qui peut ne pas refléter les variations réelles en glucocorticoïdes et en stress oxydant chez un individu adapté à son milieu naturel. C'est pourquoi, l'étude du Manchot royal dans son habitat naturel présente un intérêt majeur.

En effet, le Manchot royal est contraint par des événements météorologiques, la prédation, les parasites, la recherche alimentaire, la défense du territoire... (Cherel *et al.* 1988 ; Côté 1999 ; Bost *et al.* 2002 ; Mangin *et al.* 2003 ; Descamps *et al.* 2004 ; Viblanc *et al.* 2014). Il subit également de fortes adaptations physiologiques lors du jeûne prolongé (Groscolas et Robin 2001). Des études ont aussi montré que ces contraintes environnementales font apparaître des adaptations au niveau des mitochondries (Rey *et al.* 2008) et des mécanismes pour alléger le stress oxydant (Rey *et al.* 2016 ; Schull *et al.* 2016 ; Stier *et al.* 2019).

## **4. Expérimentation**

Les expéditions et le travail de recherche sur le Manchot royal en France sont sous l'égide de l'IPEV (Institut polaire Paul Emile Victor), l'IPHC (Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien) et le CNRS (Centre National pour la Recherche Scientifique). Les recherches en physiologie du Manchot Royal sur l'archipel de Crozet sont menées par le programme de recherche Econergy #119.

Les travaux de cette thèse ont été effectués sur le plateau technique du Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA) avec l'équipe Ecophysiologie, Comportement et Conservation de l'Université Claude Bernard - Lyon I (UMR 5023).

La de l'étude est du ressort d'Antoine Stier. La création de certains protocoles est du ressort d'Antoine Stier. L'ajustement de certains protocoles des kits existants est du ressort d'Antoine Stier, Julia Watson et moi-même.

Les expérimentations ont été réalisées par moi-même et Antoine Stier avec le soutien technique de Lara Konecny-Dupré et Adeline Dumet.

## **4.1. Lieu d'étude, l'archipel de Crozet**

Les expérimentations in vivo de cette étude ont été menées sur l'archipel de Crozet. Cet archipel sub-antarctique a été découvert en 1772 par Marion-Dufresne, navigateur français. Cet archipel se trouve au sud de l'océan Indien et se compose de 5 îles. L'Archipel de Crozet appartient aux Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF) (« Archipel des Crozet » 2015).

L'archipel est connu pour être la plus grande réserve naturelle d'oiseaux du monde tant elle est peuplée. On y trouve 60 tonnes d'oiseaux au km<sup>2</sup>, dont près de 377 000 paires d'adultes de Manchot royal (Delord et Bost 2020).

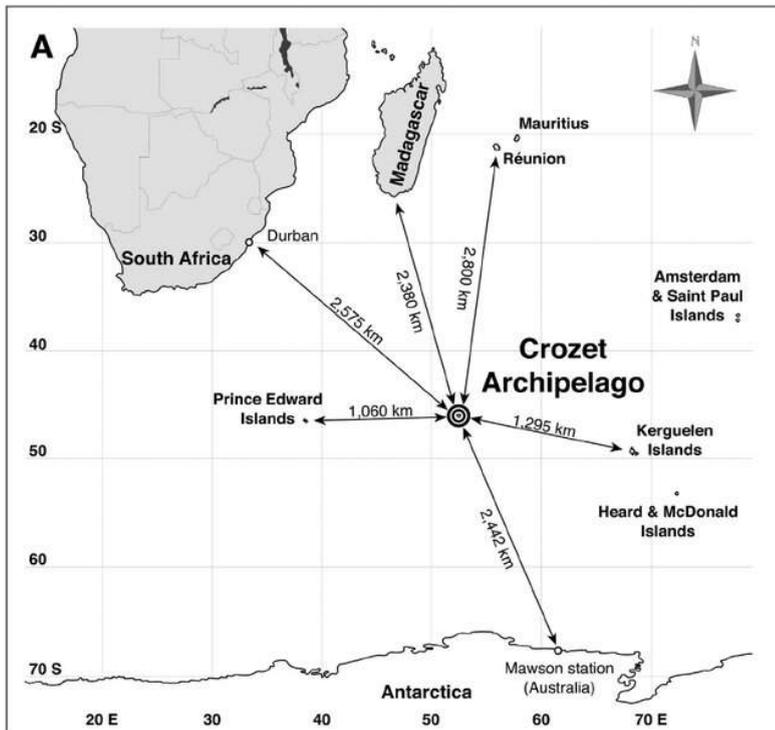


Fig. 30 : Archipel de Crozet, Sud de l’océan Pacifique (Schramm et al. 2014).

Le climat est subantarctique ; les îles Crozet présentent rarement des températures négatives, il fait en moyenne 5°C. Les températures peuvent atteindre 20 °C en été et restent généralement positives en hiver. Les précipitations sont très abondantes (>2 500 mm par an). Il pleut environ 300 jours par an et le vent souffle 100 jours par an à près de 100 km/h.

Les expérimentations réalisées dans cette thèse portent sur du sang de Manchots royaux reproducteurs provenant de l’île de la Possession dans l’archipel de Crozet (46°26’ S, 51°52’ E) dans la Baie du Marin. Cette baie abrite près de 22 000 oiseaux reproducteurs (Barbraud et al. 2020).

Le sang a été prélevé lors de la campagne 2018-2019. Ces prélèvements font partie de la recherche conduite par le **programme #119 Econergy** dépendant de l’Institut polaire français Paul Emile Victor (IPEV).



Fig. 31 : Photographie de la manchotière de la Baie du Marin (IPEV)

Le territoire de prélèvement est réparti en plusieurs zones où la prédation, les conditions climatiques, l'accès à la nourriture varient. Ainsi tous les animaux ne sont pas soumis à la même dose de stress ni à des stress de la même origine. Les zones sont définies dans la Fig. 32.



Fig. 32 : Plan de la zone manchotière en 2020 (Communication personnelle, A. STIER).

## 4.2. Stratégie expérimentale

Bien que les Manchots royaux soient des oiseaux découverts au 18<sup>ème</sup> siècle, les études à leur sujet débutent de façon plus approfondie au 20<sup>ème</sup> siècle avec une densification à partir des années 1960.

Les connaissances globales sur le Manchot royal sont à ce jour de plus en plus précises et détaillées. Les études menées dans le cadre de ce programme de recherche cherchent à comprendre les réponses comportementales, physiologiques et moléculaires du Manchot royal face à différents challenges environnementaux. Ceci permettrait la compréhension (voire la prédiction) des réponses des populations aux stress environnementaux, mais également d'identifier les mécanismes spécifiques de résilience aux stress pouvant éventuellement mener à des avancées utiles à la santé animale et/ou humaine.

Notre étude s'inscrit particulièrement dans le continuum de la recherche en physiologie du stress et fait suite à la découverte de mécanismes probables de résistance et d'adaptation au stress (voir travaux de A. Stier et V. Viblanc, plus particulièrement Stier *et al.* 2019).

Le Manchot royal est un modèle au cycle biologique particulier aussi bien chez l'adulte que le poussin. Les adultes se nourrissent par intermittence en mer et jeûnent lors des séjours à terre, cela parfois pendant plusieurs semaines.

Le Manchot royal est une espèce qui fait face à de fortes contraintes environnementales à la fois sur terre (conflits territoriaux, climat, prédation, parasites...) et en mer (hypoxie, prédation...) ce qui constitue un **modèle privilégié** pour l'étude des mécanismes physiologiques et des compromis énergétiques.

Notre **hypothèse** de travail pour cette thèse est que le Manchot royal pourrait posséder des mécanismes physiologiques pour éviter ou limiter les effets délétères d'une exposition chronique à un fort taux de glucocorticoïdes.

L'**objectif** de la présente thèse est d'étudier la réponse de l'organisme face à une exposition chronique à de forts taux de corticostérone pour but obtenir des réponses sur le rôle de la corticostérone dans l'adaptation du Manchot royal aux défis environnementaux.

Pour tester cette hypothèse, des **implants de corticostérone** (et des placebos ; N=25 par groupe) ont été implantés chez des Manchots royaux en période de reproduction sur l'archipel de Crozet lors de la campagne 2018-2019. Puis des échantillons sanguins ont été récoltés de façon répétée sur les individus de la campagne expérimentale.

Nous avons mesuré :

- La **corticostérone basale** et la corticostérone suite à un stress aigu ;
- Des **métabolites plasmatiques** témoignant des changements physiologiques énergétiques suite à l'augmentation artificielle des taux de glucocorticoïdes (glucose, triglycérides, acide urique, lactate) ;
- Des **marqueurs de stress oxydant** comme la mesure d'antioxydants (glutathion, SOD, GPx), des dommages oxydatifs (8-OHdG) ;
- Les effets sur la **densité mitochondriale** et la **longueur des télomères**.

Au vu de l'étude de Stier *et al.* (2019) sur le Manchot royal et de l'hypothèse suivie, on s'attend à ce que les Manchots royaux stimulés avec un implant de corticostérone montrent des adaptations à l'élévation des taux de glucocorticoïdes pour atténuer les effets de l'exposition au stress chronique et/ou des niveaux élevés de glucocorticoïdes sur le stress oxydant. C'est-à-dire, une augmentation des taux d'antioxydants et des dommages oxydatifs absents ou présents en faible quantité.

### 4.3. Expérimentation animale

Ce projet de recherche a été validé par le Conseil des Programmes Scientifiques et Technologiques Polaires (CPST) créé par le décret n° 93-740 du 29 mars 1993. Le projet a été validé par le BEA de l'IPHC.

L'autorisation d'entrer dans la colonie et d'effectuer les expériences a été obtenue auprès du préfet des Terres Australes et Antarctiques Françaises (Arrêté TAAF n°2017-91) après approbation par le ministère de la recherche Français (APAFIS#16465-2018080111195526 v4). Les expériences suivent les « Mesures Convenues pour la Conservation de la Faune Antarctique et Subantarctique » et respectent les lois françaises en vigueur.

Cette expérimentation porte sur des **animaux sauvages**, bien que la colonie côtoie de loin la présence humaine du fait de la présence d'une base scientifique, les interactions proches avec l'humain sont réduites au maximum. Le Manchot royal est un oiseau aux **effectifs importants et croissants** (classé non vulnérable par l'UICN), et qui présente une bonne tolérance au dérangement humain. Lors de la campagne sur le terrain, les expérimentations sont limitées à une seule colonie représentant **5 % des individus** en reproduction sur l'archipel.

Le but des études menées lors de cette campagne sur l'île de la Possession est de comprendre les stratégies adaptatives du Manchot royal dans son milieu naturel. Ce modèle animal présente des **adaptations particulières**, les méthodes alternatives d'étude sont donc inexistantes.

Dans les protocoles utilisés sur le terrain, on essaie de limiter le nombre de manipulations et d'oiseaux étudiés, c'est pourquoi les expériences se déroulent sur deux saisons (2018-2019). En fonction des résultats obtenus la première saison, on pourra réduire le nombre d'oiseaux manipulés la deuxième saison. De plus, le groupe d'oiseaux utilisés participe à plusieurs programmes scientifiques si cela est possible. Le nombre d'oiseaux utilisés est défini pour permettre de caractériser les variations naturelles par les analyses statistiques en utilisant le moins d'animaux possible.

Sur notre étude, **49 couples d'oiseaux reproducteurs** ont été suivis durant leur cycle de reproduction, de la formation du couple à l'émancipation des poussins 13 mois plus tard. Cette thèse se concentre sur les individus adultes durant la phase d'**incubation** de l'œuf qui se déroule donc sur terre.

Notre expérimentation rentre dans le cadre de l'**expérimentation animale** : nous sommes susceptibles « *de causer à cet animal une douleur, une souffrance, une angoisse ou des dommages durables équivalents ou supérieurs à ceux causés par l'introduction d'une aiguille effectuée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires* » comme le stipule la directive 2010/63/UE du parlement européen et le décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Les techniques utilisées lors de cette campagne sont utilisées en routine chez le Manchot royal et n'ont pas montré d'effets négatifs sur la reproduction et la survie.

Dans notre cas, les oiseaux subissent une chirurgie d'implantation ainsi que 5 prises de sang: la procédure est considérée comme **modérée**. De plus, l'étude des mitochondries mise au point via les prises de sang (globules rouges) permet d'éviter les biopsies musculaires, technique utilisée auparavant.

Les chercheurs qui manipulent les oiseaux sont formés et confirmés, ce qui permet de réduire le temps de manipulation et d'effectuer une bonne contention indolore. Dans cette étude, l'utilisation d'une cagoule opaque lors de la capture ainsi que l'utilisation d'un œuf factice permet de limiter le stress et les accidents liés à la manipulation. En particulier, la polypnée, considérée comme un **indice de stress animal**, marque l'arrêt des manipulations. Un couple d'oiseaux a notamment été retiré de l'étude pour cause de stress menant à une impossibilité de manipulation.

Lors de l'implantation, qui équivaut à une chirurgie légère, la douleur et les risques de maladies sont pris en compte avec l'administration d'anesthésiant en local avant l'incision et l'administration d'antibiotique prophylactique. La durée totale de la manipulation de l'animal pour l'implantation est de l'ordre de 15 minutes. Cette procédure est réalisée par un vétérinaire diplômé d'Etat et a déjà été utilisée sur le Manchot royal (Schull *et al.* 2017).

## 4.4. Matériels et méthodes

### 4.4.1. Conception de l'étude

Des prises de sang ont été effectuées selon le **cycle d'incubation** : une fois l'œuf pondu, les parents alternent pour le couvrir tous les 14 jours  $\pm$  2 jours (Charrassin *et al.* 1998).

Le nombre d'oiseaux a été choisi tel qu'il permette de détecter une taille de l'effet modérée (Cohen  $d \sim 0,5$ ), c'est-à-dire tel que l'ampleur de l'effet du traitement en corticostérone soit suffisamment grande. L'étude porte donc sur 49 manchots royaux adultes séparés en 2 groupes CORT/C témoins (initialement 50 individus mais un animal a été écarté de la procédure expérimentale car il a été jugé qu'il y avait une atteinte à son bien-être).

Dans l'étude expérimentale, on a **n=49** individus. Ils sont répartis dans les groupes tels que :

	CORT	C=témoins	Total
Mâle	13	13	26
Femelle	12	11	23
Total	25	24	49

CORT : individu portant un implant de corticostérone

C : individu avec placebo

Tableau 2 : Les différents groupes d'individus étudiés lors de l'expérimentation.

Lorsque la femelle revient de son second voyage alimentaire, la **rotation n°2**, on lui laisse 2 jours d'incubation de son œuf et au troisième jour **J3**, on procède à une prise de sang préimplantatoire "**before**" et à l'**implantation**. Ensuite, six jours après l'implantation, une seconde prise de sang est effectuée, notée **J6**.

Ainsi, nous nommerons après, dans un souci d'harmonisation, les prises de sang prises à différents moments sur un même individu, telles que :

- “**Before**” : correspondant à la **préimplantation**, 3 jours après que l'individu soit revenu de la mer (voyage alimentaire) pour prendre son tour d'incubation (soit à la rotation 2 pour la femelle, et à la rotation 3 pour le mâle).
- “**J6**” : correspond à 6 jours après l'implantation de l'animal
- “**R1**” : première rotation après implantation, c'est-à-dire que l'animal est parti en mer et revenu sur terre avec son implant. L'implant est donc en place depuis à peu près 28 jours.
- “**R2**” : seconde rotation après implantation, l'implant est en place depuis à peu près 56 jours.

A **J6**, soit 6 jours après l'implantation de l'animal, deux prises de sang sont effectuées au lieu d'une seule sur les autres stades.

Ces prises de sang correspondent à :

- **PS** : prise de sang prise en **moins de 3 minutes** (BASE CORT), durée établie selon laquelle la corticostérone n'a pas eu le temps de varier face au stress de contention (5 minutes dans cette espèce ; Viblanc *et al.* 2018). Cette règle des 3 minutes est prise en compte sur toutes prises de sang réalisées à tous les stades sauf la PS30.
- **PS30** : prise de sang prise **après 30 min de stress de contention** (manipulation humaine ; STRESS CORT), durée suffisante pour que le taux de corticostérone augmente du fait du stress de contention. Elle est réalisée seulement à J6 (Stier *et al.* 2019 ; Viblanc *et al.* 2018).

Bien que mesurée et testée, **la PS30 ne fera pas l'objet d'analyse** dans cette thèse.

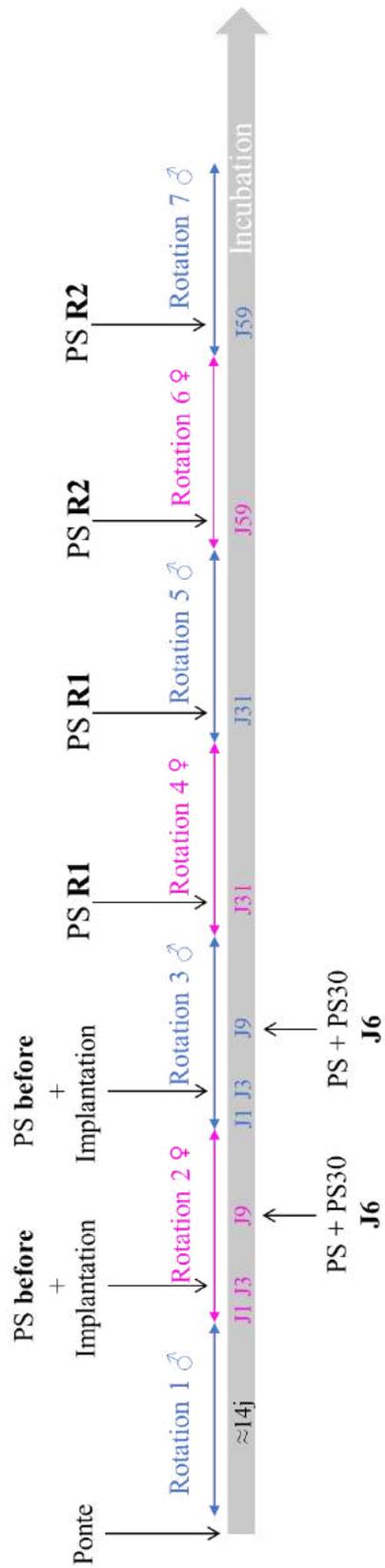


Fig. 33 : Schéma représentant les rotations d'incubation des parents une fois l'œuf pondu ainsi que les prises de sang réalisées en fonction du temps.

Le sang collecté sera centrifugé et séparé en 2 aliquots : le culot cellulaire (globules rouges majoritairement) et le plasma. Les échantillons de plasma seront évalués pour leur donner une **note d'hémolyse** allant de 0 à 3 : 0 étant l'absence d'hémolyse (coloris transparent) ; 3 étant une hémolyse prononcée (coloris rouge sang). La note d'hémolyse entrera dans les covariables du modèle mathématique.

De plus, il est montré que les oiseaux possèdent des **mitochondries fonctionnelles** dans leurs globules rouges (Stier *et al.* 2013 ; Stier *et al.* 2015) ce qui nous permettra d'évaluer les changements à court terme de la fonction mitochondriale (Stier *et al.* 2016 ; Stier *et al.* 2019) et les mesures des taux d'antioxydants mitochondriaux.

Outre la corticostérone, on mesure plusieurs métabolites témoignant de la potentielle utilisation des mobilisations énergétiques des glucides, lipides et protéines par les mesures du glucose, des triglycérides, de l'acide urique et du lactate. Ces mesures peuvent nous aider à comprendre comment le Manchot royal gère son déficit énergétique lors de stress chronique et quel est l'impact d'une exposition prolongée à la corticostérone sur celui-ci.

Dans le cadre de cette étude nous cherchons également à comprendre les conséquences de l'exposition au stress chronique induit via les implants de corticostérone, notamment le lien entre stress chronique et stress oxydant, et comment les défenses antioxydantes réagissent à cette surcharge allostatique en glucocorticoïdes. Afin de mesurer le potentiel stress oxydant, nous avons mesuré sur le plasma, la capacité antioxydante non enzymatique (OXY), les métabolites réactifs de l'oxygène (ROMs) ainsi que le 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), qui est le produit des dommages oxydatifs induits par les radicaux libres de l'ADN et est un biomarqueur pour le stress oxydatif.

Afin d'avoir une vision globale des possibles dégâts du stress oxydant sur l'ADN, nous avons effectué deux mesures : une mesure du 8-OHdG plasmatique, qui est une mesure susceptible de représenter l'état de stress oxydatif dans l'ensemble de l'organisme et donc influencées par le niveau des dommages et par le taux de réparation de ces dommages, et une mesure du 8-OHdG intégré dans l'ADN des globules rouges, qui marque les dégâts non réparés.

Les mesures des enzymes antioxydantes, la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathione peroxydase (GPx), ont également été effectuées sur lysat de globules rouges. Ces mesures devraient permettre de statuer d'une potentielle variation des taux des antioxydants face à l'exposition chronique en corticostérone.

Pour finir, nous nous sommes intéressés à la densité mitochondriale et à la longueur télomérique. Ces mesures sont des biomarqueurs des altérations de l'organisme et le témoin d'un stress oxydant.

#### **4.4.2. Implantation des Manchots royaux avec un implant de corticostérone**

Les couples de Manchots royaux sont sélectionnés aléatoirement pour l'étude. Ils sont capturés manuellement sans anesthésie lors de l'incubation des œufs. Une cagoule est placée sur la tête des individus au moment de la capture afin de les calmer, et l'œuf est remplacé par un œuf factice le temps des manipulations pour éviter tout risque d'accident lors des mouvements de l'adulte. Ils sont identifiés par une marque de teinture noire sur les plumes de la poitrine pour les repérer pour la suite des opérations. Par couple de manchot, on choisit aléatoirement d'implanter soit le mâle soit la femelle avec un implant de corticostérone ou un placebo, ainsi sur un couple, un seul individu est implanté.

Les individus sont implantés sous anesthésie locale (0.5mg/kg xylocaïne et 0.0001mg/kg adrénaline, Aspen Pharma) en haut du dos en sous cutané avec soit un **implant de corticostérone** (NG-111, 50 mg à libération prolongée 90 jours), soit un **implant placebo** (même implant mais sans corticostérone). Voir le protocole chirurgical en *annexe 1* (protocole d'implantation de Caroline Gérard ; de nombreux protocoles existent : voir Torres-Medina *et al.* 2018). Après l'implantation, l'incision est refermée avec 3 agrafes chirurgicales et les individus reçoivent une dose prophylactique d'antibiotique (céfalexine, 50 mg/kg, Rilexine®, Virbac).

Les implants proviennent de Innovative Research of America (Sarasota, FL, USA), et la dose a été déterminée à partir d'une étude préliminaire réalisée en 2017-2018 : 10 mâles implantés avec un implant de corticostérone, 10 mâles avec le placebo à la dose de 100 mg (Stier, communication personnelle). Les implants possèdent une matrice de cholestérol où la corticostérone est incluse et délivrée par érosion de l'implant en sous-cutané et diffusion de la substance active.

Les femelles sont implantées lors de leur première rotation d'incubation après le voyage alimentaire et 3 jours après leur retour sur terre. Les mâles sont implantés lors de leur seconde rotation afin d'obtenir des durées de jeûne (et donc un état physiologique) comparables avec les femelles, puisque la première rotation d'incubation des mâles commence après une dizaine de jours passés à terre pour la formation du couple, l'accouplement, la sécurisation du territoire et la ponte.

### **4.4.3. Prélèvements sanguins**

Les prélèvements sanguins s'effectuent à la veine basilaire (coude) à l'aide de seringues héparinées de 2.5mL montées avec une aiguille de 21 à 25 G. On prélève entre 0.2 et 1.5 mL par prise de sang.

Une fois collecté, le sang est transféré immédiatement dans des tubes Eppendorf et mis dans la glace 15/30 min avant d'être centrifugés 5 minutes à 3000g et aliquotés en 2 échantillons : un culot cellulaire (majoritairement globules rouges) et du plasma. Les aliquots sont ensuite congelés à -20°C.

#### **4.4.4. Dosage des protéines : kit Pierce® BiCinchoninic acid Assay, Thermo Fisher Scientific.**

Le dosage des protéines totales est effectué sur le plasma des échantillons afin d'obtenir leur concentration en protéines et de les intégrer aux calculs du modèle mathématique en tant que covariable pour moduler leurs effets sur les résultats.

Le BCA est un dosage colorimétrique des protéines basé sur l'acide bicinchoninique. La méthode combine la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  par les protéines dans un environnement alcalin à la détection colorimétrique de  $\text{Cu}^+$  par le BCA (*annexe 2*).

Les échantillons de plasma sont dilués au 5ème puis on réalise le dosage selon les directives du fabricant. Le kit utilisé est le Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Référence : 23225). La plaque est lue avec le spectrophotomètre Epoch 2 microplate reader Biotek.

Les concentrations sont obtenues par calcul sur Excel. Une courbe étalon avec les absorbances mesurées est réalisée grâce aux standards de concentrations connues permettant d'obtenir les valeurs diluées des échantillons. Ces valeurs sont multipliées par le coefficient de dilution afin d'obtenir la valeur réelle en mg/mL.

## **4.4.5. Dosage de la corticostérone et des métabolites plasmatiques**

### **4.4.5.1. Dosage de la corticostérone plasmatique : Enzyme immunoassay kit detect X ® Arbor Assays.**

Des mesures de corticostérone ont déjà été réalisées chez cette espèce (Stier *et al.* 2014 ; Viblanç *et al.* 2016). La méthode de dosage utilisée est un dosage ELISA par immuno-compétition, le kit utilisé est le DetectX ® corticosterone Enzyme Immunoassay K014-H1W/H5W.

Les réactifs fournis sont : des plaques 96 puits couvertes d'igG anti-mouton d'âne, du standard : corticostérone 100,000 pg/mL, DetectX® Corticosterone Antibody : anticorps polyclonal de mouton spécifique de la corticostérone, DetectX® Corticosterone Conjugate : un conjugué corticostérone-peroxidase dans une solution stabilisatrice, un réactif de dissociation, le TMB : substrat, la stop solution : acide hydrochlorique. Les réactifs ont été préparés selon les directives du fabricant.

Nous avons utilisé le protocole du fabricant du kit avec modifications des volumes utilisés lors de l'étape de dissociation et de dilution (voir *annexe 3*). La plaque est lue avec le spectrophotomètre Epoch 2 microplate reader Biotek.

Nous effectuons les calculs sous le logiciel Excel, on réalise en premier une moyenne des densités optiques des duplicats en soustrayant le blanc pour les échantillons et les standards. Puis, on crée une courbe étalon avec une régression logistique en utilisant le logarithme népérien sur les concentrations connues de corticostérone. Enfin, on trace une courbe de tendance de type polynomiale de degré 3 pour obtenir une courbe sigmoïde.

Les concentrations des échantillons sont obtenues après calculs via la courbe de pourcentage de liaison %B/B0. Les résultats sont multipliés par leur coefficient de dilution pour obtenir la concentration réelle.

#### **4.4.5.2. Dosage du glucose : Glucose GLUC-PAP, Randox laboratories**

La quantité de glucose est déterminée après une oxydation enzymatique en présence de glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé réagit avec le phénol et le 4-aminophénazone sous catalyse de la peroxydase, pour former un colorant rouge-violet, la quinonéimine. Le kit utilisé est le GLUC-PAP, Randox laboratories GL 364.

Les réactifs utilisés sont le tampon (tampon phosphate 0.1 mol/L pH 7.0), le réactif GOD-PAP (4-aminophenazone 0.77 mmol/L ; Glucose oxydase >1.5 kU/L ; Peroxydase >1.5 kU/L).

Les directives du fabricant ont été suivies lors de cette expérience, les modifications de volumes sont indiquées dans l'*annexe 4*. La plaque est lue avec le spectrophotomètre Epoch 2 microplate reader Biotek.

La concentration est obtenue par calcul sur Excel:

$$[\text{Glucose}] = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{standard}}} \times \text{concentration standard (g/L)}$$

#### **4.4.5.3. Dosage du lactate : L-Lactate (LAC) Randox laboratories**

Le lactate est déterminé par méthode enzymatique colorimétrique (PAP). L'oxydation du lactate sous l'action de la lactate oxydase va produire du peroxyde d'hydrogène. Ce peroxyde va être transformé grâce aux réactifs et à l'action de la peroxydase pour donner un colorant violet. Le kit utilisé est le L-Lactate (LAC) de Randox laboratories, LC 2389.

Les réactifs utilisés sont préparés selon les directives du fabricant. Les réactifs sont le tampon (Tampon Pipes mmol/L pH 7.20 ; TOOS 2.1 mmol/L ; azide de sodium 1g/L), le réactif enzymatique (4-aminophenazone 0.4 mmol/L ; Peroxydase >1000 U/L ; Lactate oxydase > 600 U/L ; Ascorbate oxydase > 10000 U/L).

Les directives du fabricant ont été suivies lors de cette expérience voir *annexe 5*. La plaque est lue avec le spectrophotomètre Epoch 2 microplate reader Biotek.

Les concentrations sont obtenues par calcul sur Excel :

$$[\text{Lactate}] = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{standard}}} \times \text{concentration standard (g/L)}$$

#### **4.4.5.4. Dosage des triglycérides : Triglycerides (TRIGS), Randox laboratories**

Pour mesurer les triglycérides, nous avons utilisé une méthode enzymatique colorimétrique (GPO-PAP).

Les triglycérides sont hydrolysés par des lipases puis un enchaînement de réactions enzymatiques forme le colorant quinoneimine formé à partir du peroxyde d'hydrogène, du 4-aminophénazone et du 4-chlorophénol grâce à la catalyse de la réaction par la peroxydase. Le kit utilisé est le Triglycerides (TRIGS) de chez Randox laboratories, TR 1697.

Les réactifs sont préparés selon les directives du fabricant. Les réactifs sont le tampon (Tampon Pipes 40 mmol/L pH 7.4, 4-chlorophenol 5.4 mmol/L, ions magnésium 5.1 mmol/L, ATP 1.0 mmol/L, peroxidase >0.5 U/mL, glycerol kinase >0.4 U/mL, glycerol-3-phosphate oxydase >1.5 U/mL, azide de sodium 0.05%), le réactif enzymatique (4-aminoantipyrine 0.4 mmol/L, lipases >150 U/mL, azide de sodium 0.05%).

Le kit est utilisé selon les instructions du fabricant (modification de volume voir *annexe 6*). La plaque est lue avec le spectrophotomètre Epoch 2 microplate reader Biotek.

Les concentrations sont obtenues par calcul sur Excel tel que :

$$[\text{Triglycérides}] = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{standard}}} \times \text{concentration standard (g/L)}$$

#### 4.4.5.5. Dosage de l'acide urique : uric acid (UA) Randox laboratories

Afin de faire une mesure quantitative de l'acide urique, nous avons utilisé la méthode enzymatique colorimétrique du kit Uric Acid de Randox.

L'acide urique est converti en allantoïne et peroxyde d'hydrogène par l'uricase. Le peroxyde d'hydrogène sous l'influence d'une peroxydase oxyde l'acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique et le 4-aminophénazone en un composé quinoneimine de coloration rouge-violet. Le kit utilisé est le uric acid (UA) de chez Randox Laboratories, UA 230.

Les réactifs sont préparés selon les directives du fabricant. Les réactifs sont le tampon (Tampon Hepes 50 mmol/L pH 7.0, Acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique 4 mmol/L), le réactif enzymatique (4-Aminophénazone 0.5 mmol/L, peroxydase >1000 U/L, uricase >200 U/L).

On utilise le kit d'après les instructions du fabricant avec une modification des volumes utilisés mentionnés dans l'*annexe 7*. La plaque est lue avec le spectrophotomètre Epoch 2 microplate reader Biotek.

Les concentrations sont obtenues par calcul sur Excel tel que :

$$[\text{Acide urique}] = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{standard}}} \times \text{concentration standard (g/L)}$$

## 4.4.6. Biomarqueurs du stress oxydant

### 4.4.6.1. Les antioxydants

#### 4.4.6.1.1. OXY test : capacité antioxydante totale du plasma, DIACRON (Stier *et al.* 2012)

La capacité antioxydante non enzymatique a été évaluée à l'aide du test OXY (Diacron International, Italie) qui quantifie la capacité du plasma à amortir une réaction d'oxydation massive en réponse à l'acide hypochlorique. Les résultats sont exprimés en micromoles de HClO neutralisés par millilitre. Cette mesure a déjà été effectuée chez le Manchot royal par Stier *et al.* (2014), Viblanc *et al.* (2014), Stier *et al.* (2019).

On fera attention à garder au maximum les échantillons et contrôles sur glace. Les dépôts dans les puits de la plaque de biochimie ont lieu sur glace. Les réactifs utilisés sont R1 : réactif oxydant (HClO) de concentration 0.1% et R2 : réactif chromogène (N,N-diethylparaphenylendiamide) contenant des stabilisateurs avec une concentration de 10%.

Le protocole suit les directives du fabricant avec des modifications voir *annexe 8*. La plaque est lue avec le spectrophotomètre Epoch 2 microplate reader Biotek.

On effectue les calculs sur Excel tels que :

$$[\text{OXY}] = \frac{(\text{Ablanc} - \text{Aéchantillon})}{(\text{Ablanc} - \text{Acalibrateur})} \times \text{Concentration Calibrateur (mmol HClO/mL)}$$

#### 4.4.6.1.2. Dosage de la superoxyde dismutase : RANSOD, Randox laboratories

Le rôle de la SOD est d'accélérer la dismutation du radical superoxyde produit pendant les processus oxydatifs de production d'énergie, en peroxyde d'hydrogène et oxygène. Cette enzyme a déjà été mesurée chez le Manchot royal par Stier *et al.* (2019).

Cette méthode emploie de la xanthine et de la xanthine oxidase (XOD) pour produire des radicaux superoxyde qui réagissent avec le 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) pour former une coloration rouge formazan. L'activité de la SOD est mesurée par le degré d'inhibition de la réaction. Une unité de SOD cause une inhibition de 50 % du taux de réduction de INT. Le kit utilisé est le RANSOD de Randox laboratories, SD 125.

Les réactifs utilisés sont R1a : mix de substrats (Xanthine 0.05 mmol/L ; I.N.T 0.025 mmol/L), R1b : le tampon (CAPS 40 mmol/L pH 10.2, EDTA 0.94 mmol/L) et R2 : xanthine oxidase (80 U/L). Ils sont reconstitués d'après les directives du fabricant.

Le protocole suit les directives du fabricant avec des modifications voir *annexe 9*. La plaque est lue avec le spectrophotomètre Epoch 2 microplate reader Biotek.

Pour obtenir la concentration, on effectue dans un premier temps un calcul de la pente.

Ensuite on calcule le pourcentage d'inhibition :

$$\%inhibition = 100 - \frac{Pente_{\text{échantillon}}}{Pente_{\text{blanc}}} \times 100$$

Une courbe étalon est obtenue par régression log linéaire et permet d'obtenir les valeurs de concentration en SOD qu'il faut ensuite multiplier par le facteur de dilution (sous Excel).

#### 4.4.6.1.3. Dosage de la glutathione peroxydase : RANSEL, Randox laboratories

La méthode est basée sur celle de Paglia et Valentine (1967). Cette enzyme a déjà été mesurée chez le Manchot royal par Stier *et al.* (2019).

La glutathione peroxydase (GPx) catalyse l'oxydation de la glutathione (GSH) par l'hydroperoxyde de cumène. En présence de glutathione réductase (GR) et NADPH, la glutathione oxydée (GSSG) est convertie en sa forme réduite avec une oxydation concomitante du NADPH en NADP<sup>+</sup>. La baisse de l'absorbance à 340 nm est mesurée (Epoch 2 microplate reader Biotek). Le kit utilisé est le RANSEL de chez Randox Laboratories, RS 504.

Les réactifs sont R1a : réactif (Glutathione 4 mmol/L ; Glutathione reductase >0.5 U/L ; NADPH 0.34 mmol/L), R1b : tampon (tampon phosphate 0.05 mol/L pH 7.2 ; EDTA 4.3 mmol/L), R2 : hydroperoxyde de cumène (4.3 mmol/L) et R3 : le diluant (0.18 mmol/L).

Le protocole suit les directives du fabricant avec des modifications voir *annexe 10*. La plaque est lue avec le spectrophotomètre Epoch 2 microplate reader Biotek.

Pour obtenir les concentrations, on calcule sur Excel la pente entre les absorbances mesurées et les minutes. Puis, on calcule tel que :

$$[\text{GPx}] = \frac{\text{Pente}_{\text{échantillon}} \times 8412}{1000 \times 5} \quad (\text{U/mL})$$

## 4.4.6.2. Marqueurs de stress oxydant

### 4.4.6.2.1. Dosage des métabolites réactifs de l'oxygène dans le plasma, DIACRON (Stier *et al.* 2012)

Les ROMs (métabolites réactifs de l'oxygène) sont les hydroperoxydes générés lors de l'action des radicaux libres sur les protéines/lipides/ADN. Cette mesure a déjà été effectuée chez le Manchot royal par Stier *et al.* (2019) et précédemment chez l'Adélie (Beaulieu *et al.* 2011).

Les ROMs sont plus stables que les ROS, permettant ainsi une détection et une quantification, leur production est aussi précoce.

Le test est basé sur la réaction de Fenton où les hydroperoxydes (ROOH) provenant de l'échantillon, réagissent avec le fer relargué des protéines plasmatiques par un tampon acide (réactif R2) et génèrent des radicaux alkyles (R-O°) et peroxydes (R-OO°).

Ensuite, les radicaux alkyles et peroxydes oxydent un amine aromatique substitué alkyle A-NH<sub>2</sub> (solubilisé dans un mélange chromogène - réactif R1) et génère sa forme oxydée [A-NH<sub>2</sub>°]<sup>+</sup>, un composant coloré rose. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration de ROMs dans l'échantillon d'après la loi de Beer-Lambert.

Le protocole suit les directives du fabricant avec des modifications voir *annexe II*. La plaque est lue avec le spectrophotomètre Epoch 2 microplate reader Biotek.

On effectuera le calcul suivant pour obtenir les concentrations de dROMs sur Excel tel que :

$$[\text{dROMs}] = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{calibrateur}}} \times \text{Concentration Calibrateur} \times 0,08 \quad (\text{mg H}_2\text{O}_2/\text{dL})$$

#### 4.4.6.2.2. Mesures du stress oxydant sur l'ADN

##### 4.4.6.2.2.1. Extraction ADN pour qPCR : NucleoSpin® Blood QuickPure

Tout d'abord les échantillons sanguins (culots cellulaires issus des prises de sang) sont lysés afin de libérer le matériel génétique contenu dans le noyau des cellules (les globules rouges des oiseaux sont nucléés). On utilise ici une méthode d'extraction sur colonne de silice, Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Blood QuickPure de chez Fisher Scientific.

Le protocole est un adapté du protocole du fabricant voir *annexe 12*. Les réactifs et tampons sont préparés et utilisés selon les directives du fabricant. La plaque est lue avec le spectrophotomètre Epoch 2 microplate reader Biotek.

La quantité et la pureté des échantillons d'ADN est ensuite estimée par dosage spectrophotométrique (Nanodrop).

Les paramètres acceptés à la mesure au Nanodrop sont :

Paramètre	Valeur acceptable
[ADN]	> 50 ng/μL
Ratio 260/280 nm	> 1.8
Ratio 260/230	> 2.0

Tableau 3 : Valeurs acceptables en spectrophotométrie au Nanodrop après extraction d'ADN.

Les échantillons répondant à ces critères seront ensuite congelés à -20°C et utilisés pour des mesures ultérieures.

##### 4.4.6.2.2.2. Digestion de l'ADN adapté de Quinlivan et Gregory (2008)

Le protocole est adapté de Quinlivan et Gregory (2008) par A. Stier voir *annexe 13*. Dans un premier temps, il convient de préparer le mix de digestion qui a pour but de dénaturer l'ADN en désoxyribonucléoside afin de libérer le composant qui nous intéresse dans l'expérience suivante : 8-OH-dG.

Les échantillons ainsi digérés peuvent être stockés à -20°C.

#### 4.4.6.2.2.3. Dosage des dommages de l'ADN : 8-OHdG, Arbor Assays

Le kit utilisé est le DetectX® DNA Damage Enzyme Immunoassay Kit K059-H5 de chez Arbor Assays. Ce composé a déjà été mesuré chez le Manchot royal par Stier *et al.* (2014), Viblanç *et al.* (2014), Stier *et al.* (2019).

Les réactifs fournis sont les plaques 96 puits couvertes d'IgG anti-lapin de chèvre, le standard 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine à 160 ng/mL, la solution d'anticorps monoclonal de souris marqué de la peroxydase DetectX® 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, le conjugué DetectX® 8-Hydroxyguanosine, le substrat TMB, la Stop Solution d'acide hypochlorhydrique.

Les tampons et les standards sont préparés selon les directives du fabricant. Le principe est celui d'un ELISA compétitif. Le protocole est un adapté du protocole du fabricant voir *annexe 14*. La plaque est lue avec le spectrophotomètre Epoch 2 microplate reader Biotek.

Nous effectuons les calculs sous le logiciel Excel : on réalise en premier une moyenne des densités optiques des duplicats en soustrayant le blanc pour les échantillons et les standards. Puis, on crée une courbe étalon avec une régression logistique en utilisant le logarithme népérien sur les concentrations connues de corticostérone. Enfin, on trace une courbe de tendance de type polynomiale de degré 3 pour obtenir une courbe sigmoïde. Les concentrations des échantillons sont obtenues après calculs via la courbe de pourcentage de liaison %B/B0. Les résultats sont multipliés par leur coefficient de dilution pour obtenir la concentration réelle.

#### 4.4.6.2.3. Principe de l'amplification des séquences RAG1.3, CO 2.4 et Telo par qPCR

Afin de déterminer les quantités relatives d'ADN mitochondrial et la longueur des télomères, certains gènes sont utilisés comme référence. Ces gènes en particulier servent à la création de primers pour la qPCR. Ils seront donc amplifiés et les quantités relatives mesurées.

La méthode qPCR a été adaptée aux oiseaux par Criscuolo *et al.* (2009) puis utilisée chez le Manchot royal par Geiger *et al.* (2012), Stier *et al.* (2014).

Les 3 séquences amplifiées sont RAG1.3, COI 2.4 et Telo respectivement, la séquence codant pour un gène témoin, la séquence codant pour un gène mitochondrial et la séquence codant pour une portion télomérique. Les amorces RAG1 et pour le gène mitochondrial ont été désignées par A. Stier (non publié). Pour le gène télomérique les séquences des primers sont les mêmes que celles utilisées par Criscuolo *et al.* (2009) et Stier *et al.* (2014).

On utilise des primers sens et antisens :

RAG1 : 400 nM

Telo : 300 nM

COI2 : 150 nM

Avec des séquences respectives suivantes :

**RAG1 :**

Forward : GTCCAACCCATATCACGAATCT

Reverse : GGAGGGAACGGTCTCAATAAA

**Tel1b :** CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT

**Tel2b :** GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT

**COI2 :**

Forward : TCGGACACCAATGATACTGAAC

Reverse : CAACTCGGTGGTCTACTTCTAAC

Pour réaliser ces qPCR, on utilise le thermocycleur **qPCR Mic** de chez Bio Molecular Systems. On utilise la technologie SYBR (Master Mix qPCR SYBR™ Green, ThermoFisher Scientific).

Afin de construire une courbe étalon, nous avons préparé un mix de plusieurs échantillons provenant de notre étude à 6 ng, 3 ng, 1.5 ng et d'un échantillon contrôle positif.

Les échantillons sont dilués, voir *annexe 16* pour des exemples de calcul de dilution. Le protocole est visible en *annexe 15*.

Les conditions de la PCR sont :

- 95°C, 3 minutes - 95°C, 5 secondes - 60°C, 25 secondes : 25 fois pour Télo, 35 fois COI2, 38 fois pour RAG1 (*annexe 16*).

L'efficacité et le Cq de chaque puits sont ainsi évalués. La valeur Cq est le nombre de cycle de PCR auquel la courbe de réaction de l'échantillon croise la ligne de seuil (Ct=cycle threshold). Cette valeur indique le nombre de cycles nécessaires pour détecter un signal réel à partir de l'échantillon : plus le Cq est bas, plus la séquence cible est en quantité importante. L'efficacité est calculée avec la gamme étalon, en théorie, on cherche à avoir une efficacité de 100%, c'est à dire que, à chaque cycle, chaque segment d'ADN portant la séquence choisie doit être amplifié ; cela suit donc une croissance exponentielle. Des exemples de résultats obtenus se trouvent dans les *annexes 17 et 18*.

Nous cherchons à déterminer une quantité relative en utilisant le gène de référence RAG1. Pour les calculs, nous utiliserons la méthode de Pfaffl (Pfaffl 2001). L'expression relative d'un gène cible est calculée en fonction de la déviation E (efficacité) et le Cq d'un échantillon inconnu par rapport à un contrôle, exprimé par rapport à un gène de référence.

$$\text{Ratio} = \frac{(1+E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{qtarget}}}}{(1+E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{qref}}}}$$

$E_{\text{target}}$  est l'efficacité de la PCR en temps réel de la transcription du gène cible, ici soit COI2, soit la séquence Télo.

$E_{\text{ref}}$  est l'efficacité de la PCR en temps réel d'une transcription de gène de référence : pour nous c'est donc RAG1.

$\Delta C_{\text{qtarget}}$  est l'écart  $C_{\text{q}}$  du contrôle – échantillon de la transcription du gène cible

$\Delta C_{\text{qref}}$  = déviation  $C_{\text{q}}$  du témoin – échantillon de transcription du gène de référence

#### 4.4.7. Analyse statistique

Pour l'analyse des résultats, nous utilisons un **modèle mixte linéaire** aussi connu sous le nom de modèle multi-niveaux (GLMM), car il modélise la variation à au moins deux niveaux : l'observation individuelle et le groupe. Le logiciel utilisé est IBM SPSS.

Ce type de modèle permet d'exposer des effets fixes et des effets aléatoires sur des mesures répétées sur plusieurs individus.

En effet, il existe des effets identiques pour les sujets d'une même population et des niveaux de réponse propres à chaque individu par rapport à la population.

Un **effet fixe** (facteur fixe) est un effet dont on souhaite généraliser les propriétés. Il s'agit de la variable manipulée, celle que l'on cherche à expliquer.

Un **effet aléatoire** (facteur aléatoire) est un effet dont on ne veut pas généraliser les propriétés et dont les niveaux sont échantillonnés de façon aléatoire dans une population plus grande. Ce sont des variables catégorielles (ici l'individu ou le lot d'échantillons sur une expérience). On considère donc dans le modèle que ces valeurs sont dépendantes entre elles. Pour une variable donnée, les valeurs d'un individu sont dépendantes entre elles ; ainsi que pour un lot d'échantillons traités sur la même plaque qui sont non indépendants entre eux.

La **variable dépendante** (c'est ce que l'on a mesuré expérimentalement) est considérée comme étant linéairement reliée aux facteurs fixes, aux facteurs aléatoires et aux covariables. Les effets aléatoires sont considérés comme étant indépendants les uns des autres.

Dans notre modèle nous rentrons en :

- **Variable dépendante:** notre mesure soit par exemple les valeurs obtenues par le dosage de corticostérone ;
- **Facteurs fixes :**
  - Le groupe (CORT ou C = témoins), le sexe (F ou M), le stade (before, J6, R1 ou R2), la note hémolyse, la mesure de dosage des protéines BCA (pour les mesures de GPx et SOD uniquement) ;
  - Les interactions : groupe x stade, groupe x sexe, sexe x stade ;
- **Facteurs aléatoires :** l'individu (ID), la plaque de biochimie (plate) ;
- **Covariables :** la note hémolyse, la mesure de dosage des protéines BCA (pour les mesures de GPx et SOD uniquement).

Les covariables sont des variables qui affectent la relation entre la variable indépendante et la variable dépendante mais qui ne présente pas d'intérêt direct.

Lorsqu'une interaction significative entre deux facteurs (par exemple Groupe x Stade) est détectée, une analyse séparée par facteur (par exemple, l'effet Groupe au sein de chaque Stade) est conduite afin d'établir l'origine de l'interaction et les graphiques correspondants sont présentés. Les moyennes sont données  $\pm$  écart type, les p-value sont considérées significatives lorsque  $p < 0.05$ .

Les valeurs du modèle sont données telles que :

MLM,  $F(\text{ddl du numérateur, ddl du dénominateur}) = F, p\text{-value}$

MLM : modèle mixte linéaire

ddl : degré de liberté

F : valeur F, tiré d'un **test F** : terme générique désignant tout test statistique dans lequel la statistique de test suit la loi de Fisher sous l'hypothèse nulle.

## **5. Résultats d'expérimentation**

**Rappels:** les différentes mesures sont effectuées à plusieurs stades :

- **Before** : prise de sang avant implantation
- **J6** : prise de sang effectuée 6 jours après implantation
- **R1** : prise de sang effectuée après une rotation en mer soit à peu près 28 jours après implantation
- **R2** : prise de sang effectuée après deux rotations en mer soit à peu près 56 jours après implantation

Les groupes sont définis tels que :

**CORT** : manchots ayant été implantés avec un implant de corticostérone

**C** : manchots ayant été implantés avec un implant placebo

Les étoiles présentes sur les graphiques sont définies telles que:

\*\*\* :  $p < 0.001$

\*\* :  $p < 0.01$

\* :  $p < 0.05$

## 5.1. Corticostérone et métabolites plasmatique

### 5.1.1. Corticostérone

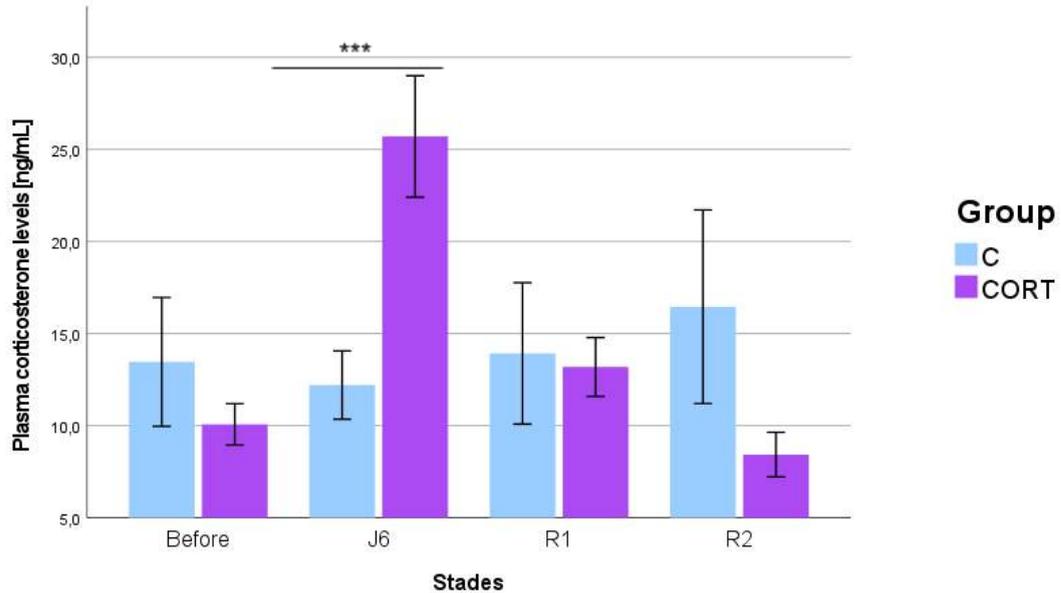


Diagramme 1 : Concentration moyenne en corticostérone en pg/mL en fonction du stade et des groupes.

L'interaction **significative Groupe\*Stade** montre un effet du groupe à **J6** (MLM,  $F(1,37)= 12.53$ ,  $p<0.001$ ,  $N_{cort}= 25$ ,  $N_c= 24$ ) : les individus du groupe **CORT** ont une moyenne nettement plus élevée soit  $24.96 \pm 4.12$  ng/mL contre  $12.36 \pm 4.20$  ng/mL pour le groupe C témoin (Diag. 1).

Les autres stades ne sont pas significativement différents : Before (MLM,  $F(1,37)= 0.49$ ,  $p= 0.49$ ) ; R1 (MLM,  $F(1,35)= 0.015$ ,  $p= 0.90$ ) ; R2 (MLM,  $F(1,30)$ ,  $p= 0.32$ ) ; (voir *annexe 19*).

## 5.1.2. Glucose

L'étude des valeurs de la glycémie montre une interaction **Sexe\*Stade** significative (MLM,  $F(3,122)= 3.31, p= 0.022$ ) ; voir *annexe 20*.

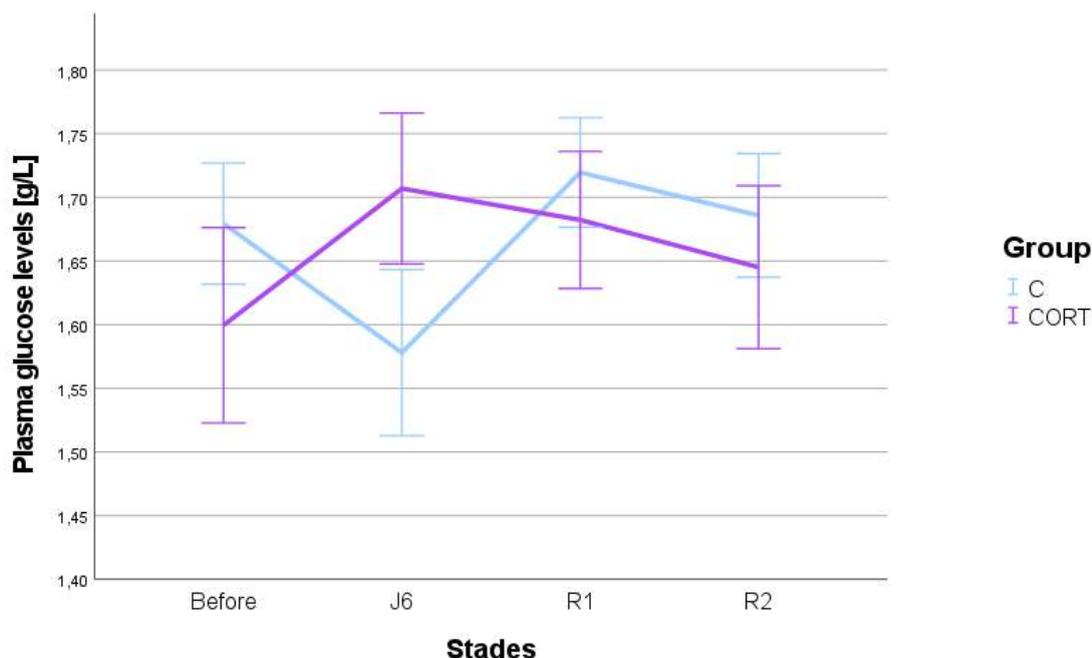


Fig. 34 : Courbe représentant la concentration moyenne de glucose en g/L en fonction du stade et des groupes.

Au vu de l'interaction **Sexe\*Stade**, nous avons cherché à expliciter les stades auxquels cette interaction avait lieu, c'est donc au stade **J6** (MLM,  $F(1,38)= 4.18, p= 0.048$ ) avec une moyenne de  $1.57 \pm 0.06$  g/L pour les femelles et  $1.71 \pm 0.06$  g/L pour les mâles. Les autres stades ne sont pas significatifs : Before (MLM,  $F(1,38)= 1.24, p= 0.27$ ) ; R1 (MLM,  $F(1,36)= 0.41, p= 0.52$ ) ; R2 (MLM,  $F(1,36)= 1.18, p= 0.28$ ) (voir *annexe 20*).

L'interaction **Groupe\*Stade** exprime une tendance (MLM,  $F(3,121.66) = 2.65, p = 0.052$ ), il est possible que le groupe CORT ait une glycémie légèrement plus élevée au stade J6 (Fig. 34).

### 5.1.3. Lactate

Nous n'avons **pas détecté d'effets significatifs** sur les concentrations de lactate en fonction du traitement, du stade ou du sexe (Diag. 2 ; voir *annexe 21*).

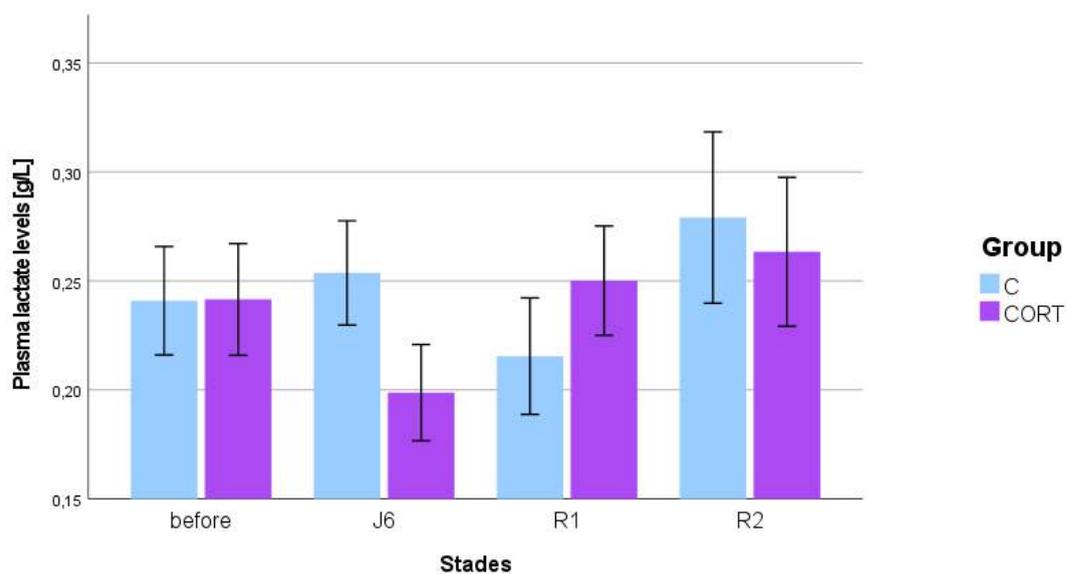


Diagramme 2 : Concentration moyenne de lactate en g/L en fonction du stade et des groupes.

### 5.1.4. Triglycérides

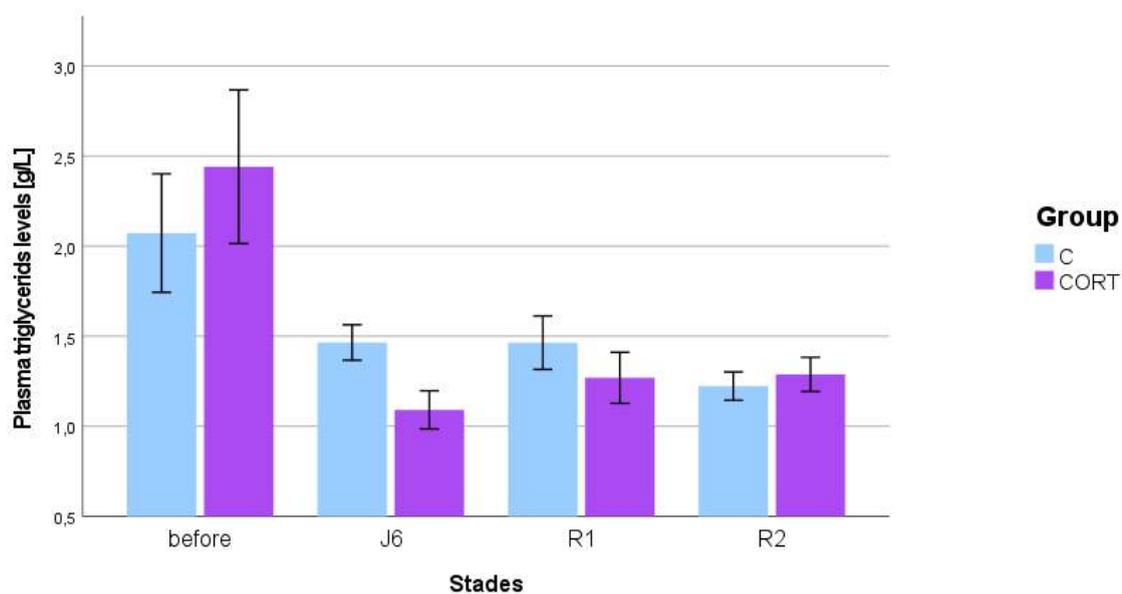


Diagramme 3 : Concentration moyenne de triglycérides en g/L en fonction du stade et du groupe.

Les taux de triglycérides n'ont pas été influencés par de hauts niveaux de corticostérone (Diag. 3).

Cependant, il y a une interaction **Sexe\*Stade** (MLM,  $F(3,119)= 23.47, p<0.001$ ) pour les concentrations en triglycérides (voir *annexe 22*).

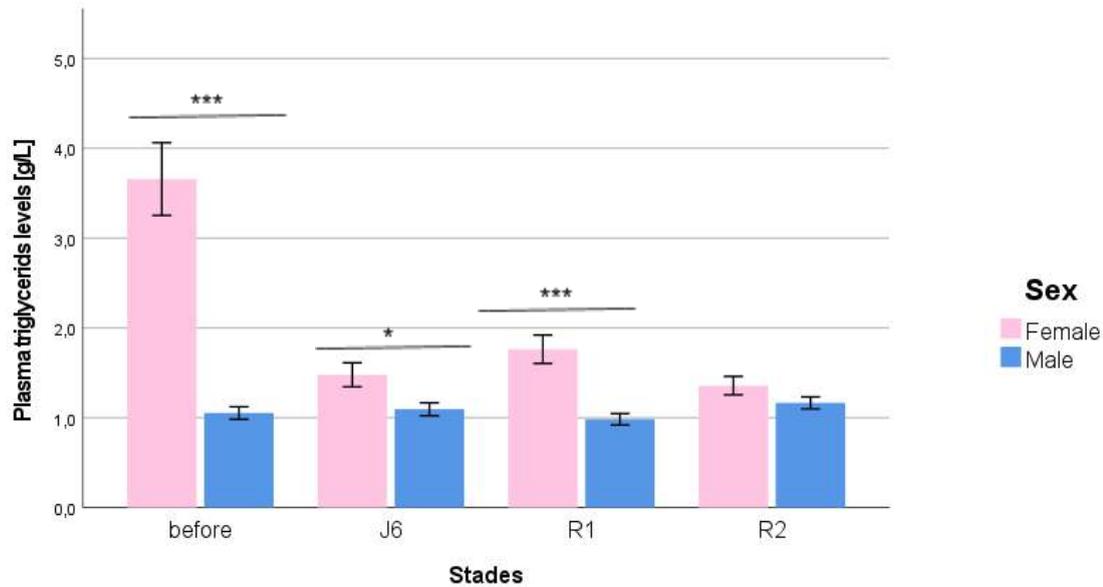


Diagramme 4 : Concentration moyenne de triglycérides en g/L en fonction du stade et du sexe.

En effet, les trois premier stades soit le stade pré-implantatoire “**Before**” (MLM,  $F(1,40)= 38.85, p<0.001$ ), **J6** (MLM,  $F(1,39)= 5.49, p= 0.024$ ), **R1** (MLM,  $F(1,38)= 20.33, p<0.001$ ) sont responsables de l’interaction **Sexe\*Stade** avec des valeurs significativement plus élevées pour les femelles (voir *annexe 22*). Cette différence est notamment très marquée au stade “Before” avec  $3.58 \pm 0.29$  g/L pour les femelles contre  $1.08 \pm 0.27$  g/L pour les mâles (Diag. 4 ; Tab. 7).

Le stade R2 ne montre pas d’interaction pour le facteur sexe (MLM,  $F(1,32)= 3.12, p= 0.09$ ).

### 5.1.5. Acide urique

Les valeurs de concentration plasmatique en acide urique sont significativement différentes selon le **groupe** (MLM,  $F(1,155)= 5.04$ ,  $p= 0.026$ ), avec des valeurs moyennes de  $0.035\pm 0.004$  g/L pour le groupe témoin C et  $0.040\pm 0.004$  g/L pour le groupe implanté CORT montrant ainsi une influence du traitement en corticostéroïde (*annexe 23*).

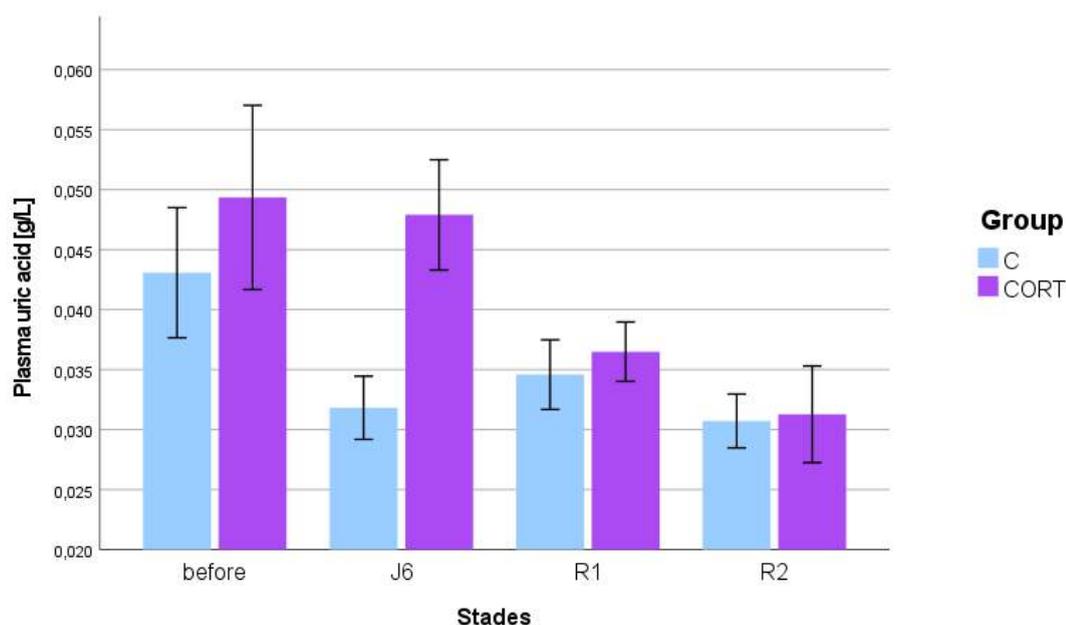


Diagramme 5 : Concentration moyenne d'acide urique en g/L en fonction du stade et des groupes.

Malgré un pic d'acide urique au stade J6 pour le groupe CORT, nous n'avons pas pu montrer d'interaction **Groupe\*Stade** (MLM,  $F(1,154)=2.03$ ,  $p=0.112$ ) ; (Diag. 5).

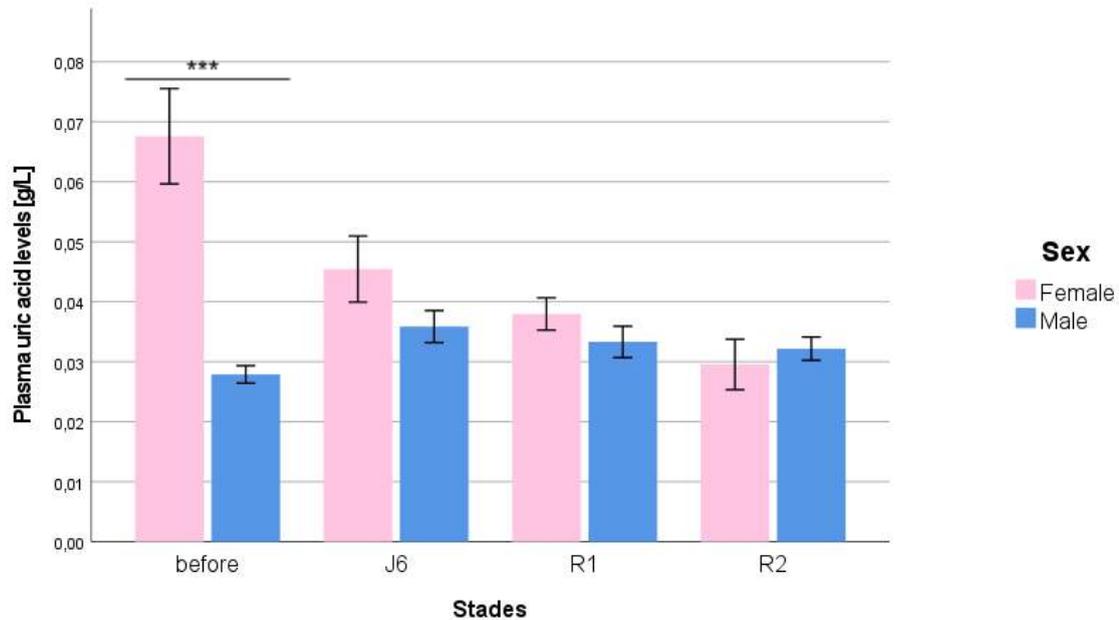


Diagramme 6 : Concentration moyenne d'acide urique en g/L en fonction du sexe et des stades

On constate une interaction **Stade\*Sexe** (MLM,  $F(3,154)= 13.86, p<0.001$ ), qui est due au stade **Before** (MLM,  $F(1,40)= 25.66, p<0.001$ ) : les femelles ont une concentration en acide urique moyenne de  $0.07 \pm 0.01$  g/L, tandis que les mâles ont une moyenne de  $0.03 \pm 0.01$  g/L (Diag. 6). Les autres stades ne sont pas significatifs pour cette interaction : J6, est proche du seuil de significativité (MLM,  $F(1,37)= 3.73, p= 0.061$ ) ; R1 (MLM,  $F(1,37)= 2.02, p= 0.16$ ) ; R2 (MLM,  $F(1,31)= 0.37, p= 0.55$ ) ; voir *annexe 23*.

## 5.2. Biomarqueurs du stress oxydant

### 5.2.1. Les antioxydants

#### 5.2.1.1. OXY test : capacité antioxydante non enzymatique du plasma

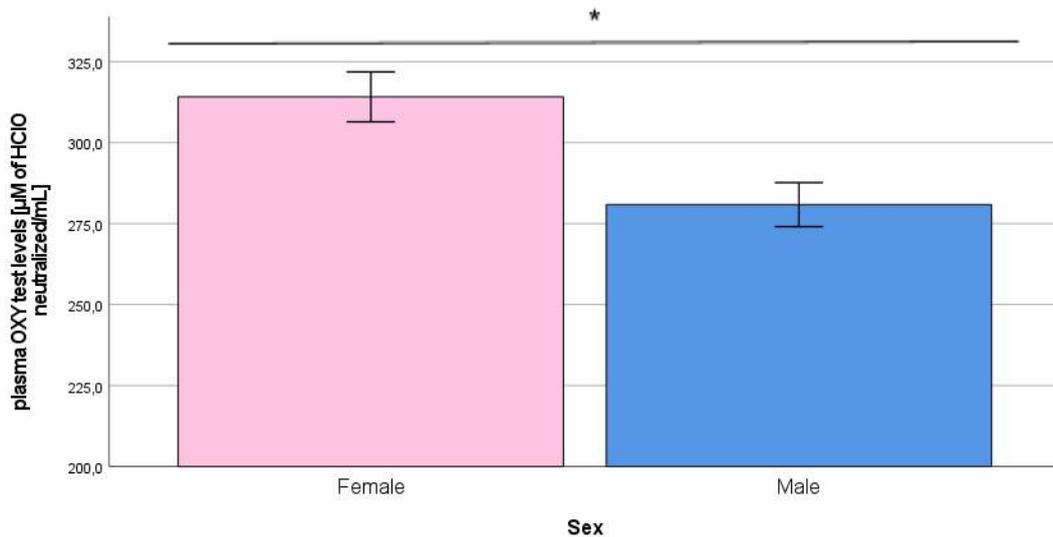


Diagramme 7 : Valeurs de l'OXY test en fonction du sexe.

Nous n'avons **pas détecté ni d'effet du traitement à la corticostérone ni d'effets du stade** pour les valeurs de l'OXY, les taux restent très constants entre les stades et les groupes (voir *annexe 24*).

Un effet **sexe** est présent (MLM,  $F(1,46) = 6.08$ ,  $p = 0.017$ ), les **femelles** ont une capacité antioxydante totale du plasma plus élevée que les mâles avec une moyenne à  $318.30 \pm 19.44$  micromoles de HClO neutralisés/mL contre  $283.39 \pm 19.08$  micromoles de HClO neutralisés/mL pour les mâles (Diag. 7).

### 5.2.1.2. Superoxyde dismutase

Il n'y a pas de résultats significatifs concernant la concentration en SOD selon le traitement, le sexe ou le stade (voir *annexe 25*).

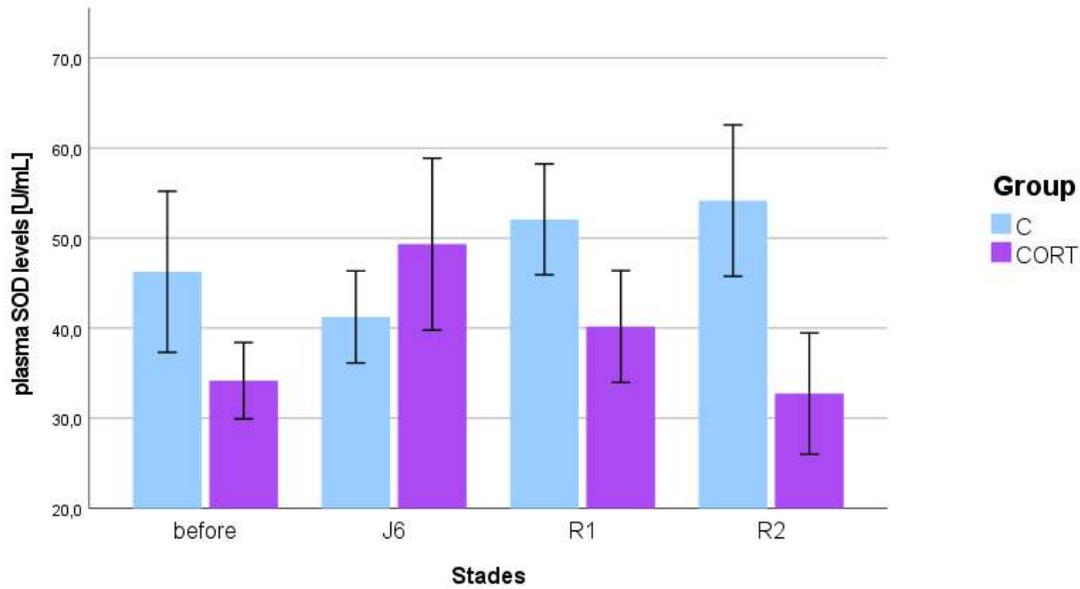


Diagramme 8 : Moyenne des concentrations en SOD en fonction du stade et des groupes.

Les résultats de la SOD montrent une **grande variabilité** comme en témoignent les larges barres d'erreurs (Diag. 8).

### 5.2.1.3. Glutathione peroxydase

Il y a une significativité de la covariable **BCA** pour les valeurs de la GPx (MLM,  $F(1,139)= 88.72, p<0.001$ ), mais nous n'observons aucun effet significatif du stade, du sexe ou du groupe (voir *annexe 26*).

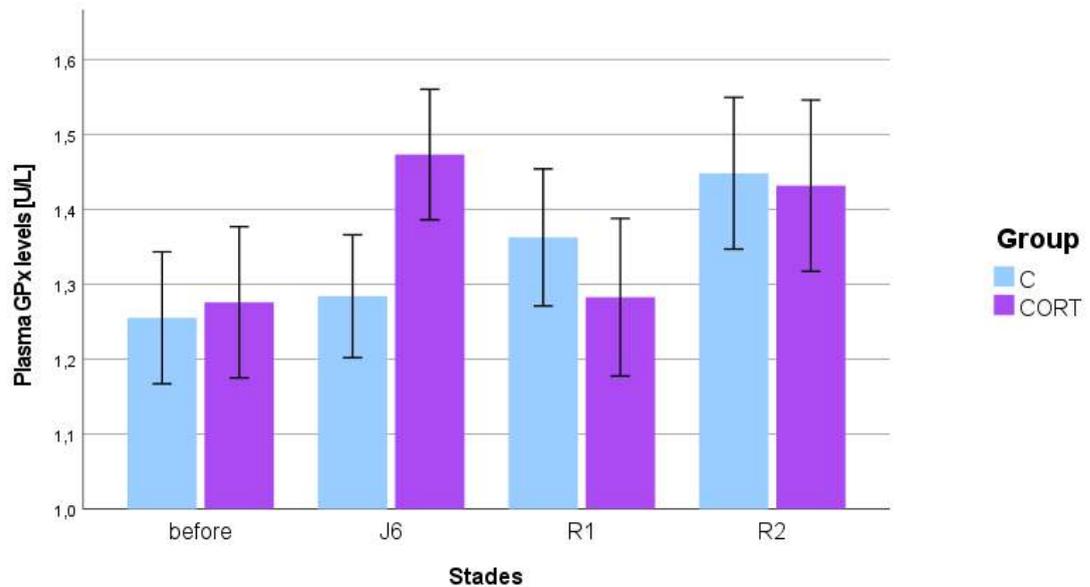


Diagramme 9 : Moyenne des concentrations en GPx en fonction du stade et des groupes.

Graphiquement, on observe un taux de GPx plus élevé pour le groupe CORT au stade J6 sans qu'il soit significativement différent du groupe C (Diag. 9).

## 5.2.2. Marqueurs de l'oxydation

### 5.2.2.1. dROMs : métabolites réactifs de l'oxygène

Le **stade** (MLM,  $F(3,110)= 9.03, p<0.001$ ) influence significativement les valeurs de dROMs (voir *annexe 27*).

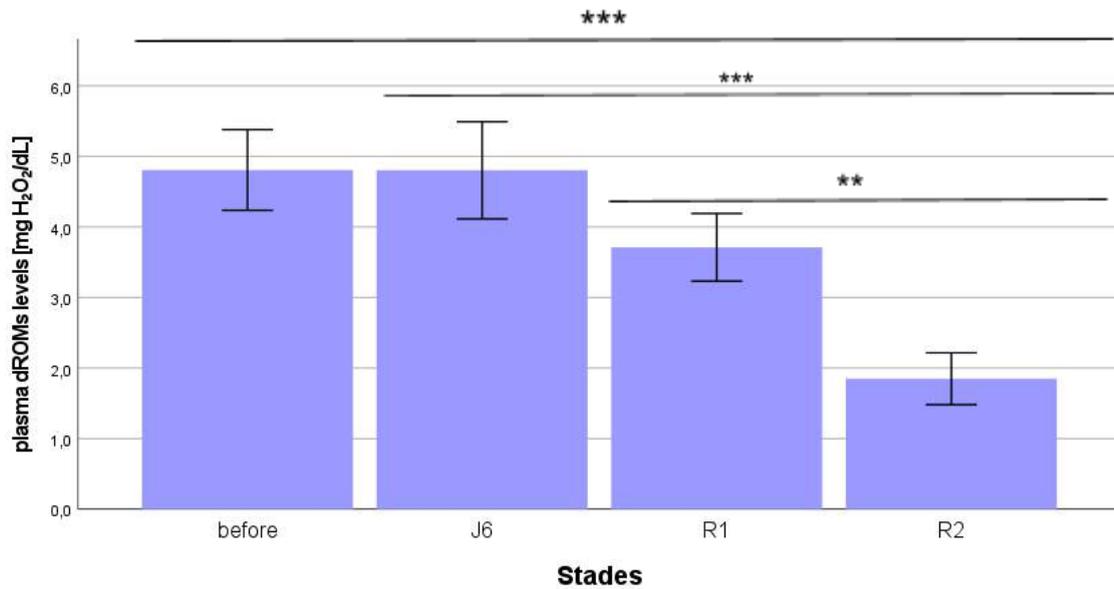


Diagramme 10 : Moyenne de dROMs en fonction du stade.

Les stades Before et J6 ( $p= 0.80$ ) sont équivalents et le stade R2 est significativement différent des stades Before, J6, R1 ( $p<0.001, p<0.001, p=0.005$ ) ; (Diag. 10).

### 5.2.2.2. Dégâts de l'ADN : 8-OHdG

En raison d'un manque de données, les valeurs concernant le stade Before n'ont **pas été prises en compte** dans le modèle pour ces deux mesures de 8-OHdG.

#### 5.2.2.2.1. Matrice ADN : dégâts non réparés

Nous n'avons pas détecté de **différences significatives** entre les traitements, les stades et les sexes dans les taux de 8-OHdG sur matrice ADN (*annexe 28*).

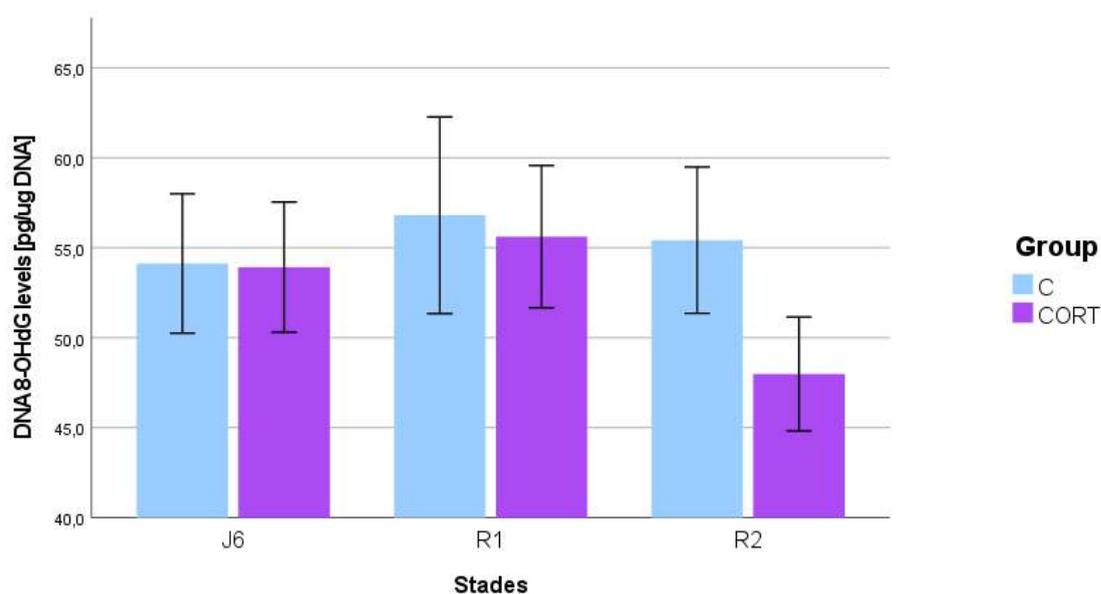


Diagramme 11 : Moyenne des concentrations en 8-OHdG en pg/ug ADN en fonction du stade et des groupes.

### 5.2.2.2.2. Matrice plasma : dégâts réparés

On observe une différence significative de la concentration plasmatique en 8-OHdG en fonction de la **note d'hémolyse** (MLM,  $F(1,100)= 4.86, p= 0.030$ ) (*annexe 29*).

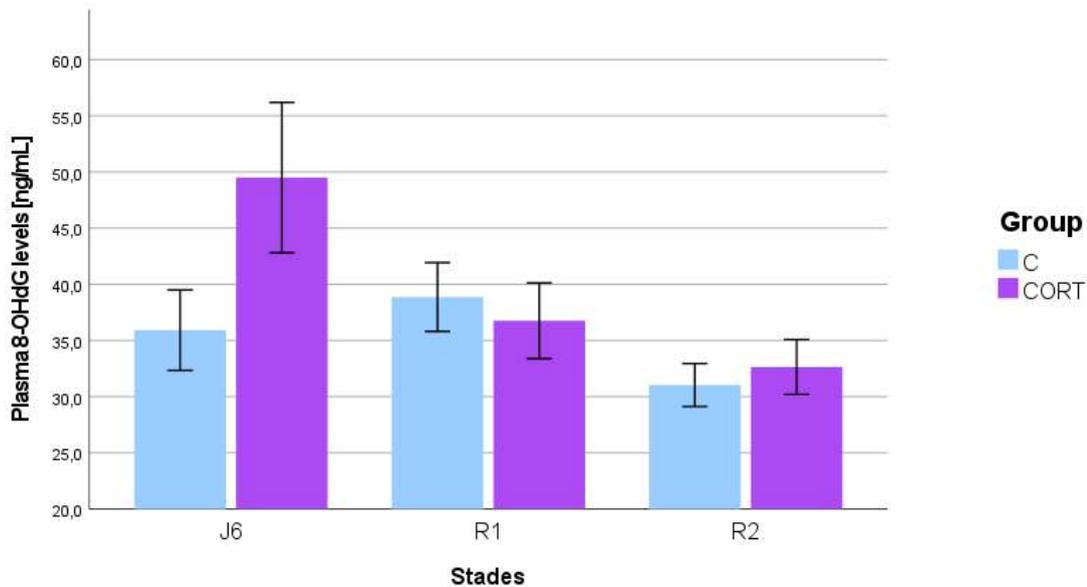


Diagramme 12 : Moyenne des concentrations en 8-OHdG avec matrice plasma en fonction du stade et des groupes.

On observe également, une interaction significative **Stade\*Groupe** (MLM,  $F(2,69)= 3.46, p= 0.030$ ). En effet, au stade **J6** (MLM,  $F(1,37)= 3.1, p= 0.09$ ) on observe une valeur moyenne de 8-OHdG de  $49.2 \pm 5.35$  ng/mL pour le groupe CORT contre  $35.93 \pm 5.38$  ng/mL pour le groupe C, qui semble indiquer la provenance de l'interaction (R1 : MLM,  $F(1,36)= 0.06, p= 0.81$  ; R2 : MLM,  $F(1,35)= 0.55, p= 0.46$ ) (Diag. 12, *annexe 29*).

### 5.2.2.3. ADN mitochondrial : nombre de copies

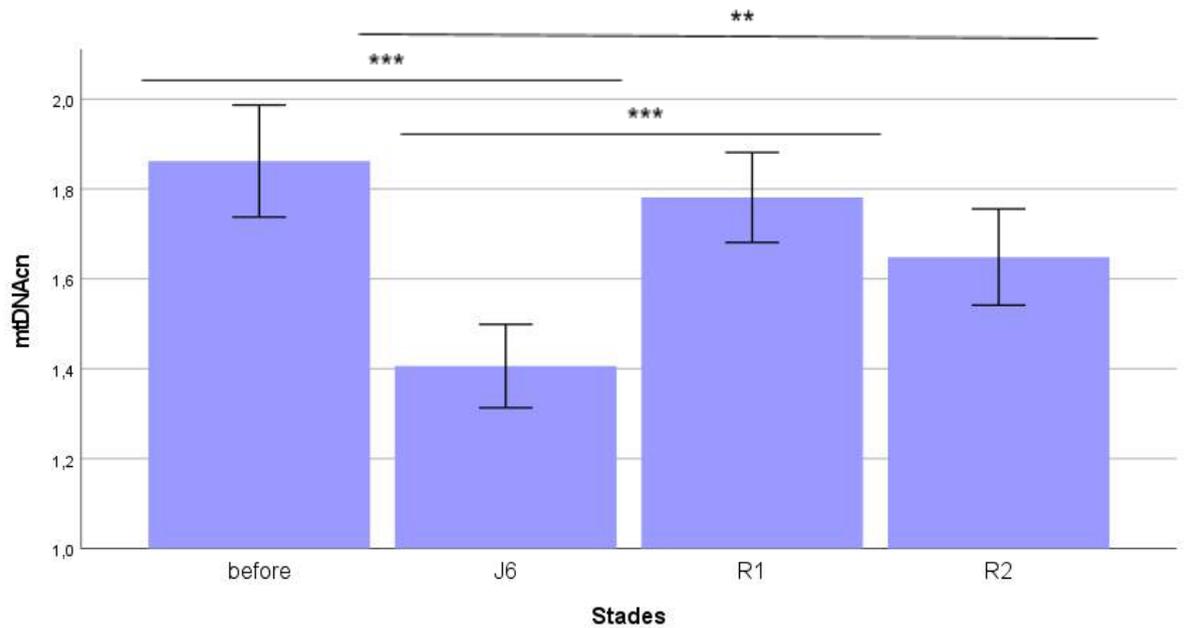
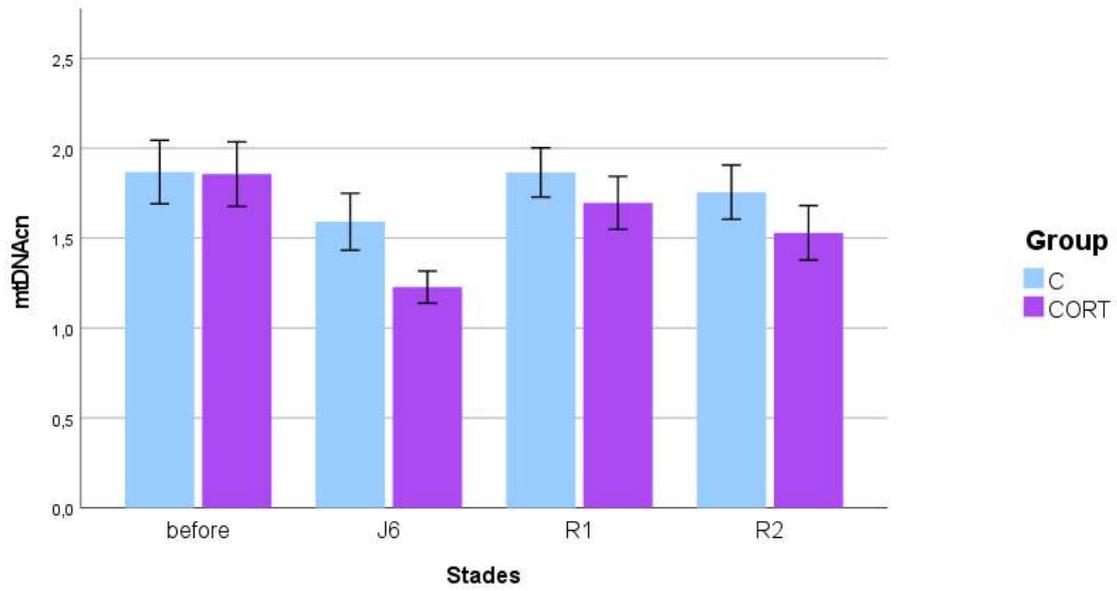


Diagramme 13 : Moyenne du nombre de copies d'ADN mitochondrial en fonction du stade.

Il y a une différence significative entre les **stades** (MLM,  $F(3,102) = 7.13$ ,  $p < 0.001$ ) pour le nombre de copies d'ADN mitochondrial, avec le stade **J6** :  $1.41 \pm 0.1$  mtDNAcn, significativement différent de Before ( $1.83 \pm 0.1$  ;  $p < 0.001$ ), R1 ( $1.77 \pm 0.1$  ;  $p < 0.001$ ) et R2 ( $1.69 \pm 0.1$  ;  $p = 0.009$ ) ; (Diag. 13 ; annexe 30).



*Diagramme 14 : Moyenne du nombre de copies d'ADN mitochondrial en fonction du stade et du groupe.*

Il n'y a, cependant, pas d'interactions significatives entre stades et groupes (Diag. 14).

#### 5.2.2.4. Raccourcissement des télomères

La longueur des télomères n'est **pas influencée** par le groupe, le stade ou le sexe des individus (voir *annexe 31*).

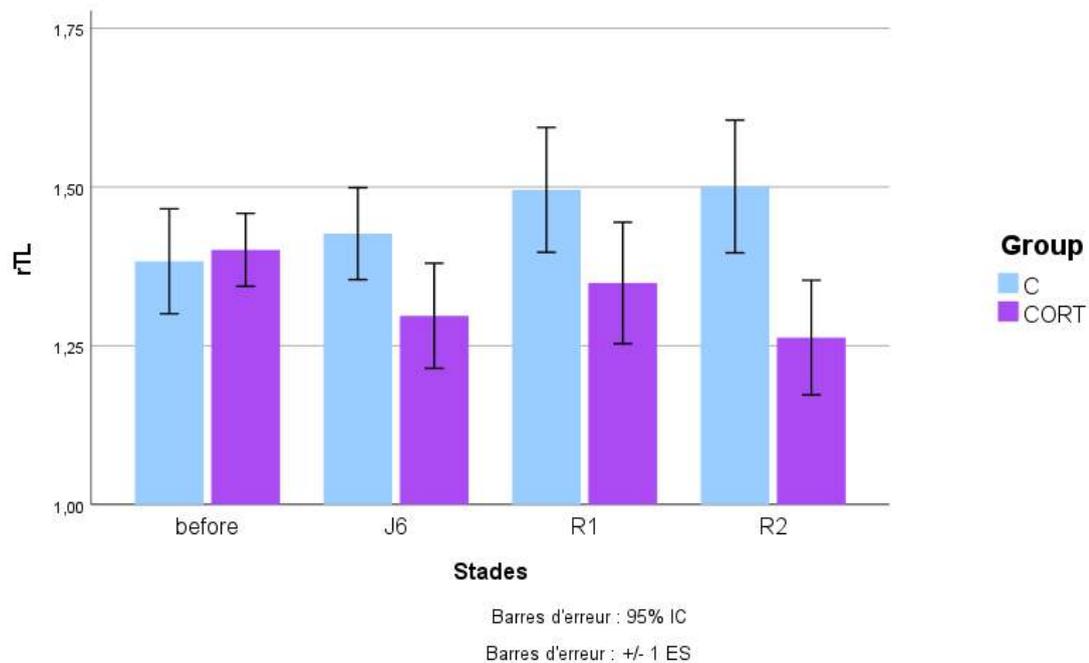


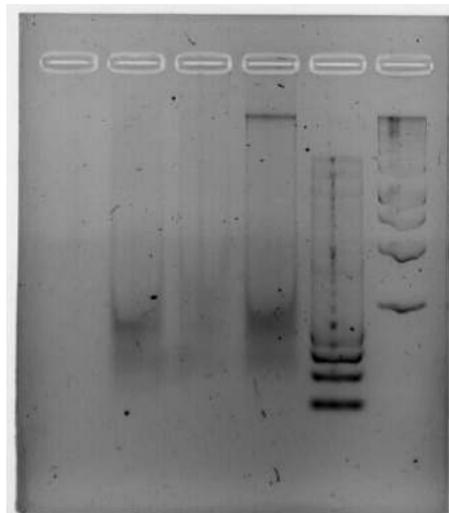
Diagramme 15 : Moyenne des longueurs relatives des télomères en fonction du stade et des groupes.

Sans être significatif, on observe graphiquement le raccourcissement après l'implantation pour le groupe CORT. Au stade R2, le groupe CORT a des télomères environ 16 % plus courts que le groupe contrôle (Diag. 15).

### 5.3. Tentatives expérimentales

Deux autres expérimentations ont été tentées dans cette thèse. Tout d'abord une mesure du glutathion (GSH) et du glutathion oxydé afin de compléter les connaissances sur la présence d'antioxydants (sous forme "classique" et sous forme "utilisée"). Nous avons utilisé le DetectX<sup>®</sup> Glutathione Fluorescent Detection Kit (K006-F5) de chez Arbor Assays et le spectrofluorimètre Xenius safas monaco.

Le glutathion est un antioxydant majeur et présent en grande quantité qui a potentiellement son rôle à jouer dans la capture des ROS lors de stress. Nous avons eu des difficultés au niveau de la lecture au spectrophotomètre à fluorescence. Des suspicions de contamination par l'eau utilisée sont aussi très probables. Malheureusement, la quantité de kit n'était pas suffisante pour effectuer d'autres mesures. Ce serait donc un point à préciser dans la suite de l'étude pour compléter la vision globale des capacités antioxydantes des individus étudiés.



*Fig. 35 : Gel d'électrophorèse après extraction ARN : les 3 premières bandes visibles sont l'ARN extrait, il semble totalement digéré. Les 2 bandes définies à droite sont les ladders.*

Dans le but d'effectuer des analyses d'expression de gènes, des extractions d'ARN selon deux méthodes ont été effectuées sans succès.

Une fois extraits, les éluats d'ARN ont été vérifiés au Nanodrop (Spectrophotomètre UV ; quantification et mesure de la pureté) et au Qubit (Fluorimétrie ; plus sensible et spécifique) puis avec une électrophorèse sur gel d'agarose (intégrité de l'ARN).

Que les échantillons aient été conservés dans du "RNAlater" (une solution conçue pour stabiliser l'ARN pour des manipulations ultérieures) ou non, les ARN extraits étaient dégradés/fragmentés, ce qui ne permet pas de quantifier l'expression génique des gènes d'intérêts que nous avons envisagé :

- Nr3c1 : code pour le récepteur aux glucocorticoïdes ;
- Nr3c2 : code pour le récepteur aux minéralocorticoïdes ;
- NRF2 : est un facteur de transcription nucléaire qui se lie à l'élément de réponse antioxydant et active des gènes détoxifiants / défensifs ;
- TERF1/2 : code des protéines spécifiques des télomères qui fonctionnent comme des inhibiteurs de la télomérase.

Ces deux mesures expérimentales sont donc des pistes à exploiter afin de compléter la compréhension totale de l'augmentation expérimentale des taux de glucocorticoïdes chez le Manchot royal.

## **6. Discussion**

Bien que les Manchots royaux soient des oiseaux vivant dans un environnement stressant, ils semblent particulièrement résistants : ils montrent des mécanismes d'adaptation physiologiques, malgré des hauts niveaux de corticostérone, pour prévenir l'apparition de stress oxydant lors de stress aigu via des modifications de la réponse des antioxydants endogènes et de la mitochondrie (Stier *et al.* 2019). Nous avons repris l'hypothèse que le Manchot royal pourrait posséder des mécanismes de protection pour éviter ou limiter l'influence négative de l'exposition chronique à des niveaux élevés de glucocorticoïdes.

Nous avons étudié les réponses physiologiques de cette exposition à des niveaux de corticostérone élevée sur une durée de près 50-60 jours avec des prises de sang réalisées en amont de l'implantation, puis 3/28/56 jours après l'implantation chez des Manchots royaux adultes reproducteurs au stade d'incubation. Les mesures effectuées permettent d'étudier l'allocation des ressources, l'évolution des niveaux de glucocorticoïdes mais aussi le stress oxydant.

### ***Modification de l'axe corticotrope***

Nous avons commencé par vérifier l'efficacité des implants de corticostérone pour élever les taux de glucocorticoïdes sanguins. Comme prévu, trois jours après l'implantation en J6, les taux de corticostérone sont augmentés. Les individus du groupe **CORT** ont en moyenne **deux fois plus** de corticostérone sanguine que le groupe témoin. Ceci confirme l'efficacité des implants de corticostérone, comme déjà montrés dans des études antérieures (Müller *et al.* 2009 ; KS Stier *et al.* 2009 ; Almasi *et al.* 2012 ; Vágási *et al.* 2018) et chez le poussin du Manchot royal (Garcin et Stier 2020).

Pour les autres stades, avant implantation, 28 et 56 jours après implantation, les groupes CORT et C ne présentent pas de différences significatives. Cela peut s'expliquer par un **rétrocontrôle négatif** de la corticostérone très efficace via l'hypothalamus, l'hypophyse et l'hippocampe qui régule les niveaux de l'hormone pour les faire revenir au seuil. Nous ne connaissons donc pas la durée exacte d'exposition à des forts taux de glucocorticoïdes. De plus, cette durée reste dans tous les cas relativement courte sur la durée de vie de l'animal. Notre méthode ici décrite ne permet que d'entrevoir les effets d'une exposition prolongée aux glucocorticoïdes.

De plus, l'avancée dans le cycle de reproduction peut influencer les taux de corticostérone et les réponses de l'organisme chez le Manchot royal : l'augmentation de corticostérone lors de stress aigu est atténuée lorsque l'on avance dans la durée du stade d'incubation (Viblanç *et al.* 2016) ; l'augmentation du rythme cardiaque lors d'un stress aigu est aussi atténuée au cours de l'avancée de la reproduction (Viblanç *et al.* 2018).

Par ailleurs, peut-être existe-t-il un mécanisme d'adaptation à l'environnement lors de l'avancée de l'incubation sur terre, c'est-à-dire se trouver en situation d'**homéostasie réactive** voire même d'**homéostasie prédictive** lors des alternances terre-mer ?

Autrement dit, que les individus auraient naturellement un taux de corticostérone plus élevé lors de l'arrivée sur terre du fait des stress évoqués en partie I, et que progressivement un mécanisme d'adaptation aurait lieu avec une régulation négative des taux de corticostérone.

Les mesures de corticostérone réalisées ne sont pas actuellement en faveur de cette hypothèse. En effet, les mesures de Before, R1 et R2 ne sont pas significativement différentes.

## ***Réponse métabolique au stress chronique***

### ***Glucose***

Un pic de glycémie du groupe **CORT** est observé à **J6** avec une tendance statistique ( $p=0.052$ ), ce qui peut être mis en parallèle du pic de corticostérone observé au même stade.

Il faut garder en tête que, lors d'un stress, les premiers médiateurs sont les catécholamines qui augmentent rapidement la glycémie ; dans un second temps, les glucocorticoïdes agissent pour mobiliser les glucides, les lipides et les protéines (Sapolsky *et al.* 2000).

Logiquement, ici, le pic significatif de corticostérone à J6 pourrait nous montrer une probable influence de l'hormone sur les glucides. Cependant, il faut garder en tête que les catécholamines sont les premières hormones à faire élever les taux de glucose sanguin.

A J6, les **mâles** montrent une glycémie significativement plus élevée que les femelles (1.713 g/L contre 1.572 g/L). A J6, les femelles ont une glycémie plus basse que pour leurs autres mesures. On peut supposer que les femelles ont une réaction plus rapide à l'élévation de corticostérone et qu'elles ont déjà subi le pic de glycémie et régulé avant notre mesure à J6. On peut aussi suggérer que la corticostérone n'agit pas exactement sur les mêmes réserves selon le sexe lors du jeûne, car il se peut que les stocks énergétiques des animaux ne soient pas les mêmes selon le sexe.

Dans l'étude, l'effet sexe est confondu avec les cycles d'incubations

### ***Lactate***

Le lactate est un produit de dégradation du glucose qui reflète une glycolyse anaérobie. Sa libération est stimulée principalement par les catécholamines. Les taux de lactate n'ont **pas montré de variations significatives ici**.

Dans notre expérience, on observe graphiquement une baisse au stade J6 pour le groupe CORT. On pourrait poser l'hypothèse que cette baisse, si elle est confirmée par d'autres études, est liée à une diminution du métabolisme anaérobie, qui reste très peu efficace pour produire de l'ATP.

Le lactate est un composé jouant un rôle dans la régulation métabolique. Cette molécule de signalment entre en ligne de compte lors des réponses immunitaires et inflammatoires, de l'angiogenèse et de la fibrose entre autres (Certo *et al.* 2022). On peut donc supposer que cette baisse pourrait être le témoin d'un changement métabolique au niveau de la production d'énergie mais aussi plus largement qu'elle participe à une régulation à grande échelle du métabolisme de l'organisme grâce à son rôle de molécule de signal. Cette hypothèse reste donc à prouver.

## ***Triglycérides***

Le traitement en corticostérone n'a **pas influencé** la mobilisation des réserves énergétiques en triglycérides lors de nos mesures malgré la capacité connue des glucocorticoïdes pour mobiliser les réserves lipidiques (Munck *et al.* 1984 ; Sapolsky *et al.* 2000). Une mesure des acides gras non estérifiés pourrait être pertinente pour obtenir une idée de la mobilisation des triglycérides contenus dans le tissu adipeux.

Cependant, concernant le critère "sexe", les trois premières mesures soit pré-implantation "**Before**" ( $p < 0.001$ ), **J6** ( $p = 0.024$ ), **R1** ( $p < 0.001$ ), montrent que les **femelles** ont des taux de triglycérides sanguins plus élevés que les mâles. Cette différence est très marquée avant les implantations (Before).

Cela pourrait signifier que les femelles utilisent plus rapidement et en majorité les lipides comme substrat énergétique lors des phases de jeûne à terre dès 3 jours de jeûne, c'est-à-dire qu'elles débuteraient la phase II du jeûne plus tôt que les mâles.

Les individus plus gras au début du jeûne utilisent plus de lipides pendant la phase II que les individus moins gras (Cherel et Groscolas 1999), mais les femelles sont-elles plus grasses ? Dans le règne animal, c'est généralement le cas. Il faudrait mesurer des notes d'état corporel sur les deux sexes afin d'évaluer les compositions corporelles.

Des différences de stratégies de pêche sont connues chez le Manchot royal. Il se trouve que les mâles prennent plus de poids que les femelles lors d'un voyage alimentaire, ce qui pourrait influencer les stocks énergétiques (Le Vaillant *et al.* 2013). Les femelles pourraient donc utiliser les lipides plus rapidement car leurs réserves glucidiques seraient moindres et donc consommées plus rapidement mais également car leurs réserves lipidiques pourraient sûrement être plus conséquentes.

## ***Acide urique***

Le groupe **CORT** montre un taux d'acide urique plus élevé que le groupe C ( $p = 0.026$ ) or il semblerait que la corticostérone contrôle l'allocation des protéines vers la production d'énergie (Cherel *et al.* 1988). Lors de stress aigu, il a été montré la présence d'un catabolisme protéique plus intense chez les individus ayant un fort taux de corticostérone (Viblanç *et al.* 2018).

A ce jour, il n'y a pas d'interaction connue entre le groupe et le stade bien que le groupe CORT montre un taux 52% plus élevé au à **J6** comparé aux autres mesures.

Bien que le lien entre taux de corticostérone et taux d'acide urique ne soit pas confirmé, il existe un lien entre l'implant de corticostérone et le taux d'acide urique. On peut ici suggérer qu'il existe un lien entre taux de corticostérone et taux d'acide urique mais que la taille de l'effectif de notre étude échoue à montrer une significativité.

A la mesure **Before** ( $p < 0.001$ ), les **femelles** ont une concentration en acide urique de 0.068 g/L contre 0.027 g/L pour les mâles, montrant un catabolisme protéique significativement plus marqué chez les femelles avant implantation. Or normalement, les protéines sont plus utilisées en fin de jeûne lors de la dernière phase, la phase III, lorsque les réserves lipidiques ont été largement consommées (Groscolas et Robin 2001).

Il n'y a actuellement pas d'études ayant porté sur les différences de composition corporelle lors de la phase d'incubation et les différentes phases du jeûne en fonction du sexe.

De plus, il faut rester prudent sur l'interprétation de ce résultat, s'agit-il d'un effet sexe ou d'un effet du stade? Nos deux effets sont confondus dans cette analyse statistique.

La réponse métabolique montre globalement peu de modifications à l'exposition à de forts taux de glucocorticoïdes à court terme. Au stade J6, stade où le taux de corticostérone connaît un pic significatif, sans être significatives, les valeurs de la glycémie et de l'acide urique du groupe CORT sont supérieures à celles du groupe C. Cela pourrait suggérer une action des glucocorticoïdes sur la libération d'énergie par les glucides et les protéines, ce qui a déjà été montré chez le Manchot royal lors de stress aigu (Viblanç *et al.* 2018).

Un lien entre le groupe CORT et le taux d'acide urique a été mis en évidence, la corticostérone a un effet protéolytique connu mais nous n'avons pas pu établir de lien entre la concentration en corticostérone et la concentration en acide urique.

Concernant le facteur sexe, à la mesure "Before", donc sans action des implants de corticostérone, les femelles ont des taux significativement supérieurs de triglycérides et d'acide urique comme lors des phases II/III du jeûne (Cherel *et al.* 1988).

Il existe probablement des différences entre sexe sur la composition des réserves énergétiques, sur les mécanismes de régulation endocrine et sur la sensibilité à la corticostérone comme c'est le cas chez les humains (Mittendorfer 2005 ; Mauvais-Jarvis 2015 ; Haymond *et al.* 1982). Les métabolismes glucidiques et lipidiques montrent, lors de jeûne, une baisse plus rapide de la glycémie et une augmentation plus rapide des taux d'acides gras libres et  $\beta$ -OH sanguin chez la femme (Merimee *et al.* 1978 ; Haymond *et al.* 1982).

Au contraire, au stade J6, les mâles ont une glycémie significativement plus élevée que les femelles. Cela pourrait témoigner d'une différence de métabolisme entre mâles et femelles lors de la première rotation après rupture du jeûne ; les prélèvements ont lieu lors du premier jeûne post-ponte pour la femelle tandis qu'ils surviennent au second jeûne post-ponte pour le mâle. Après la ponte, le mâle a donc jeûné un mois avant d'être relayé par la femelle qui, elle, aura jeûné une quinzaine de jours. Bien que l'on effectue les prises de sang après chaque première rupture du jeûne, le mâle aura nécessairement perdu plus de masse que la femelle.

## Réponse du stress oxydant au stress chronique

### Antioxydants

#### *OXY (antioxydant non enzymatique)*

Le traitement CORT **n'influence pas** la capacité antioxydante non enzymatique totale du plasma. Dans l'étude de Stier *et al.* (2019), le stress aigu induit une diminution du taux d'OXY plasmatique ; cependant, il n'y a pas de corrélation prouvée entre le niveau de corticostérone basale et OXY plasmatique, ce qui est également le cas dans notre étude.

Les femelles montrent une capacité antioxydante totale du plasma **supérieure** à celle des mâles ( $p=0.017$ ), ce qui n'avait pas été détecté lors d'un stress aigu par Stier *et al.* (2019).

#### *SOD et GPx (Antioxydants enzymatiques)*

Les deux enzymes antioxydantes testées ne montrent **pas de variations significatives** selon les groupes, les stades et les sexes.

Dans l'étude de Stier *et al.* (2019), la GPx et la SOD (sur globules rouges : GR) augmentent en réponse à un stress aigu. De plus, la GPx est positivement corrélée à la corticostérone basale. Lors de stress chronique chez le poussin du Manchot royal, la GPx (GR) n'a pas montré de variation suivant le niveau de corticostérone basale (Garcin et Stier 2020).

Cependant, pour compléter les mesures sur les antioxydants, le glutathion sous sa forme GSH, GSSG ainsi que le rapport GSSG/tGSH seraient à tester du fait de son important pouvoir antioxydant qui peut jouer un rôle capital dans la balance du stress oxydant.

## Dégâts oxydatifs

### *dROMs marqueur précoce*

Le traitement CORT **n'influence pas** la production de dROMs bien qu'il soit supposé que l'exposition prolongée à de forts taux de glucocorticoïdes pourrait causer du stress oxydatif (Costantini *et al.* 2011). Cependant dans cette espèce, il est suggéré que la production de ROS mitochondriale est réduite lors d'une corticostéronémie basale augmentée (Stier *et al.* 2019). Dans cette même étude, les taux de dROMs n'augmentent pas en regard de l'élévation de corticostérone lors de stress aigu.

Quel que soit le groupe, la mesure R2 montre des taux de ROS significativement plus bas que le reste des mesures. Cela pourrait témoigner d'une acclimatation progressive aux séjours successifs à terre. En effet, l'arrivée à la colonie en début de cycle reproductif est un événement stressant : installation sur le territoire, forte densité de population, conflits entre individus mais aussi début des alternances de jeûne, pression des prédateurs terrestres, pression parasitaire... on peut donc suggérer qu'il y a une adaptation comportementale et métabolique à la vie en colonie qui se fait progressivement suivant l'avancée du cycle de reproduction. Cependant, il faut garder en tête que l'effet sexe est toujours présent dans cette analyse et pourrait faire varier les résultats.

### **8-OHdG**

Le 8-OHdG, est un produit des dommages oxydatifs à l'ADN reflétant le stress oxydatif dans l'ensemble du corps et qui est influencé par les taux de dommages et de réparation de l'ADN.

Le 8-OHdG dans l'ADN représentatif des dégâts oxydants non réparés ne montre **pas de différences significatives** pour le groupe, le stade ou le sexe.

Dans le plasma, le marqueur 8-OHdG montre une **interaction significative entre le groupe et le stade**. Cependant l'analyse statistique ne nous permet pas de mettre en évidence le(s) stade(s) responsables de l'interaction. On observe à la mesure J6, une valeur plus élevée pour le groupe CORT, ce qui pourrait témoigner d'une augmentation des réparations de l'ADN à ce stade. C'est-à-dire qu'il y aurait eu des dommages oxydant de l'ADN réparés possiblement en relation avec les hauts niveaux de corticostérone. Toutefois, l'étude ne nous permet pas de conclure.

Stier *et al.* (2019) montre chez le Manchot royal, un taux de 8-OHdG plasmatique augmenté lors de stress aigu mais sans corrélation avec l'augmentation de corticostérone basale. Tandis que dans l'étude de Garcin et Stier (2020), il n'y avait pas eu d'impact des implants de corticostérone sur le 8-OHdG plasmatique.

### ***ADNmt***

Il y a une différence significative de densité mitochondriale entre les **stades** ( $p < 0.001$ ), avec une valeur plus basse au J6. Il n'y a **pas de significativité au niveau des groupes**.

Les mitochondries possèdent des récepteurs à la corticostérone (Psarra et Sekeris 2008) et sont de plus en plus suggérées comme un lien central entre le système endocrinien et le métabolisme (Picard *et al.* 2014). Les glucocorticoïdes sont des régulateurs du métabolisme énergétique ayant un rôle lors de stress (Sapolsky *et al.* 2020) et leur rôle primaire est de réguler l'homéostasie énergétique de l'individu (MacDougall-Shackleton *et al.* 2022).

Ainsi, des niveaux élevés de corticostérone peuvent être un signal de déséquilibre énergétique en favorisant la mobilisation énergétique dans un premier temps puis l'économie des réserves dans un second temps. Ces économies d'énergie pourraient aboutir à une réduction de la densité mitochondriale.

On pourrait s'attendre à ce qu'une élévation chronique des niveaux de corticostérone engendre dans un premier temps un métabolisme plus élevé avec de fortes demandes énergétiques entraînant ainsi une densité mitochondriale plus élevée et dans un second temps, une économie d'énergie et une baisse de la densité mitochondriale ; d'un autre côté, de forts taux de ROS engendrent des dégâts oxydatifs sur les mitochondries et peuvent donc les impacter (Lee *et al.* 2004). Cependant, aucune de ces hypothèses n'est encore prouvée.

Chez les oisillons de Mésange charbonnière, les mitochondries sont impactées par des apports de corticostérone in ovo et lors des premiers stades de vie, avec une baisse de la densité mitochondriale (Casagrande *et al.* 2020 ; Cossin-Sevrin *et al.* 2022).

Lors de l'étude de Garcin et Stier (2020) sur les poussins du Manchot royal, la densité mitochondriale n'avait pas été impactée par les implants de corticostérone similaires aux nôtres.

Ici, la baisse de la densité mitochondriale des deux groupes peut nous suggérer deux effets : un effet du jeûne sur les deux groupes mais aussi un effet de la corticostérone sur le groupe traité au vu des valeurs de densité mitochondriale plus basses. Cet effet "CORT" pourrait être expliqué par une régulation négative du métabolisme suite à de forts taux de corticostérone.

### ***Téломères***

Le raccourcissement des téломères peut être accéléré par l'exposition chronique aux glucocorticoïdes (Reichert et Stier 2017, Casagrande *et al.* 2020), ce n'est cependant **pas significatif** dans notre étude sur le Manchot royal malgré une baisse des valeurs de longueur télomérique après implantation du groupe CORT. Des résultats similaires chez le poussin du Manchot royal ont été montrés (Garcin et Stier 2020).

Nous pouvons suggérer que l'exposition aux glucocorticoïdes n'est pas assez longue dans cette étude pour montrer un effet ; ou bien que s'il existe un effet de la corticostérone sur le raccourcissement des téломères, celui-ci est limité par des mécanismes de prévention ou de réparation. Une réparation de l'ADN est suggérée par nos résultats du 8-OHdG plasmatique.

Les différents marqueurs de stress oxydant nous indiquent que très peu de variations entre le groupe CORT et le groupe témoin malgré l'augmentation significative du taux de corticostérone pour le groupe CORT au stade J6.

Ainsi, les marqueurs pouvant montrer une mobilisation des antioxydants soit OXY (capacité antioxydante totale), SOD, GPx ne montrent aucunes variations en lien avec l'élévation des niveaux d'hormones glucocorticoïdes.

Le marqueur dROMs (reactive oxygen metabolites ; marqueur précoce) ne montre pas de variations entre les groupes, les manchots sous influence d'implants CORT ne produisent, a priori, pas plus de ROMS que des manchots normaux.

A contrario, les valeurs du 8-OHdG plasmatique marqueur des dommages oxydants réparés (donc excrétés dans le sang), montrent que les individus implantés CORT excrètent plus de 8-OHdG. Cela montre donc que les dégâts ont été réparés et ne sont plus présents dans l'ADN comme cela semble être le cas lors de stress aigu (Stier et al., 2019).

Au stade J6, le nombre de copies d'ADN mitochondrial est significativement plus bas pour les deux groupes. Une des hypothèses les plus probables de cette baisse de densité mitochondriale à J6 est un ajustement métabolique pour économiser de l'énergie.

Les télomères ne montrent pas de raccourcissement significatif ; à mettre en parallèle avec nos résultats de 8-OHdG plasmatique qui témoignent d'une réparation de l'ADN donc possiblement des télomères.

Notre étude suggère qu'une exposition chronique à des hauts niveaux de corticostérone pourrait impacter le métabolisme énergétique en augmentant la libération de glucose sanguin et le catabolisme protéique à court terme. Cette légère augmentation du métabolisme ne montre ici pas d'effet sur la densité mitochondriale car elle reste limitée (Lee *et al.* 2004).

Par ailleurs, cette étude suggère aussi que de tels taux de corticostérone n'impactent que très peu et de façon transitoire la balance du stress oxydant. D'une part, les métabolites réactifs de l'oxygène sont inchangés ainsi que le marqueur des dégâts oxydants de l'ADN (sur globules rouges), le 8-OHdG, qui ne montre pas d'altération de l'ADN.

D'autre part, le 8-OHdG plasmatique, de son côté, augmente transitoirement suggérant une réparation de l'ADN par expulsion des parties lésées. Il faut, de plus, garder en tête que les tissus et leur ADN réagissent différemment aux dégâts oxydants (Costantini *et al.* 2011).

Les antioxydants et la capacité antioxydante du plasma n'ont pas été influencée par le traitement CORT. Les mesures des antioxydants réalisées n'ont pas montré qu'ils étaient responsables de l'absence de dégâts oxydants. Toutefois, cette étude des antioxydants reste tronquée, il faudrait donc investiguer les variations du glutathion qui est un antioxydant majeur qui a montré qu'il pouvait y avoir une corrélation positive entre glutathion total (GR) et la corticostérone basale (Stier *et al.* 2019).

Notre étude suggère également que des forts niveaux de corticostérone n'impactent pas forcément le vieillissement cellulaire de manière forte bien que cela ait été montré dans d'autres études (Casagrande *et al.* 2020). Les Manchots royaux adultes n'ont ici pas montré d'altérations des télomères. Les poussins de Manchots royaux, eux aussi, n'avaient pas montré d'altérations des télomères à moyen terme après avoir reçu des implants de corticostérone (Garcin et Stier 2020).

Qui plus est, le stress oxydant, connu pour impacter les télomères (Casagrande *et al.* 2020), reste assez limité dans notre étude. On peut remettre en cause la durée limitée du stress chronique biologique induit par rapport à la longévité de l'animal. Autrement dit, nous n'ouvrons ici qu'une petite fenêtre sur le stress oxydant, ce qui nous limite fortement dans la vision à long terme de la gestion du "stress" chez le Manchot royal.

Tout ceci confirme notre hypothèse que le Manchot royal adulte possède des mécanismes d'adaptation pour alléger les coûts d'un stress chronique, sans que nous puissions, avec les mesures actuelles, mettre en évidence les mécanismes permettant d'éviter l'état de stress oxydant. Une suggestion pourrait aussi être de se pencher sur l'axe corticotrope en lui-même et sa régulation, notamment la rapidité de régulation. Le meilleur moyen de ne pas avoir de dégâts oxydants étant de limiter les niveaux de corticostérone supposés déclencher la production de ROS. Le pic de corticostérone en J6 et des valeurs de Before, R1, R2 nous montrent la résilience des Manchots royaux, c'est-à-dire une capacité à retrouver son état de référence après la perturbation créée par l'implant de corticostérone.

Notre étude montre aussi des différences physiologiques entre les sexes qui, pour être confirmées, devraient être analysées indépendamment de la mesure (Before, J6, R1, R2). En effet, on a montré que les taux de triglycérides et d'acide urique des femelles étaient plus élevés que chez les mâles tandis que quelques jours après l'implantation, la glycémie des mâles était supérieure à celle des femelles. La durée du jeûne et la composition des réserves énergétiques pourraient expliquer ces variations. Il serait intéressant d'approfondir ce sujet en prélevant des manchots sans manipulations expérimentales durant leurs rotations d'incubation.

Concernant le critère sexe, un des paramètres testés, la réponse antioxydante non enzymatique, a révélé une différence entre sexes en montrant que les femelles avaient une capacité antioxydante supérieure aux mâles, cependant, il ne faut pas oublier que cet effet sexe reste confondu avec l'effet stade.

Sur notre étude, nous pouvons discuter de l'exposition aux glucocorticoïdes, en effet, une seule mesure est significativement différente de la mesure préimplantatoire pour le groupe CORT, la mesure à J6 ce qui met en évidence la résilience du Manchot royal face à l'augmentation expérimentale de corticostérone. Mais on peut donc se demander si les manchots ont été exposés à de forts taux de corticostérone sur une période suffisamment conséquente pour montrer leurs potentiels mécanismes de résistance au stress. Par ailleurs, nous avons soumis les manchots à de forts taux de corticostérone ce qui est différent d'un stress chronique réel perçu dans l'environnement naturel. Une conception d'étude différente pourrait permettre ce stress chronique mais qu'en est il alors des phénomènes d'habituation ? Du bien-être animal ?

Nos mesures sont aussi discutables : en effet, pour la mobilisation des lipides, il a été choisi de mesurer les triglycérides qui sont la forme de stockage du tissu adipeux et qui sont ensuite hydrolysés dans les tissus, plutôt que de mesurer les acides gras non estérifiés directement qui sont la forme utilisable par les cellules. Il existe des mesures des acides gras non estérifiés sur le Manchot royal lors de stress aigu qui montrent une élévation des taux mais qui n'ont pas été corrélées à l'augmentation de corticostérone (Viblanç *et al.* 2018).

La temporalité des mesures peut aussi être discutée. A la mesure J6 pour le groupe CORT, une tendance à l'élévation du taux de glucose a été relevée : il se peut que la mesure ait été faite trop tard et nous empêche de montrer une significativité à ce jour.

Sans être significatif, on observe graphiquement à J6 une chute du lactate, une forte augmentation de l'acide urique, des légères augmentations de la GPx/SOD. On peut se demander si nos mesures ne sont pas trop tardives par rapport à la rapidité de réponse du Manchot royal ce qui pourrait être lié à des mécanismes d'adaptations intrinsèques. Plus on réagit vite au stress, plus on évite les conséquences délétères.

La mesure de dROMs ne nous montre aucune significativité, on peut aussi se demander si elle trop tardive surtout que la mesure du 8-OHdG plasmatique nous indique bien qu'il y a eu une réparation de l'ADN à la mesure J6 pour le groupe CORT.

On observe également à J6 une baisse significative de la densité mitochondriale pour les 2 groupes mais sans effet groupe, est-ce réellement le reflet d'une adaptation métabolique lors du cycle d'incubation ? Ou y a-t-il une autre explication à ce phénomène ?

Les télomères, témoins du stress oxydant, ne montrent pas de significativité, ce qui, au vu des résultats de dROMS reste cohérent.

A ce jour, nous ne sommes encore qu'à l'orée de la compréhension des mécanismes d'adaptations physiologiques des Manchots royaux à un environnement contraignant. Cette ouverture devrait permettre de concevoir et de réaliser dans le futur d'autres recherches dans cette voie.

## Conclusion

In fine, cette étude montre que des animaux vivant dans des environnements particulièrement stressants, comme le Manchot royal, sont remarquablement adaptés aux contraintes de leur milieu. En effet, malgré une augmentation transitoire marquée du taux de corticostérone, notre étude montre peu de changements dans la réponse physiologique des Manchots royaux adultes.

Cependant, il faut garder en tête que l'exposition à de hauts niveaux de corticostérone dans notre étude est limitée dans le temps. En effet, le rétrocontrôle négatif de la corticostérone est naturellement très efficace, ce qui nous permet qu'une étude dans un laps de temps réduit. Nous ne connaissons pas la durée exacte de l'exposition à des forts taux de corticostérone. Or, la meilleure façon de s'affranchir des coûts classiques liés à des taux de corticostérone élevés reste de réduire ces taux de corticostérone rapidement. De plus, il se peut que la temporalité de nos mesures ne permette pas de mettre en évidence certains mécanismes physiologiques d'adaptation.

Effectivement, chez les manchots CORT, un seul marqueur de stress oxydant est corrélé à l'implant de corticostérone. Toutefois, il s'agit d'un marqueur de réparation de l'ADN : il nous indique de ce fait qu'il y a eu des dégâts potentiellement liés à l'augmentation de corticostérone mais aussi que l'organisme lutte et se régénère. Ceci est donc en accord avec l'hypothèse que les Manchots royaux possèdent des mécanismes pour prévenir ou limiter l'impact d'une exposition chronique à de forts taux de glucocorticoïdes. Nous n'avons pas trouvé, dans nos mesures, de paramètres antioxydants pouvant expliquer la quasi absence de significativité de marqueurs de stress oxydant à ce jour.

De probables adaptations du métabolisme énergétique sont aussi à souligner, avec une corrélation du taux de corticostérone avec le taux de glucose témoignant d'une mobilisation énergétique à court terme.

Concernant les télomères, bien que non significatif dans cette étude, le raccourcissement progressif observé après implantation CORT pourrait être le témoin d'une régulation active de leur longueur pendant les périodes d'augmentation des besoins énergétiques liés au stress. Comme le suggère l'hypothèse d'attrition métabolique des télomères (Casagrande et Hau 2019; Casagrande *et al.* 2020) : l'attrition des télomères apparaît lorsque l'organisme est en état d'urgence et priorise la survie immédiate.

De ce fait, le télomère n'est plus seulement un marqueur cumulatif des challenges rencontrés lors de la vie de l'animal mais il devient aussi un médiateur de l'homéostasie et des compromis énergétiques lors de périodes de stress. L'étude de la régulation métabolique des télomères de Manchots royaux peut être une piste d'intérêt dans de futures études.

## Bibliographie

- « 8 grands noms de la recherche sur le stress - Henri Laborit ». Consulté le 20 novembre 2023.  
<https://www.echosciences-grenoble.fr/communautes/atout-cerveau/articles/8-grands-noms-d-e-la-recherche-sur-le-stress-wyle-vale>.
- Abe, Tomoki, Ahmad Mujahid, Kan Sato, Yukio Akiba, et Masaaki Toyomizu. « Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens ». *FEBS Letters* 580, n° 20 (4 septembre 2006): 4815-22.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.070>.
- Adams, N. J., et N. T. Klages. « Seasonal Variation in the Diet of the King Penguin (*Aptenodytes Patagonicus*) at Sub-Antarctic Marion Island ». *Journal of Zoology* 212, n° 2 (1987): 303-24. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1987.tb05992.x>.
- Afrifa, Justice, Tie Zhao, et Jingcui Yu. « Circulating Mitochondria DNA, a Non-Invasive Cancer Diagnostic Biomarker Candidate ». *Mitochondrion* 47 (juillet 2019): 238-43.  
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.12.003>.
- Ali, Sameh S., Maria-Cecilia Garibaldi Marcondes, Hilda Bajova, Laura L. Dugan, et Bruno Conti. « Metabolic Depression and Increased Reactive Oxygen Species Production by Isolated Mitochondria at Moderately Lower Temperatures\* ». *Journal of Biological Chemistry* 285, n° 42 (15 octobre 2010): 32522-28.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155432>.
- Almasi, B., A. Roulin, F. Korner-Nievergelt, S. Jenni-Eiermann, et L. Jenni. « Coloration Signals the Ability to Cope with Elevated Stress Hormones: Effects of Corticosterone on Growth of Barn Owls Are Associated with Melanism ». *Journal of Evolutionary Biology* 25, n° 6 (2012): 1189-99. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02508.x>.
- Ames, B. N., R. Cathcart, E. Schwiers, et P. Hochstein. « Uric Acid Provides an Antioxidant Defense in Humans against Oxidant- and Radical-Caused Aging and Cancer: A Hypothesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, n° 11 (novembre 1981): 6858-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.6858>.
- Angelier, Frédéric, Mathieu Giraudeau, Charles Bost, Fabrice Le Bouard, et Olivier Chastel. « Are stress hormone levels a good proxy of foraging success? An experiment with King Penguins, *Aptenodytes patagonicus* ». *The Journal of experimental biology* 212 (1 octobre 2009): 2824-29. <https://doi.org/10.1242/jeb.027722>.
- Astheimer, Lee, William Buttemer, et John Wingfield. « Interactions of Corticosterone with Feeding, Activity and Metabolism in Passerine Birds ». *Ornis Scandinavica* 23 (1 juillet 1992): 355-65. <https://doi.org/10.2307/3676661>.
- Badal, S. « Chapter 16 - Plant Metabolites and More Treating Various Ailments: Natural Products Treating Diseases ». In *Pharmacognosy*, édité par Simone Badal et Rupika Delgoda, 337-61. Boston: Academic Press, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00016-0>.

- Balaban, Robert S., Shino Nemoto, et Toren Finkel. « Mitochondria, Oxidants, and Aging ». *Cell* 120, n° 4 (25 février 2005): 483-95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.001>.
- Barbraud, Christophe, Karine Delord, Charles A. Bost, Adrien Chaigne, Cédric Marteau, et Henri Weimerskirch. « Population Trends of Penguins in the French Southern Territories ». *Polar Biology* 43, n° 7 (1 juillet 2020): 835-50. <https://doi.org/10.1007/s00300-020-02691-6>.
- Barja, G. « Mitochondrial Free Radical Production and Aging in Mammals and Birds ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 854 (20 novembre 1998): 224-38. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09905.x>.
- Barrat, A. « Quelques aspects de la biologie et de l'écologie du Manchot royal (*aptenodytes patagonicus*) des îles Crozet. » *quelques aspects de la biologie et de l'écologie du Manchot royal (aptenodytes patagonicus) des îles Crozet.*, 1976.
- Beaulieu, Michaël, Yan Ropert-Coudert, Yvon Le Maho, André Ancel, et François Criscuolo. « Foraging in an Oxidative Environment: Relationship between  $\delta^{13}\text{C}$  Values and Oxidative Status in Adélie Penguins ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277, n° 1684 (7 avril 2010): 1087-92. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1881>.
- Beaulieu, Michaël, Sophie Reichert, Yvon Le Maho, André Ancel, et François Criscuolo. « Oxidative Status and Telomere Length in a Long-Lived Bird Facing a Costly Reproductive Event ». *Functional Ecology* 25, n° 3 (2011): 577-85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01825.x>.
- Berliner, J. A., et J. W. Heinecke. « The Role of Oxidized Lipoproteins in Atherogenesis ». *Free Radical Biology & Medicine* 20, n° 5 (1996): 707-27. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02173-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02173-6).
- Bernard, Servane F., Marie-Anne Thil, et René Groscolas. « Lipolytic and metabolic response to glucagon in fasting king penguins: phase II vs. phase III ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 284, n° 2 (février 2003): R444-54. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00325.2002>.
- Bize, Pierre, François Criscuolo, Neil B Metcalfe, Lubna Nasir, et Pat Monaghan. « Telomere dynamics rather than age predict life expectancy in the wild ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276, n° 1662 (25 février 2009): 1679-83. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1817>.
- Bize, Pierre, Antoine Stocker, Susanne Jenni-Eiermann, Julien Gasparini, et Alexandre Roulin. « Sudden Weather Deterioration but Not Brood Size Affects Baseline Corticosterone Levels in Nestling Alpine Swifts ». *Hormones and Behavior* 58, n° 4 (septembre 2010): 591-98. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.06.020>.
- Blasco, Maria A. « Telomere Length, Stem Cells and Aging ». *Nature Chemical Biology* 3, n° 10 (octobre 2007): 640-49. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.38>.
- Bonier, Frances, Paul R. Martin, Ignacio T. Moore, et John C. Wingfield. « Do Baseline Glucocorticoids Predict Fitness? ». *Trends in Ecology & Evolution* 24, n° 11 (novembre 2009): 634-42. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.04.013>.

- Bost, Charles, Zorn T, Yvon Le Maho, et Guy Duhamel. « Feeding of diving predators and diel vertical migration of prey: King penguin diet versus trawl sampling at Kerguelen Islands ». *Marine Ecology Progress Series* 227 (13 février 2002): 51-62.  
<https://doi.org/10.3354/meps227051>.
- Brand, M. D. « Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing ». *Experimental Gerontology*, Biological Aging - Euroconference on Molecular, Cellular and Tissue Gerontology, 35, n° 6 (1 septembre 2000): 811-20.  
[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00135-2).
- Brand, Martin D, Charles Affourtit, Telma C Esteves, Katherine Green, Adrian J Lambert, Satomi Miwa, Julian L Pakay, et Nadeene Parker. « Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins ». *Free Radical Biology and Medicine* 37, n° 6 (15 septembre 2004): 755-67.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.034>.
- Bray, George A., et Claude Bouchard, éd. « Molecular Genetics of Rodent and Human Single Gene Mutations Affecting Body Composition », 0 éd., 217-70. CRC Press, 2003.  
<https://doi.org/10.3109/9780203913376-14>.
- Breuner, Cw, et M Orchinik. « Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates ». *Journal of Endocrinology* 175, n° 1 (1 octobre 2002): 99-112.  
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1750099>.
- Bried, Joël, et Pierre Jouventin. « The King Penguin *Aptenodytes patagonicus*, a non-nesting bird which selects its breeding habitat ». *Ibis* 143 (28 juin 2008): 670-73.  
<https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2001.tb04895.x>.
- Campbell, Jonathan E., Ashley J. Peckett, Anna M. D'souza, Thomas J. Hawke, et Michael C. Riddell. « Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 300, n° 1 (janvier 2011): C198-209.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00045.2010>.
- Cannon, Walter B. « Organization for physiological homeostasis ». *Physiological Reviews* 9, n° 3 (1 juillet 1929): 399-431. <https://doi.org/10.1152/physrev.1929.9.3.399>.
- Capel, F., V. Rimbart, D. Lioger, A. Diot, P. Rousset, P. Patureau Mirand, Y. Boirie, B. Morio, et L. Mosoni. « Due to Reverse Electron Transfer, Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Release Increases with Age in Human Vastus Lateralis Muscle Although Oxidative Capacity Is Preserved ». *Mechanisms of Ageing and Development* 126, n° 4 (avril 2005): 505-11.  
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.11.001>.
- Casagrande, Stefania, Antoine Stier, Pat Monaghan, Jasmine L. Loveland, Winifred Boner, Sara Lupi, Rachele Trevisi, et Michaela Hau. « Increased Glucocorticoid Concentrations in Early Life Cause Mitochondrial Inefficiency and Short Telomeres ». *Journal of Experimental Biology*, 1 janvier 2020, jeb.222513. <https://doi.org/10.1242/jeb.222513>.
- Casagrande, Stefania, et Michaela Hau. « Telomere attrition: metabolic regulation and signalling function? » *Biology Letters* 15, n° 3 (mars 2019): 20180885.  
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2018.0885>.

- Certo, Michelangelo, Alba Llibre, Wheeseong Lee, et Claudio Mauro. « Understanding Lactate Sensing and Signalling ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 33, n° 10 (1 octobre 2022): 722-35. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.07.004>.
- Challet, Etienne, Y. Le Maho, J. -P. Robin, A. Malan, et Y. Cherel. « Involvement of corticosterone in the fasting-induced rise in protein utilization and locomotor activity ». *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 50, n° 3 (1 mars 1995): 405-12. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)00287-S](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)00287-S).
- Charmandari, Evangelia, Constantine Tsigos, et George Chrousos. « Endocrinology of the Stress Response ». *Annual Review of Physiology* 67, n° 1 (2005): 259-84. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816>.
- Charrassin, J.-B., C. A. Bost, K. Pütz, J. Lage, T. Dahier, T. Zorn, et Y. Le Maho. « Foraging Strategies of Incubating and Brooding King Penguins *Aptenodytes Patagonicus* ». *Oecologia* 114, n° 2 (1 avril 1998): 194-201. <https://doi.org/10.1007/s004420050436>.
- Charrassin, Jean-Benoît, et Charles Bost. « Utilisation of the oceanic habitat by king penguins over the annual cycle ». *Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER* 221 (18 octobre 2001): 285-98. <https://doi.org/10.3354/meps221285>.
- Charrassin, Jean-Benoît, Yvon Le Maho, et Charles Bost. « Seasonal changes in the diving parameters of king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) ». *Marine Biology* 141 (1 septembre 2002): 581-89. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0843-4>.
- Cherel, Y., J. P. Robin, O. Walch, H. Karmann, P. Netchitailo, et Y. Le Maho. « Fasting in king penguin. I. Hormonal and metabolic changes during breeding ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 254, n° 2 (février 1988): R170-77. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1988.254.2.R170>.
- Cherel, Yves, Jean-Patrice Robin, et Yvon Le Maho. « Les trois jeûnes du Manchot royal. Comparaison avec le jeûne de reproduction du Manchot empereur ». *Revue d'Écologie (La Terre et La Vie)* 43, n° 4 (1988): 367-74. <https://doi.org/10.3406/revec.1988.5533>.
- Cherel, Yves, et R. Groscolas. « Relationships between nutrient storage and nutrient utilisation in long-term fasting birds and mammals ». *Proceedings of the 22nd International Ornithological Congress, Durban*, 1 janvier 1999, 17-34.
- Cherel, Yves, Jean Robin, et Yvon Le Maho. « Physiology and biochemistry of long-term fasting in birds ». *Canadian Journal of Zoology* 66 (14 février 2011): 159-66. <https://doi.org/10.1139/z88-022>.
- Chung, Hae Young, Bokyoung Sung, Kyung Jin Jung, Yani Zou, et Byung Pal Yu. « The Molecular Inflammatory Process in Aging ». *Antioxidants & Redox Signaling* 8, n° 3-4 (2006): 572-81. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.572>.
- Clanton, Thomas L. « Hypoxia-Induced Reactive Oxygen Species Formation in Skeletal Muscle ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 102, n° 6 (juin 2007): 2379-88. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01298.2006>.
- Clarke, Judy, et Knowles Kerry. « Diseases and parasites of penguins ». *Penguin Conservation* 13 (1 janvier 2000): 5-24.

- Clinchy, Michael, Michael J. Sheriff, et Liana Y. Zanette. « Predator-Induced Stress and the Ecology of Fear ». *Functional Ecology* 27, n° 1 (2013): 56-65.  
<https://doi.org/10.1111/1365-2435.12007>.
- Cohen, Alan A., Kevin J. McGraw, Popko Wiersma, Joseph B. Williams, W. Douglas Robinson, Tara R. Robinson, Jeffrey D. Brawn, et Robert E. Ricklefs. « Interspecific Associations between Circulating Antioxidant Levels and Life-History Variation in Birds ». *The American Naturalist* 172, n° 2 (août 2008): 178-93. <https://doi.org/10.1086/589456>.
- Cohen, Alan, Kirk Klasing, et Robert Ricklefs. « Measuring Circulating Antioxidants in Wild Birds ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 147, n° 1 (1 mai 2007): 110-21. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.12.015>.
- Cooke, Marcus S, Mark D Evans, Robert M Burd, Kayuri Patel, Angela Barnard, Joseph Lunec, et Peter E Hutchinson. « Induction and excretion of ultraviolet-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine and thymine dimers in vivo: Implications for PUVA ». *Journal of Investigative Dermatology* 116, n° 2 (2001): 281-85.  
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01251.x>.
- Cooper, J., R. J. M. Crawford, M. S. De Villiers, B. M. Dyer, G. J. G. Hofmeyr, et A. Jonker. « Disease outbreaks among penguins at sub-Antarctic Marion Island: a conservation concern ». *Marine Ornithology* 37 (15 octobre 2009): 193-96.
- Cossin-Sevrin, Nina, Bin-Yan Hsu, Coline Marciau, Vincent A. Viblanc, Suvi Ruuskanen, et Antoine Stier. « Effect of Prenatal Glucocorticoids and Thyroid Hormones on Developmental Plasticity of Mitochondrial Aerobic Metabolism, Growth and Survival: An Experimental Test in Wild Great Tits ». *The Journal of Experimental Biology* 225, n° 9 (1 mai 2022): jeb243414. <https://doi.org/10.1242/jeb.243414>.
- Costantini, David. *Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology*, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-54663-1>.
- Costantini, David, Caterina Ferrari, Cristian Pasquaretta, Elena Cavallone, Claudio Carere, Achaz von Hardenberg, et Denis Réale. « Interplay between plasma oxidative status, cortisol and coping styles in wild alpine marmots, *Marmota marmota* ». *Journal of Experimental Biology* 215, n° 2 (15 janvier 2012): 374-83.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.062034>.
- Costantini, David, Valeria Marasco, et Anders Pape Møller. « A Meta-Analysis of Glucocorticoids as Modulators of Oxidative Stress in Vertebrates ». *Journal of Comparative Physiology B* 181, n° 4 (1 mai 2011): 447-56. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0566-2>.
- Corbel, 2010 « Preparing to fledge: the adrenocortical and metabolic responses to stress in king penguin chicks » - *Functional Ecology*  
<https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2435.2009.01619.x>.
- Corsolini S., Nigro M., Olmastroni S., Focardi S., et Regoli F. « Susceptibility to oxidative stress in Adélie and emperor penguin ». *Polar Biology* 24, n° 5 (27 avril 2001): 365-68.  
<https://doi.org/10.1007/s003000000220>.

- Côté, Steeve. « Aggressiveness in King Penguins in relation to reproductive status and territory location ». *Animal Behaviour* 59 (1 mai 2000): 813-21.  
<https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1384>.
- Cristofari, Robin, Xiaoming Liu, Francesco Bonadonna, Yves Cherel, Pierre Pistorius, Yvon Le Maho, Virginie Raybaud, Nils Christian Stenseth, Céline Le Bohec, et Emiliano Trucchi. « Climate-Driven Range rotations of the King Penguin in a Fragmented Ecosystem ». *Nature Climate Change* 8, n° 3 (mars 2018): 245-51. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0084-2>.
- Crisuolo François et al « Real-time quantitative PCR assay for measurement of avian telomeres-Web of Science Core Collection ». Consulté le 22 novembre 2023.  
<https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000266027200015?SID=EUW1ED0F1AiUoz4ZLGMud6VFuQfg0>.
- Culik, B. M., K. Pütz, R. P. Wilson, D. Allers, J. Lage, C. A. Bost, et Y. Le Maho. « Diving Energetics in King Penguins ( *Aptenodytes Patagonicus* ) ». *Journal of Experimental Biology* 199, n° 4 (1 avril 1996): 973-83. <https://doi.org/10.1242/jeb.199.4.973>.
- Culik, B., K. Pütz, R. Wilson, D. Allers, J. Lage, C. Bost, et Y. le Maho. « Diving energetics in king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). » *The Journal of experimental biology*, 1 avril 1996.  
[https://www.semanticscholar.org/paper/Diving-energetics-in-king-penguins-\(Aptenodytes-Culik-P%3%BCtz/2a7250e09518fa12c59b397af004f929119bac4b](https://www.semanticscholar.org/paper/Diving-energetics-in-king-penguins-(Aptenodytes-Culik-P%3%BCtz/2a7250e09518fa12c59b397af004f929119bac4b).
- De Feo, P., G. Perriello, E. Torlone, M. M. Ventura, C. Fanelli, F. Santeusano, P. Brunetti, J. E. Gerich, et G. B. Bolli. « Contribution of cortisol to glucose counterregulation in humans ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 257, n° 1 (juillet 1989): E35-42. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1989.257.1.E35>.
- Dégletagne, Cyril. « Acclimations des manchots aux contraintes de l'environnement polaire: approches transcriptomique et intégrative sur le Manchot Royal (*Aptenodytes patagonicus*) et le Manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*) », s. d.
- Degletagne, Cyril. « Penguin acclimatization to polar environmental constraints : a transcriptomic and integrative study in King (*Aptenodytes patagonicus*) and Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*). », 2011.
- Descamps, Sébastien, Céline Le Bohec, Yvon Le Maho, Jean-Paul Gendner, et Michel Gauthier-Clerc. « Relating Demographic Performance to Breeding-Site Location in the King Penguin ». In *The Condor*, 111:81-87, 2009.  
<https://doi.org/10.1525/cond.2009.080066>.
- Descamps, Sebastien, Michel Gauthier-Clerc, JP Gendner, et Yvon Le Maho. « The annual cycle of unbanded king penguins *Aptenodytes patagonicus* on Possession Island (Crozet) ». *Avian Science* 2 (1 janvier 2002): 87-98.
- Descamps, Sébastien, Michel Gauthier-Clerc, Celine Le Bohec, Jean-Paul Gendner, et Yvon Le Maho. « Impact of predation on king penguin *Aptenodytes patagonicus* in Crozet Archipelago ». *Polar Biology* 28 (1 mars 2005): 303-10.  
<https://doi.org/10.1007/s00300-004-0684-3>.

- Dröge, Wulf. « Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function ». *Physiological Reviews* 82, n° 1 (janvier 2002): 47-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
- Eigler, Neal, Luigi Saccà, et Robert S. Sherwin. « Synergistic Interactions of Physiologic Increments of Glucagon, Epinephrine, and Cortisol in the Dog: A MODEL FOR STRESS-INDUCED HYPERGLYCEMIA ». *The Journal of Clinical Investigation* 63, n° 1 (1 janvier 1979): 114-23. <https://doi.org/10.1172/JCI109264>.
- Epel, Elissa S., Elizabeth H. Blackburn, Jue Lin, Firdaus S. Dhabhar, Nancy E. Adler, Jason D. Morrow, et Richard M. Cawthon. « Accelerated telomere shortening in response to life stress ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, n° 49 (7 décembre 2004): 17312-15. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407162101>.
- Favier, A. « Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique », 2003. <https://www.semanticscholar.org/paper/Le-stress-oxydant-%3A-Int%C3%A9r%C3%AAt-conceptuel-et-dans-la-Favier/29391b9b39885d0e998946fa09182101a6018cb7>.
- Favier, A. « Stress oxydant et pathologies humaines ». *Annales Pharmaceutiques Françaises* 64, n° 6 (1 novembre 2006): 390-96. [https://doi.org/10.1016/S0003-4509\(06\)75334-2](https://doi.org/10.1016/S0003-4509(06)75334-2).
- Favier, A. « Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique », s. d.
- Feillet, Céline A., Urs Albrecht, et Etienne Challet. « “Feeding Time” for the Brain: A Matter of Clocks ». *Journal of Physiology-Paris, Brain Clocks and Rhythms*, 100, n° 5 (1 novembre 2006): 252-60. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2007.05.002>.
- Finkel, Toren, et Nikki J. Holbrook. « Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing ». *Nature* 408, n° 6809 (novembre 2000): 239-47. <https://doi.org/10.1038/35041687>.
- Fonteneau, Frédéric, Sylvie Geiger, Loïc Marion, Yvon Le Maho, Jean Robin, et Mike Kinsella. « Gastrointestinal helminths of King penguins (*Aptenodytes patagonicus*) at Crozet Archipelago ». *Polar Biology* 34 (1 août 2011): 1249-52. <https://doi.org/10.1007/s00300-011-0970-9>.
- Galardo, María Noel, Mariana Regueira, María Fernanda Riera, Eliana Herminia Pellizzari, Selva Beatriz Cigorraga, et Silvina Beatriz Meroni. « Lactate Regulates Rat Male Germ Cell Function through Reactive Oxygen Species ». *PLOS ONE* 9, n° 1 (31 janvier 2014): e88024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088024>.
- Gamble, Amandine, et Caroline Gilbert. « Influence de l'état nutritionnel après un jeûne prolongé sur l'efficacité du voyage alimentaire chez le manchot royal ». 1765-....., France: Ecole vétérinaire d'Alfort, 2016. <http://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=2073>.
- Garcin N. et Stier A. « The effects of “stress” hormone on king penguin’s growth, energetics and ageing rate. », 2020.
- Gauthier-Clerc, Michel, B. Jaulhac, Y. Frenot, Claude Bachelard, H. Monteil, Yvon Le Maho, et Yves Handrich. « Prevalence of *Borrelia burgdorferi* (the Lyme disease agent) antibodies in king penguin *Aptenodytes patagonicus* in Crozet Archipelago ». *Polar Biol.* 22 (7 janvier 1999): 141-43. <https://doi.org/10.1007/s0030000050402>.

- Gavazza, Mariana, Mónica Marmunti, D. Montalti, et Ana Gutiérrez. « Liver and Heart Mitochondria Obtained from Adelie Penguin (*Pygoscelis Adeliae*) Offers High Resistance to Lipid Peroxidation ». *Acta Biologica Hungarica* 59, n° 2 (juin 2008): 185-94.  
<https://doi.org/10.1556/ABiol.59.2008.2.5>.
- Genova, Maria Luisa, Milena Merlo Pich, Andrea Bernacchia, Cristina Bianchi, Annalisa Biondi, Carla Bovina, Anna Ida Falasca, Gabriella Formiggini, Giovanna Parenti Castelli, et Giorgio Lenaz. « The Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species in Relation to Aging and Pathology ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1011 (avril 2004): 86-100. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-41088-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-662-41088-2_10).
- Geiger, Sylvie, Maryline Le Vaillant, Thomas Lebard, Sophie Reichert, Antoine Stier, Yvon LE Maho, et Francois Criscuolo. « Catching-up but Telomere Loss: Half-Opening the Black Box of Growth and Ageing Trade-off in Wild King Penguin Chicks ». *Molecular Ecology* 21, n° 6 (mars 2012): 1500-1510. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05331.x>.
- Glantzounis, G., E. Tsimoyiannis, A. Kappas, et D. Galaris. « Uric Acid and Oxidative Stress ». *Current Pharmaceutical Design* 11, n° 32 (1 décembre 2005): 4145-51.  
<https://doi.org/10.2174/138161205774913255>.
- Goldstein, David S., et Irwin J. Kopin. « Evolution of concepts of stress ». *Stress* 10, n° 2 (1 janvier 2007): 109-20. <https://doi.org/10.1080/10253890701288935>.
- Grande, F., et W. F. Prigge. « Glucagon Infusion, Plasma FFA and Triglycerides, Blood Sugar, and Liver Lipids in Birds ». *The American Journal of Physiology* 218, n° 5 (mai 1970): 1406-11. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1970.218.5.1406>.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas, et H. S. Sul. « Understanding Adipocyte Differentiation ». *Physiological Reviews* 78, n° 3 (juillet 1998): 783-809.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.3.783>.
- Groscolas, René, et Jean-Patrice Robin. « Long-term fasting and re-feeding in penguins ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, The Physiological Consequences of Feeding in Animals*, 128, n° 3 (1 mars 2001): 643-53.  
[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00341-X](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00341-X).
- Groscolas, René, André Lacroix, et Jean-Patrice Robin. « Spontaneous Egg or Chick Abandonment in Energy-Depleted King Penguins: A Role for Corticosterone and Prolactin? » *Hormones and Behavior* 53, n° 1 (janvier 2008): 51-60.  
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.08.010>.
- Gu, Feng, Ved Chauhan, et Abha Chauhan. « Glutathione Redox Imbalance in Brain Disorders ». *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 18, n° 1 (janvier 2015): 89-95.  
<https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000134>.
- Handrich, Y., R. M. Bevan, J.-B. Charrassin, P. J. Butler, K. Ptz, A. J. Woakes, J. Lage, et Y. Le Maho. « Hypothermia in Foraging King Penguins ». *Nature* 388, n° 6637 (juillet 1997): 64-67. <https://doi.org/10.1038/40392>.

- Halliwell, B., et J. M. Gutteridge. « Free Radicals and Antioxidant Protection: Mechanisms and Significance in Toxicology and Disease ». *Human Toxicology* 7, n° 1 (janvier 1988): 7-13. <https://doi.org/10.1177/096032718800700102>.
- Hamilton, M. L., H. Van Remmen, J. A. Drake, H. Yang, Z. M. Guo, K. Kewitt, C. A. Walter, et A. Richardson. « Does Oxidative Damage to DNA Increase with Age? » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, n° 18 (28 août 2001): 10469-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.171202698>.
- Harman, D. « Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry ». *Journal of Gerontology* 11, n° 3 (juillet 1956): 298-300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>.
- Harman, Denham. « Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry ». *Science of Aging Knowledge Environment* 2002, n° 37 (18 septembre 2002). <https://doi.org/10.1126/sageke.2002.37.cp14>.
- Hashimoto, Takeshi, Rajaa Hussien, Saji Oommen, Kishorchandra Gohil, et George A. Brooks. « Lactate Sensitive Transcription Factor Network in L6 Cells: Activation of MCT1 and Mitochondrial Biogenesis ». *The FASEB Journal* 21, n° 10 (2007): 2602-12. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8174com>.
- Hasselgren, Per-Olof. « Glucocorticoids and Muscle Catabolism ». *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 2, n° 3 (mai 1999): 201.
- Hau, Michaela, Mark F. Haussmann, Timothy J. Greives, Christa Matlack, David Costantini, Michael Quetting, James S. Adelman, Ana Catarina Miranda, et Jesko Partecke. « Repeated stressors in adulthood increase the rate of biological ageing ». *Frontiers in Zoology* 12, n° 1 (13 février 2015): 4. <https://doi.org/10.1186/s12983-015-0095-z>.
- Haussmann, Mark. « Telomeres: Linking stress and survival, ecology and evolution ». *Current Zoology* 56 (1 décembre 2010). <https://doi.org/10.1093/czoolo/56.6.714>.
- Haussmann, Mark F., Andrew S. Longenecker, Nicole M. Marchetto, Steven A. Juliano, et Rachel M. Bowden. « Embryonic Exposure to Corticosterone Modifies the Juvenile Stress Response, Oxidative Stress and Telomere Length ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, n° 1732 (7 avril 2012): 1447-56. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1913>.
- Haussmann, Mark F., et Nicole M. Marchetto. « Telomeres: Linking stress and survival, ecology and evolution ». *Current Zoology* 56, n° 6 (1 décembre 2010): 714-27. <https://doi.org/10.1093/czoolo/56.6.714>.
- Haymond, M. W., I. E. Karl, W. L. Clarke, A. S. Pagliara, et J. V. Santiago. « Differences in Circulating Gluconeogenic Substrates during Short-Term Fasting in Men, Women, and Children ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 31, n° 1 (janvier 1982): 33-42.
- Hellsten, Y, M Svensson, B Sjödin, S Smith, A Christensen, E.A Richter, et J Bangsbo. « Allantoin Formation and Urate and Glutathione Exchange in Human Muscle during Submaximal Exercise ». *Free Radical Biology and Medicine* 31, n° 11 (décembre 2001): 1313-22. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00631-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00631-1).

- Hermes-Lima, Marcelo, et Tania Zenteno-Savín. « Animal Response to Drastic Changes in Oxygen Availability and Physiological Oxidative Stress ». *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP* 133, n° 4 (décembre 2002): 537-56. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(02\)00080-7](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(02)00080-7).
- Hershock, D., et W. H. Vogel. « The Effects of Immobilization Stress on Serum Triglycerides, Nonesterified Fatty Acids, and Total Cholesterol in Male Rats after Dietary Modifications ». *Life Sciences* 45, n° 2 (1989): 157-65. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(89\)90290-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90290-7).
- Hoh, Yin Kiong. « An Instant Update on Telomeres and Telomerase ». *The American Biology Teacher* 79, n° 8 (1 octobre 2017): 615-20. <https://doi.org/10.1525/abt.2017.79.8.615>.
- Houben, Joyce M. J., Harald J. J. Moonen, Frederik J. van Schooten, et Geja J. Hageman. « Telomere Length Assessment: Biomarker of Chronic Oxidative Stress? ». *Free Radical Biology and Medicine* 44, n° 3 (1 février 2008): 235-46. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.001>.
- Huber, Nikolaus, Leonida Fusani, Andrea Ferretti, Katharina Mahr, et Virginie Canoine. « Measuring short-term stress in birds: Comparing different endpoints of the endocrine-immune interface ». *Physiology & Behavior* 182 (1 décembre 2017): 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.09.017>.
- Hulbert, A. J. « Explaining Longevity of Different Animals: Is Membrane Fatty Acid Composition the Missing Link? ». *Age (Dordrecht, Netherlands)* 30, n° 2-3 (septembre 2008): 89-97. <https://doi.org/10.1007/s11357-008-9055-2>.
- Hulbert, A. J., Reinald Pamplona, Rochelle Buffenstein, et W. A. Buttemer. « Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals ». *Physiological Reviews* 87, n° 4 (octobre 2007): 1175-1213. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2006>.
- Indo, Hiroko P., Hsiu-Chuan Yen, Ikuo Nakanishi, Ken-ichiro Matsumoto, Masato Tamura, Yumiko Nagano, Hirofumi Matsui, et al. « A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging ». *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 56, n° 1 (janvier 2015): 1-7. <https://doi.org/10.3164/jcbn.14-42>.
- Jiguet, Frederic, et Pierre Jouventin. « Individual Breeding Decisions and Long-Term Reproductive Strategy in the King Penguin Aptenodytes Patagonicus ». *Ibis* 141, n° 3 (1999): 428-33. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1999.tb04411.x>.
- Karine, Delord, Charles Bost, Adrien Chaigne, Cédric Marteau, et Henri Weimerskirch. « Population trends of penguins in the French Southern Territories ». *Polar Biology* 43 (1 juillet 2020). <https://doi.org/10.1007/s00300-020-02691-6>.
- Karine, Delord, Charles Bost, Yves Cherel, Christophe Guinet, et Henri Weimerskirch. *Atlas of top predators from French Southern Territories in the Southern Indian Ocean*, 2013. [https://doi.org/10.15474/AtlasTopPredatorsOI\\_CEBC.CNRS\\_FrenchSouthernTerritories](https://doi.org/10.15474/AtlasTopPredatorsOI_CEBC.CNRS_FrenchSouthernTerritories).
- Kaur, H., et B. Halliwell. « Action of Biologically-Relevant Oxidizing Species upon Uric Acid. Identification of Uric Acid Oxidation Products ». *Chemico-Biological Interactions* 73, n° 2-3 (1990): 235-47. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(90\)90006-9](https://doi.org/10.1016/0009-2797(90)90006-9).

- Kitaysky, A. S, E. V Kitaiskaia, J. F Piatt, et J. C Wingfield. « Benefits and Costs of Increased Levels of Corticosterone in Seabird Chicks ». *Hormones and Behavior* 43, n° 1 (1 janvier 2003): 140-49. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(02\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(02)00030-2).
- Klaassen, Marcel, Anders Kvist, et Åke Lindström. « Flight Costs and Fuel Composition of a Bird Migrating in a Wind Tunnel ». *The Condor* 102, n° 2 (1 mai 2000): 444-51. <https://doi.org/10.1093/condor/102.2.444>.
- Klandorf, H., I.L. Probert, et M. Iqbal. « In the Defence against Hyperglycaemia: An Avian Strategy ». *World's Poultry Science Journal* 55, n° 3 (1 septembre 1999): 251-68. <https://doi.org/10.1079/WPS19990019>.
- Kooyman, G. L., Y. Chereh, Y. Le Maho, J. P. Croxall, P. H. Thorson, V. Ridoux, et C. A. Kooyman. « Diving Behavior and Energetics During Foraging Cycles in King Penguins ». *Ecological Monographs* 62, n° 1 (mars 1992): 143-63. <https://doi.org/10.2307/2937173>.
- Kooyman, Gerald L., Paul J. Ponganis, Michael A. Castellini, Edward P. Ponganis, Katherine V. Ponganis, Philip H. Thorson, Scott A. Eckert, et Yvon Lemaho. « Heart Rates and Swim Speeds of Emperor Penguins Diving Under Sea Ice ». *Journal of Experimental Biology* 165, n° 1 (1 avril 1992): 161-80. <https://doi.org/10.1242/jeb.165.1.161>.
- Kooyman, Gerald, EA Wahrenbrock, Michael Castellini, R. Davis, et E. Sinnett. « Aerobic and anaerobic metabolism during voluntary diving in Weddell seals: Evidence of preferred pathways from blood chemistry and behavior ». *Journal of Comparative Physiology B* 138 (1 décembre 1980): 335-46. <https://doi.org/10.1007/BF00691568>.
- Kotrschal, Alexander, Petteri Ilmonen, et Dustin J Penn. « Stress Impacts Telomere Dynamics ». *Biology Letters* 3, n° 2 (22 avril 2007): 128-30. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0594>.
- Ksepka, Daniel T., et Tatsuro Ando. « Penguins Past, Present, and Future: Trends in the Evolution of the Sphenisciformes ». édité par Gareth Dyke et Gary Kaiser, 155-86. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2011. <https://doi.org/10.1002/9781119990475.ch6>.
- Ku, H. H., U. T. Brunk, et R. S. Sohal. « Relationship between Mitochondrial Superoxide and Hydrogen Peroxide Production and Longevity of Mammalian Species ». *Free Radical Biology & Medicine* 15, n° 6 (décembre 1993): 621-27. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90165-q](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90165-q).
- Le Bohec, Céline, Joël M. Durant, Michel Gauthier-Clerc, Nils C. Stenseth, Young-Hyang Park, Roger Pradel, David Grémillet, Jean-Paul Gendner, et Yvon Le Maho. « King penguin population threatened by Southern Ocean warming ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, n° 7 (19 février 2008): 2493-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712031105>.
- Le Bohec, Celine, Michel Gauthier-Clerc, Jean-Paul Gendner, Nicolas Chatelain, et Yvon Le Maho. « Nocturnal predation of king penguins by giant petrels on the Crozet Islands ». *Polar Biology* 26 (1 septembre 2003): 587-90. <https://doi.org/10.1007/s00300-003-0523-y>.

- Le Maho, Yvon, Jean-Paul Gendner, Etienne Challet, Charles Bost, Janick Gilles, Christophe Verdon, Christiane Plumere, Jean Robin, et Yves Handrich. « Undisturbed breeding penguins as indicators of changes in marine resources ». *Marine Ecology Progress Series* 95 (1 mai 1993): 1-6. <https://doi.org/10.3354/meps095001>.
- Le Vaillant, Maryline, Céline Le Bohec, Onésime Prud'Homme, Barbara Wienecke, Yvon Le Maho, Akiko Kato, et Yan Ropert-Coudert. « How Age and Sex Drive the Foraging Behaviour in the King Penguin ». *Marine Biology* 160, n° 5 (1 mai 2013): 1147-56. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2167-y>.
- Lee, Hsin-Chen, et Yau-Huei Wei. « 2005 Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress », 19 juillet 2013.
- « Les circuits du stress ». Consulté le 12 septembre 2023. <http://www.medecine.unige.ch/enseignement/apprentissage/module3/pec/apprentissage/neuroana/stress/stress2.htm>.
- « Les manchots royaux bientôt sur le chemin de l'exil | CNRS - Archives des actualités de l'INEE ». Consulté le 10 septembre 2023. <https://archives.cnrs.fr/inee/article/b344>.
- Lin, H., E. Decuypere, et J. Buyse. « Oxidative Stress Induced by Corticosterone Administration in Broiler Chickens (*Gallus Gallus Domesticus*): 2. Short-Term Effect ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139, n° 4 (1 décembre 2004): 745-51. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.014>.
- MacDougall-Shackleton, S A, F Bonier, L M Romero, et I T Moore. « Glucocorticoids and "Stress" Are Not Synonymous ». *Integrative Organismal Biology* 1, n° 1 (13 juillet 2019): obz017. <https://doi.org/10.1093/iob/obz017>.
- McEwen, Bruce, et Elizabeth Norton Lasley. *The end of stress as we know it*. Washington, DC: Henry, 2002.
- Magomedova, Lilia, et Carolyn L. Cummins. « Glucocorticoids and Metabolic Control ». In *Metabolic Control*, édité par Stephan Herzig, 73-93. Handbook of Experimental Pharmacology. Cham: Springer International Publishing, 2016. [https://doi.org/10.1007/164\\_2015\\_1](https://doi.org/10.1007/164_2015_1).
- Majima, Hideyuki J., Terry D. Oberley, Katsutoshi Furukawa, Mark P. Mattson, Hsiu-Chuan Yen, Luke I. Szweda, et Daret K. St Clair. « Prevention of Mitochondrial Injury by Manganese Superoxide Dismutase Reveals a Primary Mechanism for Alkaline-Induced Cell Death \* ». *Journal of Biological Chemistry* 273, n° 14 (3 avril 1998): 8217-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.14.8217>.
- Mangin, Stephan, Michel Gauthier-Clerc, Yves Frenot, Jean-Paul Gendner, et Yvon Le Maho. « Ticks *Ixodes uriae* and the breeding performance of a colonial seabird, king penguin *Aptenodytes patagonicus* ». *Journal of Avian Biology* 34 (8 avril 2003): 30-34. <https://doi.org/10.1034/j.1600-048X.2003.02916.x>.

- Manoli, Irini, Salvatore Alesci, Marc R. Blackman, Yan A. Su, Owen M. Rennert, et George P. Chrousos. « Mitochondria as Key Components of the Stress Response ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 18, n° 5 (1 juillet 2007): 190-98.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.04.004>.
- Marasco, Valeria, Antoine Stier, Winnie Boner, Kate Griffiths, Britt Heidinger, et Pat Monaghan. « Environmental conditions can modulate the links among oxidative stress, age, and longevity ». *Mechanisms of Ageing and Development* 164 (1 juin 2017): 100-107.  
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.04.012>.
- Mauvais-Jarvis, Franck. « Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity ». *Biology of Sex Differences* 6 (3 septembre 2015): 14.  
<https://doi.org/10.1186/s13293-015-0033-y>.
- McCord, Joe M., et Irwin Fridovich. « Superoxide Dismutase: AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN) ». *Journal of Biological Chemistry* 244, n° 22 (25 novembre 1969): 6049-55. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5).
- McEwen, Bruce S., et John C. Wingfield. « The Concept of Allostasis in Biology and Biomedicine ». *Hormones and Behavior* 43, n° 1 (janvier 2003): 2-15.  
[https://doi.org/10.1016/s0018-506x\(02\)00024-7](https://doi.org/10.1016/s0018-506x(02)00024-7).
- M.D., Murray, Ricardo Palma, et Pilgrim R.L.C. « Ectoparasites of Australian, New Zealand and Antarctic birds - Ratites to Ducks », 1365-74, 1990.
- Merimee, T. J., R. I. Misbin, et A. J. Pulkkinen. « Sex Variations in Free Fatty Acids and Ketones during Fasting: Evidence for a Role of Glucagon ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 46, n° 3 (mars 1978): 414-19. <https://doi.org/10.1210/jcem-46-3-414>.
- Metcalf, Neil B., et Carlos Alonso-Alvarez. « Oxidative Stress as a Life-History Constraint: The Role of Reactive Oxygen Species in Shaping Phenotypes from Conception to Death ». *Functional Ecology* 24, n° 5 (2010): 984-96.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01750.x>.
- Mills, Gordon C. « Hemoglobin catabolism: i. glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown ». *Journal of Biological Chemistry* 229, n° 1 (1 novembre 1957): 189-97. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)70608-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70608-X).
- Mittendorfer, Bettina. « Sexual Dimorphism in Human Lipid Metabolism1 ». *The Journal of Nutrition* 135, n° 4 (1 avril 2005): 681-86. <https://doi.org/10.1093/jn/135.4.681>.
- Miyashita, Tomoya, Tokio Yamaguchi, Keiko Motoyama, Keiko Unno, Yumiko Nakano, et Kayoko Shimoi. « Social Stress Increases Biopyrins, Oxidative Metabolites of Bilirubin, in Mouse Urine ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349, n° 2 (octobre 2006): 775-80. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.098>.
- Monaghan, Pat, Neil B. Metcalfe, et Roxana Torres. « Oxidative Stress as a Mediator of Life History Trade-Offs: Mechanisms, Measurements and Interpretation ». *Ecology Letters* 12, n° 1 (janvier 2009): 75-92. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x>.

- Moore, Geoffrey J., Graham Robertson, et Barbara Wienecke. « Food Requirements of Breeding King Penguins at Heard Island and Potential Overlap with Commercial Fisheries ». *Polar Biology* 20, n° 5 (1 octobre 1998): 293-302. <https://doi.org/10.1007/s003000050306>.
- Mujahid, A., K. Sato, Y. Akiba, et M. Toyomizu. « Acute Heat Stress Stimulates Mitochondrial Superoxide Production in Broiler Skeletal Muscle, Possibly via Downregulation of Uncoupling Protein Content ». *Poultry Science* 85, n° 7 (juillet 2006): 1259-65. <https://doi.org/10.1093/ps/85.7.1259>.
- Müller, Claudia, Bettina Almasi, Alexandre Roulin, Creagh W. Breuner, Susanne Jenni-Eiermann, et Lukas Jenni. « Effects of corticosterone pellets on baseline and stress-induced corticosterone and corticosteroid-binding-globulin ». *General and Comparative Endocrinology* 160, n° 1 (1 janvier 2009): 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.10.018>.
- Munck, Allan, Paul Guyre, et Nikki Holbrook. « Physiological Functions of Glucocorticoids in Stress and Their Relation to Pharmacological Actions ». *Endocrine reviews* 5 (1 février 1984): 25-44. <https://doi.org/10.1210/edrv-5-1-25>.
- Nadeem, Ahmed, Anbrin Masood, Nahid Masood, Rabia Afzal Gilani, et Zahoor Ahmad Shah. « Immobilization stress causes extra-cellular oxidant–antioxidant imbalance in rats: Restoration by L-NAME and vitamin E ». *European Neuropsychopharmacology* 16, n° 4 (1 mai 2006): 260-67. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2005.08.001>.
- Netherton, Jacob K., Benjamin R. Robinson, Rachel A. Ogle, Allan Gunn, Ana Izabel S. Balbin Villaverde, Kim Colyvas, Ced Wise, Tylah Russo, Amiee Dowdell, et Mark A. Baker. « Seasonal Variation in Bull Semen Quality Demonstrates There Are Heat-Sensitive and Heat-Tolerant Bulls ». *Scientific Reports* 12, n° 1 (12 septembre 2022): 15322. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17708-9>.
- Oliver, C. N., B. W. Ahn, E. J. Moerman, S. Goldstein, et E. R. Stadtman. « Age-Related Changes in Oxidized Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 262, n° 12 (25 avril 1987): 5488-91.
- Olsen, B, D C Duffy, T G Jaenson, A Gylfe, J Bonnedahl, et S Bergström. « Transhemispheric exchange of Lyme disease spirochetes by seabirds. » *Journal of Clinical Microbiology* 33, n° 12 (décembre 1995): 3270-74.
- Olsson, Olof, et Henk van der Jeugd. « Survival in king penguins *Aptenodytes patagonicus*: Temporal and sex-specific effects of environmental variability ». *Oecologia* 132 (1 août 2002): 509-16. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-0985-6>.
- Orgeret, F., C. Péron, M. R. Enstipp, K. Delord, H. Weimerskirch, et C. A. Bost. « Exploration during Early Life: Distribution, Habitat and Orientation Preferences in Juvenile King Penguins ». *Movement Ecology* 7, n° 1 (décembre 2019): 29. <https://doi.org/10.1186/s40462-019-0175-3>.
- Osborne, Thomas B., Lafayette B. Mendel, et Edna L. Ferry. « The Effect of Retardation of Growth Upon the Breeding Period and Duration of Life of Rats ». *Science* 45, n° 1160 (23 mars 1917): 294-95. <https://doi.org/10.1126/science.45.1160.294>.

- Quinlivan, Eoin P., et Jesse F. Gregory. « DNA Digestion to Deoxyribonucleoside: A Simplified One-Step Procedure ». *Analytical Biochemistry* 373, n° 2 (15 février 2008): 383-85. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.09.031>.
- Pamplona, Reinald, et David Costantini. « Molecular and Structural Antioxidant Defenses against Oxidative Stress in Animals ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301, n° 4 (octobre 2011): R843-863. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00034.2011>.
- Peckett, Ashley J., David C. Wright, et Michael C. Riddell. « The Effects of Glucocorticoids on Adipose Tissue Lipid Metabolism ». *Metabolism - Clinical and Experimental* 60, n° 11 (1 novembre 2011): 1500-1510. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.06.012>.
- Péron, Clara, Henri Weimerskirch, et Charles-André Bost. « Projected poleward rotation of king penguins' (*Aptenodytes patagonicus*) foraging range at the Crozet Islands, southern Indian Ocean ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, n° 1738 (7 juillet 2012): 2515-23. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2705>.
- Pfaffl, Michael W. « A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR ». *Nucleic Acids Research* 29, n° 9 (1 mai 2001): e45.
- Picard, Martin, Robert-Paul Juster, et Bruce S. McEwen. « Mitochondrial Allostatic Load Puts the “gluc” Back in Glucocorticoids ». *Nature Reviews Endocrinology* 10, n° 5 (mai 2014): 303-10. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.22>.
- Picard, Martin, Bruce S McEwen, Elissa S Epel, et Carmen Sandi. « An energetic view of stress: Focus on mitochondria ». *Frontiers in Neuroendocrinology, Stress and the Brain*, 49 (1 avril 2018): 72-85. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.01.001>.
- Pilkis, S J, et D K Granner. « Molecular Physiology of the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis ». *Annual Review of Physiology* 54, n° 1 (1992): 885-909. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.004321>.
- Ponganis, P. J., et G. L. Kooyman. « Diving Physiology of Birds: A History of Studies on Polar Species ». *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 126, n° 2 (juin 2000): 143-51. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(00\)00208-7](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(00)00208-7).
- Ponganis, P. J., G. L. Kooyman, L. N. Starke, C. A. Kooyman, et T. G. Kooyman. « Post-Dive Blood Lactate Concentrations in Emperor Penguins, *Aptenodytes Forsteri* ». *The Journal of Experimental Biology* 200, n° Pt 11 (juin 1997): 1623-26. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.11.1623>.
- Prestt, Ian. « Ecological adaptations for breeding in birds ». *Biological Conservation* 3, n° 2 (1971): 161.
- Psarra, Anna-Maria G., et Constantine E. Sekeris. « Steroid and Thyroid Hormone Receptors in Mitochondria ». *IUBMB Life* 60, n° 4 (avril 2008): 210-23. <https://doi.org/10.1002/iub.37>.
- Quque, Martin, Charly Ferreira, Sebastian Sosa Orozco, Quentin Schull, Sandrine Zahn, François Criscuolo, Josefa Bleu, et Vincent Viblanc. « Cascading Effects of Conspecific Aggression on Oxidative Status and Telomere Length in Zebra Finches ». *Physiological and biochemical zoology : PBZ* 95 (1 septembre 2022): 416-29. <https://doi.org/10.1086/721252>.

- Reichert, Sophie, et Antoine Stier. « Does oxidative stress shorten telomeres in vivo? A review ». *Biology letters* 13 (6 décembre 2017). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0463>.
- Remage-Healey, L., et L. M. Romero. « Corticosterone and Insulin Interact to Regulate Glucose and Triglyceride Levels during Stress in a Bird ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281, n° 3 (septembre 2001): R994-1003. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.3.R994>.
- Rey, Benjamin, Cyril Dégletagne, Jacques Bodennec, Pierre-Axel Monternier, Mathieu Mortz, Damien Roussel, Caroline Romestaing, Jean-Louis Rouanet, Jeremy Tornos, et Claude Duchamp. « Hormetic response triggers multifaceted anti-oxidant strategies in immature king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) ». *Free Radical Biology and Medicine* 97 (1 août 2016): 577-87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.015>.
- Rey, Benjamin, Lewis G. Halsey, Virginie Dolmazon, Jean-Louis Rouanet, Damien Roussel, Yves Handrich, Patrick J. Butler, et Claude Duchamp. « Long-term fasting decreases mitochondrial avian UCP-mediated oxygen consumption in hypometabolic king penguins ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295, n° 1 (juillet 2008): R92-100. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00271.2007>.
- Rice, Ann C., Paula M. Keeney, Norah K. Algarzae, Amy C. Ladd, Ravindar R. Thomas, et James P. Bennett. « Mitochondrial DNA Copy Numbers in Pyramidal Neurons Are Decreased and Mitochondrial Biogenesis Transcriptome Signaling Is Disrupted in Alzheimer's Disease Hippocampi ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 40, n° 2 (2014): 319-30. <https://doi.org/10.3233/JAD-131715>.
- Richter, Torsten, et Thomas von Zglinicki. « A Continuous Correlation between Oxidative Stress and Telomere Shortening in Fibroblasts ». *Experimental Gerontology* 42, n° 11 (novembre 2007): 1039-42. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.08.005>.
- Ridoux, Vincent, Pierre Jouventin, Jean-claude Stahl, et Henri Weimerskirch. « Écologie alimentaire comparée des manchots nicheurs aux Îles Crozet ». *Revue d'Écologie (La Terre et La Vie)* 43, n° 4 (1988): 345-55. <https://doi.org/10.3406/revec.1988.5531>.
- Robin, E. D., et R. Wong. « Mitochondrial DNA Molecules and Virtual Number of Mitochondria per Cell in Mammalian Cells ». *Journal of Cellular Physiology* 136, n° 3 (septembre 1988): 507-13. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041360316>.
- Rodhouse, Pg, O Olsson, P Anker-Nilssen, et Awa Murray. « Cephalopod Predation by the King Penguin *Aptenodytes Patagonicus* from South Georgia ». *Marine Ecology Progress Series* 168 (1998): 13-19. <https://doi.org/10.3354/meps168013>.
- Romero, L. Michael, Molly J. Dickens, et Nicole E. Cyr. « The Reactive Scope Model — A New Model Integrating Homeostasis, Allostasis, and Stress ». *Hormones and Behavior* 55, n° 3 (mars 2009): 375-89. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.12.009>.
- Romero, L. Michael, David Storchlic, et John C. Wingfield. « Corticosterone Inhibits Feather Growth: Potential Mechanism Explaining Seasonal down Regulation of Corticosterone during Molt ». *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 142, n° 1 (septembre 2005): 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.07.014>.

- Rouault, Mathieu. « Climate Variability at Marion Island, Southern Ocean, since 1960 ». *Journal of Geophysical Research* 110, n° C5 (2005): C05007.  
<https://doi.org/10.1029/2004JC002492>.
- Sapolsky, R. M., L. M. Romero, et A. U. Munck. « How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions ». *Endocrine Reviews* 21, n° 1 (février 2000): 55-89. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>.
- Sapolsky, Robert. « Physiological and Pathophysiological Implications of Social Stress in Mammals », Vol. 4, 2011. <https://doi.org/10.1002/cphy.cp070423>.
- Sawada, M., et J. C. Carlson. « Changes in Superoxide Radical and Lipid Peroxide Formation in the Brain, Heart and Liver during the Lifetime of the Rat ». *Mechanisms of Ageing and Development* 41, n° 1-2 (novembre 1987): 125-37.  
[https://doi.org/10.1016/0047-6374\(87\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0047-6374(87)90057-1).
- Sawyer, Donald T., et Joan S. Valentine. « How Super Is Superoxide? » Research-article. ACS Publications. American Chemical Society, 1 mai 2002. World.  
<https://doi.org/10.1021/ar00072a005>.
- Sanchari, Jian Wu. « What Is Mitohormesis? » News-Medical.net, 17 septembre 2018.  
<https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Mitohormesis.aspx>.
- Scheller, Klaus, Constantin E. Sekeris, Georg Krohne, Robert Hock, Immo A. Hansen, et Ulrich Scheer. « Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells ». *European Journal of Cell Biology* 79, n° 5 (1 mai 2000): 299-307.  
[https://doi.org/10.1078/S0171-9335\(04\)70033-3](https://doi.org/10.1078/S0171-9335(04)70033-3).
- Schramm, Frédéric, Michel Gauthier-Clerc, Jean-Charles Fournier, Karen Mccoy, Cathy Barthel, Danièle Postic, Yves Handrich, Yvon Le Maho, et Benoît Jaulhac. « First detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in king penguins (*Aptenodytes patagonicus halli*) ». *Ticks and tick-borne diseases* 5 (20 août 2014). <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.013>.
- Schramm, Frédéric, Michel Gauthier-Clerc, Jean-Charles Fournier, Karen D. McCoy, Cathy Barthel, Danièle Postic, Yves Handrich, Yvon Le Maho, et Benoît Jaulhac. « First Detection of *Borrelia Burgdorferi* Sensu Lato DNA in King Penguins (*Aptenodytes Patagonicus Halli*) ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 5, n° 6 (octobre 2014): 939-42.  
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.013>.
- Schull, Quentin, Vincent A. Viblanc, Antoine Stier, Hédi Saadaoui, Emilie Lefol, François Criscuolo, Pierre Bize, et Jean-Patrice Robin. « The oxidative debt of fasting: evidence for short- to medium-term costs of advanced fasting in adult king penguins ». *Journal of Experimental Biology* 219, n° 20 (15 octobre 2016): 3284-93.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.145250>.
- Schull, Quentin « Experimental stress during molt suggests the evolution of condition-dependent and condition-independent ornaments in the king penguin - Schull - 2018 - Ecology and Evolution - Wiley Online Library ». Consulté le 22 novembre 2023.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ece3.3677>.

- Selman, Colin, Jonathan D. Blount, Daniel H. Nussey, et John R. Speakman. « Oxidative Damage, Ageing, and Life-History Evolution: Where Now? » *Trends in Ecology and Evolution* 27, n° 10 (1 octobre 2012): 570-77. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.06.006>.
- Shick, J. M., et J. A. Dykens. « Oxygen Detoxification in Algal-Invertebrate Symbioses from the Great Barrier Reef ». *Oecologia* 66, n° 1 (1 avril 1985): 33-41. <https://doi.org/10.1007/BF00378549>.
- Shields, Hazel J., Annika Traa, et Jeremy M. Van Raamsdonk. « Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (11 février 2021): 628157. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.628157>.
- Skadhauge, Erik. *Osmoregulation in Birds*. Vol. 12. Zoophysiology. Berlin, Heidelberg: Springer, 1981. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-81585-0>.
- Slos, S., et R. Stoks. « Predation Risk Induces Stress Proteins and Reduces Antioxidant Defense ». *Functional Ecology* 22, n° 4 (2008): 637-42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01424.x>.
- Sohal, R. S., et B. H. Sohal. « Hydrogen Peroxide Release by Mitochondria Increases during Aging ». *Mechanisms of Ageing and Development* 57, n° 2 (février 1991): 187-202. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(91\)90034-w](https://doi.org/10.1016/0047-6374(91)90034-w).
- Sohal, R. S., B. H. Sohal, et U. T. Brunk. « Relationship between Antioxidant Defenses and Longevity in Different Mammalian Species ». *Mechanisms of Ageing and Development* 53, n° 3 (30 avril 1990): 217-27. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(90\)90040-m](https://doi.org/10.1016/0047-6374(90)90040-m).
- Speakman, John R., et Colin Selman. « The Free-Radical Damage Theory: Accumulating Evidence against a Simple Link of Oxidative Stress to Ageing and Lifespan ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 33, n° 4 (avril 2011): 255-59. <https://doi.org/10.1002/bies.201000132>.
- Sterling, Peter. « 1988. Allostasis a new paradigm to explain arousal pathology », 2023. « Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria - Psarra - 2008 - IUBMB Life - Wiley Online Library ». Consulté le 20 septembre 2023. <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iub.37>.
- Stier, Antoine, Pierre Bize, Bin-Yan Hsu, et Suvi Ruuskanen. « Plastic but repeatable: rapid adjustments of mitochondrial function and density during reproduction in a wild bird species ». *Biology Letters* 15, n° 11 (13 novembre 2019): 20190536. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0536>.
- Stier, Antoine, Pierre Bize, Quentin Schull, Joffrey Zoll, François Singh, Bernard Geny, Frédéric Gros, Cathy Royer, Sylvie Massemin, et François Criscuolo. « Avian erythrocytes have functional mitochondria, opening novel perspectives for birds as animal models in the study of ageing ». *Frontiers in Zoology* 10, n° 1 (8 juin 2013): 33. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-33>.

- Stier, Antoine, Sophie Reichert, Francois Criscuolo, et Pierre Bize. « Red blood cells open promising avenues for longitudinal studies of ageing in laboratory, non-model and wild animals ». *Experimental Gerontology*, Aging in the Wild: Insights from Free-Living and Non-Model organisms, 71 (1 novembre 2015): 118-34.  
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.09.001>.
- Stier, Antoine, Sophie Reichert, Sylvie Massemin, Pierre Bize, et François Criscuolo. « Constraint and Cost of Oxidative Stress on Reproduction: Correlative Evidence in Laboratory Mice and Review of the Literature ». *Frontiers in Zoology* 9, n° 1 (2012): 37.  
<https://doi.org/10.1186/1742-9994-9-37>.
- Stier, Antoine, Caroline Romestaing, Quentin Schull, Emilie Lefol, Jean-Patrice Robin, Damien Roussel, et Pierre Bize. « How to Measure Mitochondrial Function in Birds Using Red Blood Cells: A Case Study in the King Penguin and Perspectives in Ecology and Evolution ». *Methods in Ecology and Evolution* 8, n° 10 (2017): 1172-82.  
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12724>.
- Stier, Antoine, Quentin Schull, Pierre Bize, Emilie Lefol, Mark Haussmann, Dam Roussel, Jean Robin, et Vincent Viblanc. « Oxidative stress and mitochondrial responses to stress exposure suggest that king penguins are naturally equipped to resist stress ». *Scientific Reports* 9 (12 juin 2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44990-x>.
- Stier, Antoine, Vincent A. Viblanc, Sylvie Massemin-Challet, Yves Handrich, Sandrine Zahn, Emilio R. Rojas, Claire Sarau, et al. « Starting with a Handicap: Phenotypic Differences between Early- and Late-Born King Penguin Chicks and Their Survival Correlates ». *Functional Ecology* 28, n° 3 (2014): 601-11. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12204>.
- Stier, Antoine, Vincent A. Viblanc, Sylvie Massemin-Challet, Yves Handrich, Sandrine Zahn, Emilio R. Rojas, Claire Sarau, et al. « Starting with a Handicap: Phenotypic Differences between Early- and Late-born King Penguin Chicks and Their Survival Correlates ». Édité par Daniel Costa. *Functional Ecology* 28, n° 3 (juin 2014): 601-11.  
<https://doi.org/10.1111/1365-2435.12204>.
- Stier, Kim Silvana, Bettina Almasi, Julien Gasparini, Romain Piau, Alexandre Roulin, et Lukas Jenni. « Effects of corticosterone on innate and humoral immune functions and oxidative stress in barn owl nestlings ». *Journal of Experimental Biology* 212, n° 13 (1 juillet 2009): 2085-91. <https://doi.org/10.1242/jeb.024406>.
- Stonehouse. « The king penguin *Aptenodytes patagonicus* of South Georgia. » Breeding behavior and development. Falkland Island Dependency Survey Scientific Report (1960): 23, 1-81.
- Stonehouse, B. « The King Penguin (*Aptenodytes patagonica*) of South Georgia: I. Breeding behaviour and development », 1960.  
<https://www.semanticscholar.org/paper/The-King-Penguin-%28Aptenodytes-patagonica%29-of-South-Stonehouse/345089ea89732d1c063c797c2bd6f4090346fa48>.

- St-Pierre, Julie, Julie A. Buckingham, Stephen J. Roebuck, et Martin D. Brand. « Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain ». *The Journal of Biological Chemistry* 277, n° 47 (22 novembre 2002): 44784-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207217200>.
- Taché, Yvette, et Juan M. Saavedra. « Introduction to the Special Issue “The Brain-Gut Axis” ». *Cellular and Molecular Neurobiology* 42, n° 2 (1 mars 2022): 311-13. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01155-7>.
- Tauffenberger, Arnaud, Hubert Fiumelli, Salam Almustafa, et Pierre J. Magistretti. « Lactate and Pyruvate Promote Oxidative Stress Resistance through Hormetic ROS Signaling ». *Cell Death & Disease* 10, n° 9 (10 septembre 2019): 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1877-6>.
- Thompson, David, et Michael A. Fedak. « Cardiac Responses of Grey Seals During Diving at Sea ». *Journal of Experimental Biology* 174, n° 1 (1 janvier 1993): 139-54. <https://doi.org/10.1242/jeb.174.1.139>.
- Thouzeau, Cécile, Yvon Le Maho, Guillaume Froget, Laurence Sabatier, Céline Le Bohec, Jules A. Hoffmann, et Philippe Bulet. « Spheniscins, Avian  $\beta$ -Defensins in Preserved Stomach Contents of the King Penguin, *Aptenodytes Patagonicus* ». *Journal of Biological Chemistry* 278, n° 51 (décembre 2003): 51053-58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306839200>.
- Tilbrook, A.J. « Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences ». *Reviews of Reproduction* 5 (1 mai 2000): 105-13. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0050105>.
- Torres-Medina, Fernando, Sonia Cabezas, Tracy A. Marchant, Martin Wikelski, L. Michael Romero, Michaela Hau, Martina Carrete, José L. Tella, et Julio Blas. « Corticosterone Implants Produce Stress-Hyporesponsive Birds ». *The Journal of Experimental Biology* 221, n° Pt 19 (11 octobre 2018): jeb173864. <https://doi.org/10.1242/jeb.173864>.
- Tou, Janet C., Jacek Jaczynski, et Yi-Chen Chen. « Krill for Human Consumption: Nutritional Value and Potential Health Benefits ». *Nutrition Reviews* 65, n° 2 (février 2007): 63-77. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00283.x>.
- Travers, Marc, Michael Clinchy, Liana Zanette, Rudy Boonstra, et Tony D. Williams. « Indirect Predator Effects on Clutch Size and the Cost of Egg Production ». *Ecology Letters* 13, n° 8 (1 août 2010): 980-88. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01488.x>.
- Traverso, Nicola, Roberta Ricciarelli, Mariapaola Nitti, Barbara Marengo, Anna Lisa Furfaro, Maria Adelaide Pronzato, Umberto Maria Marinari, et Cinzia Domenicotti. « Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013 (2013): 972913. <https://doi.org/10.1155/2013/972913>.
- Treidel, L. A., B. N. Whitley, Z. M. Benowitz-Fredericks, et M. F. Haussmann. « Prenatal exposure to testosterone impairs oxidative damage repair efficiency in the domestic chicken (*Gallus gallus*) ». *Biology Letters* 9, n° 5 (23 octobre 2013): 20130684. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0684>.

- Trounce, I., E. Byrne, et S. Marzuki. « Decline in Skeletal Muscle Mitochondrial Respiratory Chain Function: Possible Factor in Ageing ». *Lancet (London, England)* 1, n° 8639 (25 mars 1989): 637-39. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)92143-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)92143-0).
- Tsahar, Ella, Zeev Arad, Ido Izhaki, et Christopher G. Guglielmo. « The Relationship between Uric Acid and Its Oxidative Product Allantoin: A Potential Indicator for the Evaluation of Oxidative Stress in Birds ». *Journal of Comparative Physiology B* 176, n° 7 (1 septembre 2006): 653-61. <https://doi.org/10.1007/s00360-006-0088-5>.
- Turnbull, Andrew V., et Catherine L. Rivier. « Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanisms of Action ». *Physiological Reviews* 79, n° 1 (janvier 1999): 1-71. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.1>.
- Ulrich-Lai, Yvonne M., et James P. Herman. « Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses ». *Nature reviews. Neuroscience* 10, n° 6 (juin 2009): 397-409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>.
- Vágási, C. I., O. Vincze, L. Pătraș, G. Osváth, A. Marton, L. Bărbos, D. Sol, et P. L. Pap. « Large-Brained Birds Suffer Less Oxidative Damage ». *Journal of Evolutionary Biology* 29, n° 10 (2016): 1968-76. <https://doi.org/10.1111/jeb.12920>.
- Vágási, Csongor I., Laura Pătraș, Péter L. Pap, Orsolya Vincze, Cosmin Mureșan, József Németh, et Ádám Z. Lendvai. « Experimental Increase in Baseline Corticosterone Level Reduces Oxidative Damage and Enhances Innate Immune Response ». *PLOS ONE* 13, n° 2 (12 février 2018): e0192701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192701>.
- Vanstreels, Ralph Eric Thijl, Érika Martins Braga, et José Luiz Catão-Dias. « Blood Parasites of Penguins: A Critical Review ». *Parasitology* 143, n° 8 (juillet 2016): 931-56. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000251>.
- Vendelbo, M. H., et K. S. Nair. « Mitochondrial longevity pathways ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Mitochondria: The Deadly Organelle*, 1813, n° 4 (1 avril 2011): 634-44. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.029>.
- Viblanc, Vincent A., F. Stephen Dobson, Antoine Stier, Quentin Schull, Claire Saraux, Benoit Gineste, Sylvia Pardonnet, Marion Kauffmann, Jean-Patrice Robin, et Pierre Bize. « Mutually honest? Physiological ‘qualities’ signalled by colour ornaments in monomorphic king penguins ». *Biological Journal of the Linnean Society* 118, n° 2 (1 juin 2016): 200-214. <https://doi.org/10.1111/bij.12729>.
- Viblanc, Vincent A., Benoit Gineste, Jean-Patrice Robin, et René Groscolas. « Breeding status affects the hormonal and metabolic response to acute stress in a long-lived seabird, the king penguin ». *General and Comparative Endocrinology* 236 (15 septembre 2016): 139-45. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.07.021>.
- Viblanc, Vincent A., Benoit Gineste, Antoine Stier, Jean-Patrice Robin, et René Groscolas. « Stress Hormones in Relation to Breeding Status and Territory Location in Colonial King Penguin: A Role for Social Density ». *Oecologia* 175, n° 3 (1 juillet 2014): 763-72. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-2942-6>.

- Viblanc, Vincent A., Quentin Schull, Tina Cornioley, Antoine Stier, Jean-Jérôme Ménard, René Groscolas, et Jean-Patrice Robin. « An integrative appraisal of the hormonal and metabolic changes induced by acute stress using king penguins as a model ». *General and Comparative Endocrinology* 269 (1 décembre 2018): 1-10.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.08.024>.
- Viblanc, Vincent A., Andrew D Smith, Benoit Gineste, et René Groscolas. « Coping with Continuous Human Disturbance in the Wild: Insights from Penguin Heart Rate Response to Various Stressors ». *BMC Ecology* 12, n° 1 (2012): 10.  
<https://doi.org/10.1186/1472-6785-12-10>.
- Viblanc, Vincent A., Andrew D. Smith, Benoit Gineste, Marion Kauffmann, et René Groscolas. « Modulation of Heart Rate Response to Acute Stressors throughout the Breeding Season in the King Penguin *Aptenodytes Patagonicus* ». *The Journal of Experimental Biology* 218, n° Pt 11 (juin 2015): 1686-92. <https://doi.org/10.1242/jeb.112003>.
- Viblanc, Vincent A., Victorien Valette, Marion Kauffmann, Nelly Malosse, et René Groscolas. « Coping with Social Stress: Heart Rate Responses to Agonistic Interactions in King Penguins ». *Behavioral Ecology* 23, n° 6 (2012): 1178-85. <https://doi.org/10.1093/beheco/ars095>.
- Villedieu, Camille. « Rôle de la SIRT3 et de la déacétylation des protéines mitochondriales dans la cardioprotection : effet du vieillissement », 2018.
- Voituron, Yann, Rémy Josserand, Jean-François Le Galliard, Claudy Haussy, Damien Roussel, Caroline Romestaing, et Sandrine Meylan. « Chronic Stress, Energy Transduction, and Free-Radical Production in a Reptile ». *Oecologia* 185, n° 2 (1 octobre 2017): 195-203.  
<https://doi.org/10.1007/s00442-017-3933-1>.
- Weimerskirch, H., J. C. Stahl, et P. Jouventin. « The Breeding Biology and Population Dynamics of King Penguins *Aptenodytes Patagonica* on the Crozet Islands ». *Ibis* 134, n° 2 (1992): 107-17. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1992.tb08387.x>.
- Weimerskirch, Henri. « Reproductive Effort in Long-Lived Birds: Age-Specific Patterns of Condition, Reproduction and Survival in the Wandering Albatross ». *Oikos* 64, n° 3 (1992): 464-73. <https://doi.org/10.2307/3545162>.
- Weimerskirch, Henri, Fabrice Le Bouard, Peter Ryan, et Charles Bost. « Massive decline of the world's largest king penguin colony at Ile aux Cochons, Crozet ». *Antarctic Science* 30 (1 août 2018): 236-42. <https://doi.org/10.1017/S0954102018000226>.
- Wingfield, J. C., et R. M. Sapolsky. « Reproduction and Resistance to Stress: When and How ». *Journal of Neuroendocrinology* 15, n° 8 (août 2003): 711-24.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01033.x>.
- Wingfield, J.C., et L. Romero. « Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates ». *McEwen, B.S. (Ed.), Handbook of Physiology, Section 7: The Endocrine System* 4 (1 janvier 2001): 211-36.

- Wingfield, John C., Donna L. Maney, Creagh W. Breuner, Jerry D. Jacobs, Sharon Lynn, Marilyn Ramenofsky, et Ralph D. Richardson. « Ecological Bases of Hormone-Behavior Interactions: The Emergency Life History Stage ». *American Zoologist* 38, n° 1 (1998): 191-206. <https://doi.org/10.1093/icb/38.1.191>.
- Wingfield, John C., Michael C. Moore, et Donald S. Farner. « Endocrine Responses to Inclement Weather in Naturally Breeding Populations of White-Crowned Sparrows (*Zonotrichia leucophrys pugetensis*) ». *The Auk* 100, n° 1 (1 janvier 1983): 56-62. <https://doi.org/10.1093/auk/100.1.56>.
- Wingfield, John C., Kathleen M. O'Reilly, et Lee B. Astheimer. « Modulation of the Adrenocortical Responses to Acute Stress in Arctic Birds: A Possible Ecological Basis ». *American Zoologist* 35, n° 3 (juin 1995): 285-94. <https://doi.org/10.1093/icb/35.3.285>.
- Wingfield, J. C., et R. M. Sapolsky. « Reproduction and Resistance to Stress: When and How ». *Journal of Neuroendocrinology* 15, n° 8 (août 2003): 711-24. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01033.x>.
- Wingfield, John C., et L. Michael Romero. « Adrenocortical Responses to Stress and Their Modulation in Free-Living Vertebrates ». In *Comprehensive Physiology*, 211-34. John Wiley & Sons, Ltd, 2011. <https://doi.org/10.1002/cphy.cp070411>.
- Wingfield, John, et L. Romero. *Tempests, Poxes, Predators, and People: Stress in Wild Animals and How They Cope*, 2015. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195366693.001.0001>.
- Wright, P. A. « Nitrogen Excretion: Three End Products, Many Physiological Roles ». *The Journal of Experimental Biology* 198, n° Pt 2 (février 1995): 273-81. <https://doi.org/10.1242/jeb.198.2.273>.
- Wu, Lily L., Chiu-Chian Chiou, Pi Yueh Chang, et James T. Wu. « Urinary 8-OHdG: A Marker of Oxidative Stress to DNA and a Risk Factor for Cancer, Atherosclerosis and Diabetics ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 339, n° 1-2 (janvier 2004): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2003.09.010>.
- Yue, Peng, Siyuan Jing, Lei Liu, Fan Ma, Yi Zhang, Chuan Wang, Hongyu Duan, et al. « Association between mitochondrial DNA copy number and cardiovascular disease: Current evidence based on a systematic review and meta-analysis ». *PLoS ONE* 13, n° 11 (7 novembre 2018): e0206003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206003>.
- Yun, Jeanho, et Toren Finkel. « Mitohormesis ». *Cell Metabolism* 19, n° 5 (6 mai 2014): 757-66. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.011>.
- Zafir, Ayesha, et Naheed Banu. « Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats ». *Stress* 12, n° 2 (1 janvier 2009): 167-77. <https://doi.org/10.1080/10253890802234168>.
- Zelenka, Jaroslav, Aleš Dvořák, et Lukáš Alán. « Lactate Protects Skin Fibroblasts against Aging-Associated Mitochondrial Dysfunction via Mitohormesis ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015 (10 juin 2015): e351698. <https://doi.org/10.1155/2015/351698>.

Zenteno-Savin, T., J. St Leger, et P. J. Ponganis. « Hypoxemic and Ischemic Tolerance in Emperor Penguins ». *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP* 152, n° 1 (juin 2010): 18-23.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.02.007>.

Zglinicki, Thomas « Oxidative Stress Shortens Telomeres ». *Trends in Biochemical Sciences* 27, n° 7 (juillet 2002): 339-44. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02110-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02110-2).

## Annexes

### *Annexe 1: Protocole chirurgical pour la pose d'un implant sous cutané de Caroline Gérard*

#### **Pose d'un implant de corticostérone en sous-cutané en région dorsale sur un manchot adulte au stade couveur**

##### **Matériel :**

- Implant de corticostérone (100 mg à libération prolongée sur 90 jours) ou placebo
  - o NB : en prévoir 2 sur le terrain en cas de souillure
  - o NB2 : conditionnement individuel dans un ziplock neuf ou un pilulier nettoyé à la Chlorhexidine et séché (compresses stériles au fond).

#### **Toujours le garder au sec !**

- Boîte d'instruments stérile (prévoir 1h30 à 2h à l'autoclave) :
  - o porte-lame
  - o ciseaux de Metzemaum
  - o pince
  - o compresses
  - o clamp courbe
  - o porte-aiguille
- Gants stériles (prévoir 2 paires)
- Gel hydro-alcoolique
- Compresses imbibées de Chlorhexidine
- Compresses imbibées de Mercryl
- 2 clamps non stériles
- Fil de suture tressé 3-0 ou 2-0 (en prévoir 2)
- Seringue 1 mL+ aiguille orange contenant 0.25 mL de Xylocaïne adrénalinée
- 2 seringues 2.5 mL+ aiguille verte contenant au total 3.5 mL de Rilexine (Céfalexine 50mg/kg)
- Seringue 1 mL contenant quelques gouttes d'adrénaline

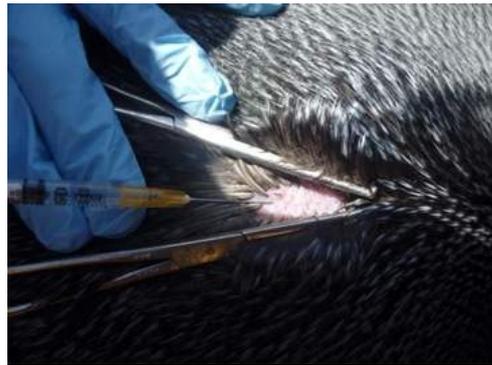


##### **Procédure :**

- Réaliser toutes les étapes précédant la chirurgie avec des gants en latex afin de garder les mains les plus propres possibles (idem pour l'aide non stérile).  
NB : possibilité de commencer la manipulation avec 2 paires de gants et d'en retirer une avant de commencer la préparation et l'asepsie de la zone d'incision.
- L'idéal est de réaliser cette procédure avec 3 personnes :
  - o Un chirurgien « stérile »
  - o Une aide non stérile mais le plus propre possible
  - o Un manipulateur « sale » qui gère la contention de l'animal

- Injection de la Rilexine (3.5mL) en intra-musculaire en 2 points distincts dans la zone pectorale.
- Epiler la zone d'incision sur une largeur de 1,5 cm environ et 3 cm de longueur dans la zone médiale entre les épaules.
- Disposer les clamps non stériles de part et d'autre de la zone épilée afin de maintenir les plumes périphériques. Il est impossible d'utiliser un champ chirurgical dans ces conditions.

- Passer une première compresse de Chlorhexidine avant de réaliser l'injection traçante sous-cutanée de Xylocaïne adrénalinée (0.25 mL)



- Débuter l'asepsie de la zone (scrub) en alternant les compresses de Mercryl (faire mousser) et de Chlorhexidine à 3 reprises. Veiller à bien élargir la zone nettoyée jusqu'aux clamps (toujours du centre vers la périphérie).
- Retirer la 2e paire de gants non stériles et utiliser le gel hydro-alcoolique avant d'enfiler les gants stériles.

NB : S'il n'y a que 2 personnes, veiller à préparer le matériel avant d'enfiler les gants stériles : ouverture de la boîte, préparation de la lame et du fil, etc. Le risque majeur dans ce cas est d'avoir des projections de boue/guano dans la boîte... D'où l'intérêt de l'aide, qui peut ouvrir et refermer la boîte au fur et à mesure.

NB2 : Si l'aide est présente, elle peut enfiler une paire de gants non stériles propres.

- Réaliser une incision de 2.5 cm de longueur puis former une poche de 1cm de diamètre en aval de l'incision en dilacérant les tissus à l'aide des ciseaux de Metzembaum. Il est inutile de tenter d'arrêter les saignements avant d'avoir terminé la poche.
- Prendre ensuite le temps de réaliser une très bonne hémostase afin de limiter la dissolution trop rapide de l'implant. Il est possible d'injecter une ou plusieurs gouttes d'adrénaline à l'intérieur de la plaie pour favoriser l'arrêt des saignements.



- Lorsque les saignements ont cessé, insérer l'implant dans la poche sans toucher les bords de la plaie (non stériles).



- Refaire une hémostase en cas de besoin et réaliser 3 ou 4 points simples selon la longueur de l'incision.

- Nettoyer la zone à l'aide d'une compresse de Chlorhexidine essorée afin d'éviter tout écoulement de liquide à l'intérieur de la plaie. Retirer les clamps et rabattre les plumes périphériques sur la plaie.



**Remarques :**

- En cas de pluie, prévoir une protection (type clipboard waterproof) pour abriter la zone chirurgicale et l'implant. L'idéal étant de passer entre les gouttes...
- Garder une veste « propre » et utilisée uniquement pour cette procédure (pour les manches surtout).
- La personne responsable de la contention est très importante car si l'oiseau bouge, les saignements reprennent, l'incision bouge et la zone peut être souillée. En cas d'énerverment de l'animal, ne pas hésiter à masser la poche incubatrice et à solliciter le réflexe vagal par une légère pression de l'œil (valable pour toutes les procédures). Les 2 mains du manipulateur sont souvent prises et peuvent difficilement être employées pour la procédure en elle-même.

**Annexe 2 : Protocole expérimental BiCinchoninic acid Assay, mesure des protéines.**

Pour la manipulation, on effectue selon les recommandations du fabricant, un mix des réactifs A (tampon carbonaté contenant un réactif BCA) et B (solution de sulfate de cuivre) tel que la proportion de soit de 1 de B pour 50 de A.

Les échantillons sont dilués au 5ème avec du tampon PBS.

Des blancs et des standards sont aussi préparés, puis, dans une plaque de biochimie, on pipette 10 µL d'échantillons/blancs/standards et on y ajoute 200 µL du mix. Le tout est incubé 5 min à température ambiante et lu à 480 nm au spectrophotomètre (Epoch 2 microplate reader Biotek).

**Annexe 3 : Protocole expérimental de dosage de la corticostérone plasmatique : Enzyme immunoassay kit detect X® Arbor Assays.**

On débute par quelques étapes préliminaires :

- Les échantillons de plasma sont traités avec un tampon de dissociation afin d'obtenir des valeurs de corticostérone totale en dissociant la corticostérone liée aux protéines de transport à volumes égaux. Après 5 minutes d'incubation, ils sont dilués au 12ème avec le tampon de dilution.
- Les standards sont préparés selon les directives du fabricant (50 µL de solution mère de corticostérone dans 450 µL de tampon de dilution puis dilution en série pour obtenir 9 standards).

Dans la plaque couverte d'un anticorps de capture de lapin fourni par le fabricant du kit : on effectue les dépôts selon les directives du fabricant soit 50 µL des échantillons/standards contenant un antigène ; 75 µL de tampon de dilution pour les blancs ; 50 µL dans les puits B0 (coloration maximale).

Par la suite, sur toute la plaque, 25 µL de conjugué de peroxydase-corticostérone est ajouté et la réaction de liaison est initiée par l'ajout de 25 µL d'un anticorps polyclonal de la corticostérone.

Après une heure d'incubation à température ambiante en étant agité doucement, la plaque est vidée puis lavée 4 fois avec 300 µL de tampon de lavage par puits.

Enfin, 100 µL de substrat sont ajoutés (TMB), le substrat réagit avec le conjugué de peroxydase-corticostérone lié. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la réaction est stoppée avec 50 µL de stop solution et l'intensité de la coloration mesurée à 450 nm (Epoch 2 microplate reader Biotek).

*Annexe 4 : Protocole expérimental de dosage du glucose Glucose GLUC-PAP, Randox laboratories.*

Sur une plaque de biochimie, on pipette 4 µL de plasma/calibrateur/ ou d'eau pour le blanc auxquels on ajoute 200 µL de réactif (4-aminophenazone ; Glucose oxidase ; Peroxidase ; Phenol).

La plaque de biochimie est incubée 10 minutes à 37°C et ensuite lue au spectrophotomètre à 500 nm (Epoch 2 microplate reader Biotek).

*Annexe 5 : Protocole expérimental de dosage du lactate L-Lactate (LAC) Randox laboratories.*

Sur une plaque de biochimie, on dépose 4 µL de standard fourni par le kit, 4 µL d'eau pour le blanc et 4 µL de plasma pour les échantillons. On y ajoute 200 µL de réactif (TOOS ; 4-aminophenazone ; Peroxidase ; Lactate oxidase ; Ascorbate oxidase). Le tout est incubé 5 min à 37°C puis lu sous spectrophotomètre à 550 nm (Epoch 2 microplate reader Biotek).

*Annexe 6 : Protocole expérimental de dosage des triglycérides : Triglycerides (TRIGS), Randox laboratories.*

Sur une plaque de biochimie, on dépose 4 µL de plasma/standard/blanc, on y ajoute 200 µL de réactif (Péroxidase ; Glycérol kinase ; Glycérol-3-phosphate oxydase ; 4-Aminoantipyrine ; Lipases ; 4-chlorophénol). Le tout est incubé 5 min à 37°C puis lu sous spectrophotomètre à 500 nm (Epoch 2 microplate reader Biotek).

*Annexe 7 : Protocole expérimental de dosage de l'acide urique : uric acid (UA) Randox laboratories.*

Sur une plaque de biochimie :

- On dépose 4 µL d'échantillon/standard/blanc
- On y ajoute 200 µL de réactif par puits (Acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique ; 4-Aminophénazone ; Peroxidase ; Uricase).

Le tout est incubé 5 min à 37°C puis lu sous spectrophotomètre à 520 nm (Epoch 2 microplate reader Biotek).

*Annexe 8 : Protocole expérimental OXY test : capacité antioxydante totale du plasma, DIACRON (Stier et al. 2012).*

On commence par réaliser des dilutions au 1/100<sup>ème</sup> des échantillons et du calibrateur (198 µL H<sub>2</sub>O + 2 µL plasma) puis on “vortexe” vigoureusement.

Dans une plaque, on dépose 5 µL d’H<sub>2</sub>O pour les blancs / 5 µL de calibrateur dilué pour les calibrateurs / 5 µL de plasma dilué pour les échantillons à tester.

On ajoute ensuite 200 µL de R1 dans chaque puits puis on couvre la plaque et on agite 10 min à 37°C à environ 1000 rpm.

Pour finir, on ajoute rapidement 2 µL de R2 (Chromogène), on agite 10 secondes et on effectue une lecture immédiate à 510 nm (Epoch 2 microplate reader Biotek).

*Annexe 9 : Protocole expérimental du dosage de la superoxide dismutase : RANSOD, Randox laboratories.*

Les standards sont préparés selon les directives du fabricant avec modifications des volumes tels que :

Standard	volume de standard	volume de PBS
S0	0 µL	40 µL
S1	Standard non dilué	0 µL
S2	20 µL de S1	20 µL
S3	20 µL de S2	20 µL
S4	20 µL de S3	20 µL
S5	20 µL de S4	40 µL

Les échantillons sont dilués au 20<sup>ème</sup> : 10 µL d’échantillon pour 190 µL de PBS.

Sur une plaque de biochimie, on dépose 6 µL de plasma/standard/blanc auxquels on ajoute 200 µL de solution R1. Ensuite on ajoute 30 µL de R2 dans chaque puits.

Enfin, on lit à 505 nm, l'absorbance initiale A1 après 30 secondes puis A2, 3 minutes après (Epoch 2 microplate reader Biotek).

*Annexe 10 : Protocole expérimental du dosage de la glutathione peroxydase : RANSEL, Randox laboratories.*

Les réactifs sont préparés selon les directives du fabricant. Les échantillons sont dilués au  $\frac{1}{5}$  avec R3 soit 20  $\mu\text{L}$  de plasma et 80 $\mu\text{L}$  de R3.

Sur une plaque, on pipette :

	Echantillon	Blanc
Échantillon dilué	4 $\mu\text{L}$	
H <sub>2</sub> O distillée		4 $\mu\text{L}$
R1	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
R2	8 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$

Puis on mixe en tapotant sur les bords de la plaque et on lit l'absorbance à 340 nm après 1 minute, 2 minutes et 3 minutes (Epoch 2 microplate reader Biotek).

*Annexe 11 : Protocole expérimental du dosage des métabolites réactifs de l'oxygène dans le plasma, DIACRON (Stier et al. 2012).*

On fera attention à garder au maximum les échantillons et contrôles sur glace. Les dépôts dans les puits de la plaque de biochimie ont lieu sur glace.

Les réactifs utilisés sont R1 : réactif chromogénique (alkyl-amine aromatique de concentration 10%) et R2: tampon acétate pH 4.8.

On commence par préparer un **mix de réaction** tel que :

(Nb de puits + 5) x (200  $\mu\text{L}$  R2 + 2  $\mu\text{L}$  R1).

Puis sur une plaque, on dépose 4  $\mu\text{L}$  d'H<sub>2</sub>O pour les blancs / 4  $\mu\text{L}$  de calibrateur pour les calibrateurs / 4  $\mu\text{L}$  de plasma pour les échantillons à tester.

Ensuite dans chaque puits, il faut déposer 200 µL de Mix puis couvrir (couvercle autocollant), agiter puis incuber à 37°C pendant 75 minutes. Lire à 510 nm (Epoch 2 microplate reader Biotek).

*Annexe 12 : Protocole expérimental d'extraction ADN pour qPCR : NucleoSpin® Blood QuickPure.*

Pour réaliser l'extraction :

1) *Lyse des échantillons sanguins*

- On débute par diluer 4 µL du culot de globules rouges, avec 200 µL de PBS.
- Au même tube, on ajoute 10 µL de RNase afin d'éliminer les acides ribonucléiques, ainsi que 25 µL de protéinase K puis 200 µL de tampon de lyse BQ1. On vortexe vigoureusement puis on incube ensuite les tubes 15 minutes à 70 °C en vortexant toutes les 5 minutes.

2) *Ajustement des conditions de liaison de l'ADN* : Ajouter 200 µL d'éthanol et vortexer

3) *Liaison de l'ADN à la colonne* : On charge l'échantillon sur la colonne et on centrifuge 1 minute à 11 000 g

4) *Lavage et séchage de la membrane de silice*

On réalise une succession de lavage : avec 350 µL de tampon BQ2 puis centrifuger 1 minute à 11 000 g et enfin 200 µL de tampon BQ2 puis centrifuger 3 minutes à 11 000g.

5) *Elution de l'ADN*

- L'ADN est élué avec 50 µL de tampon d'éluion préchauffé à 70°C, on incube 1 minute et on centrifuge 1 minute à 11 000 g.

*Annexe 13 : Protocole expérimental de digestion de l'ADN adapté de Quinlivan et Gregory (2008).*

Pour 100 échantillons d'ADN, préalablement extraits et élués :  
ajouter dans un tube falcon :

- 5 mL de Tampon Tris-HCl (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM)
- 250 U de benzonase nuclease (Sigma #E1014-5KU)
- 200 U de phosphatase alcaline (Sigma #P7923-2KU)
- 300 mU de phosphodiesterase I (Sigma #P3243-1VL) en solution fraîche eau mQ

Les échantillons sont préparés dans un tube Eppendorf, tels que la solution d'ADN soit à 50 ng/mL dans 20 µL (diluer avec le tampon d'éluion utilisé lors de l'extraction d'ADN).

Ensuite, y ajouter 50 µL de mix de digestion et incuber 6 heures à 37°C.

*Annexe 14 : Protocole expérimental de dosage des dommages de l'ADN : 8-OHdG, Arbor Assays.*

Dans une plaque de microtitrage recouverte d'un anticorps :

- On pipette 50µL dans les puits pour les standards/plasma pour les échantillons/tampon pour B0 (couleur maximale) ; 75 µL de tampon pour les blancs ;
- On ajoute 25 µL de DetectX® conjugué de 8-hydroxyguanosine dans tous les puits sauf dans les puits des blancs ;
- Puis, la réaction de liaison est amorcée par l'ajout de 25 µL de DetectX® anticorps monoclonal marqué de la peroxydase pour la 8-OHdG ;
- On couvre la plaque d'un film collant et on l'agite doucement durant une incubation de 2 heures à température ambiante à l'abri de la lumière ;
- La plaque est vidée, tapotée sur papier absorbant pour retirer le liquide et lavée 4 fois par l'ajout de 300 µL de tampon de lavage dans chaque puits (on vide et tapote la plaque sur papier absorbant entre chaque lavage) ;
- Ensuite, 100 µL de substrat ajouté (TMB) et la plaque est de nouveau incubée 30 minutes à température ambiante sans agiter ;
- Le substrat réagit avec l'anticorps marqué peroxydase qui a réagi avec le conjugué lié.

- La réaction est stoppée par l'ajout de 50  $\mu\text{L}$  de stop solution dans chaque puits.

Après l'arrêt de la réaction, l'intensité de la couleur générée est détectée à 450 nm (Epoch 2 microplate reader Biotek).

**Annexe 15 : Protocole expérimental de la qPCR avec micPCR et SYBR green.**

Pour effectuer la qPCR, on commence par diluer l'ADN avec de l'eau milliQ pour obtenir une concentration 0.6ng/ $\mu\text{L}$  dans 1 mL en fonction des concentrations mesurées lors des extractions avec un spectrophotomètre de type Nanodrop™ (1.5  $\mu\text{L}$  ; mesure dupliquée puis moyenne faite entre les mesures).

Afin de construire une courbe étalon, nous avons préparé un mix de plusieurs échantillons provenant de notre étude à 6 ng, 3 ng, 1.5 ng et d'un échantillon contrôle positif.

Ensuite les mix contenant les primers et le SYBR sont préparés tels que :

A	RAG1.3 400 nm		
1	Mix SYBR (7 $\mu\text{L}$ par puits)		
		Par puits ( $\mu\text{L}$ )	Mix ( $\mu\text{L}$ )
	H2O	0.52	28
	Primer forward	0.24	12
	Primer reverse	0.24	12
	SYBR	6	312
2	ADN à 0.6 ng/ $\mu\text{L}$ (5 $\mu\text{L}$ par puits)		

A	Télo 300 nm		
1	Mix SYBR (7 $\mu$ L par puits)		
		Par puits ( $\mu$ L)	Mix ( $\mu$ L)
	H2O	0.64	33.3
	Primer forward	0.18	9.36
	Primer reverse	0.18	9.36
	SYBR	6	312
2	ADN à 0.6 ng/ $\mu$ L (5 $\mu$ L par puits)		

A	COI2.4 150 nm		
1	Mix SYBR (7 $\mu$ L par puits)		
		Par puits ( $\mu$ L)	Mix ( $\mu$ L)
	H2O	0.7	36.4
	Primer forward	0.15	7.8
	Primer reverse	0.15	7.8
	SYBR	6	312
2	ADN à 0.6 ng/ $\mu$ L (5 $\mu$ L par puits)		

Les galeries de tubes sont fournies par Bio Molecular Systems pour correspondre à l'appareil.

Une fois les mix amorces-SYBR préparés, on en dépose 7  $\mu$ L par puits.

Les échantillons sont ajoutés en duplicats sur la plaque à raison de 5  $\mu$ L par puits.

Les puits sont fermés par des capuchons également fournis.

Les conditions de la PCR sont :

- 95°C, 3 minutes - 95°C, 5 secondes - 60°C, 25 secondes : 25 fois pour Télo, 35 fois COI2, 38 fois pour RAG1

KP\_NARESICA\_Plate2 (ER)

KP_Plate1'		16/03/2023							
	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	Mix_6ng		Mix_3ng		Mix_1.5ng		STD_H27		
B	76		77		78		79		
C	60		61		62		63		
D	52		53		54		55		
E	31		32		33		34		
F	88		89		90		91		
	1	2	3	4	5	6	7	8	

qPCR conditions: 95°C 3min - 95°C 5s, 60°C 25s, fluo reading : 25x telo, 35x COI2, 38x RAG1			
DNA dilutions (0.6ng/uL)			
ID	[DNA]i	V_DNA	V_H2O
76	205,5	2,92	997
77	167,3	3,59	996
78	167,4	3,58	996
79	185,9	3,23	997
60	120,8	4,97	995
61	124,0	4,84	995
62	152,8	3,93	996
63	226,7	2,65	997
52	289,2	2,07	998
53	225,4	2,66	997
54	158,7	3,78	996
55	213,7	2,81	997
31	76,0	7,90	992
32	95,1	6,31	994
33	62,4	9,62	990
34	54,9	10,92	989
88	171,1	3,51	996
89	91,1	6,58	993
90	147,5	4,07	996
91	239,8	2,50	997

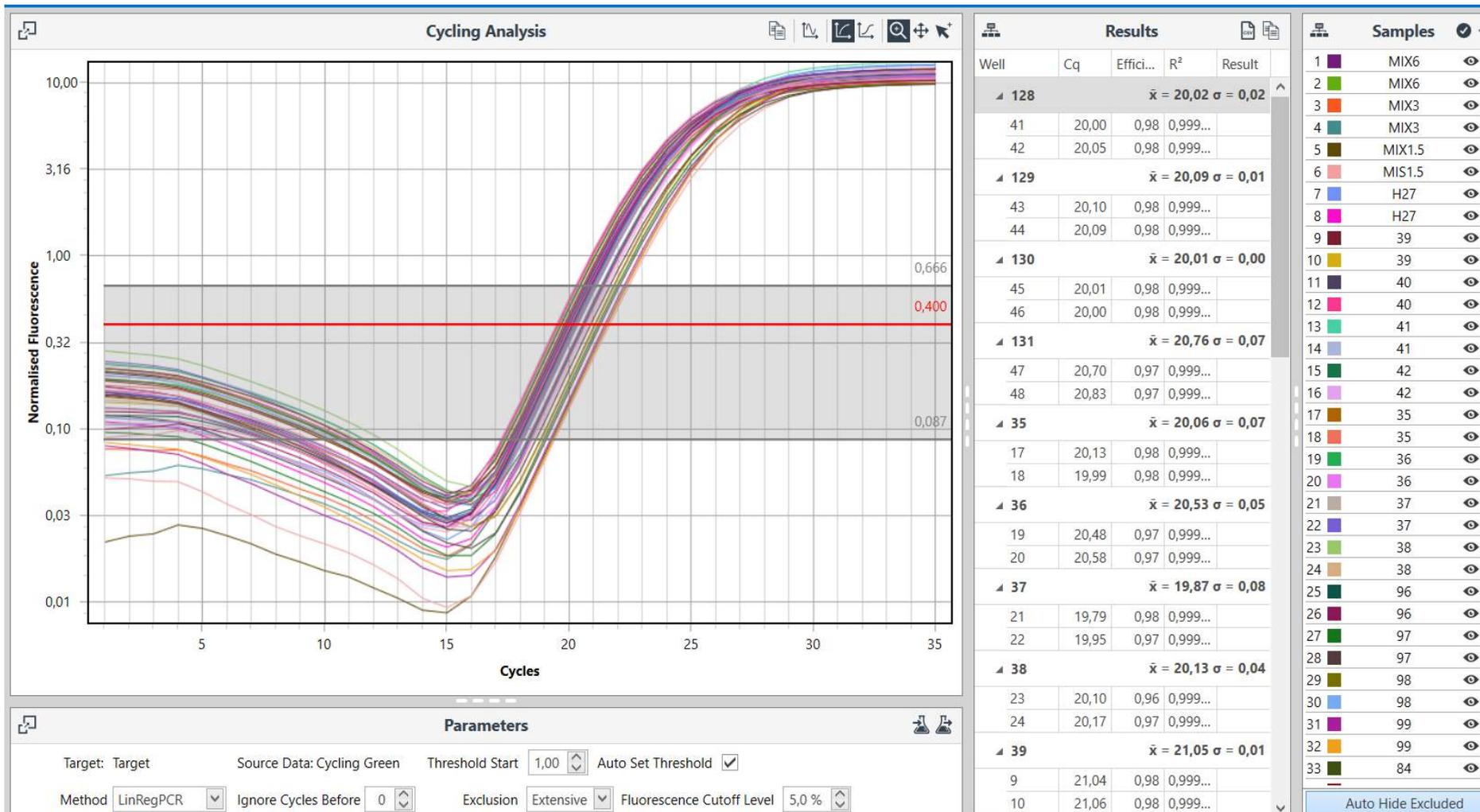
  

A	RAG1.3 400nM		
1	Mix SYBR (7uL/well)		
	well	Mix	
	H2O	0,52	28
	PrF	0,24	12
	PrR	0,24	12
	SYBR	6	312
2	gDNA 0.6ng/uL: 5uL/well		

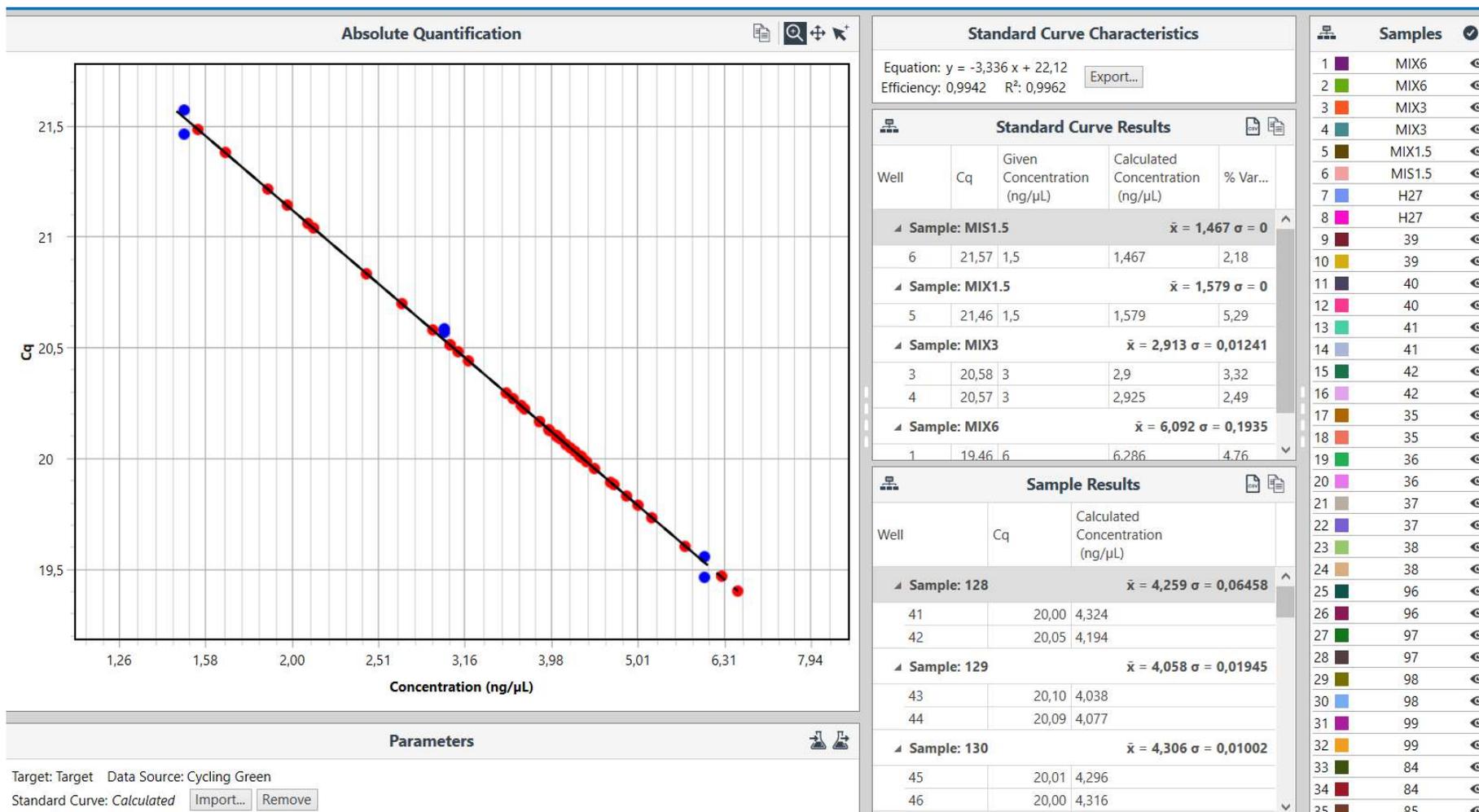
B	Telo300		
1	Mix SYBR (7uL/well)		
	well	Mix	
	H2O	0,64	33,3
	PrF	0,18	9,36
	PrR	0,18	9,36
	SYBR	6	312
2	gDNA 0.6ng/uL: 5uL/well		

C	COI2.4 150nM		
1	Mix SYBR (7uL/well)		
	well	Mix	
	H2O	0,7	36,4
	PrF	0,15	7,8
	PrR	0,15	7,8
	SYBR	6	312
2	gDNA 0.6ng/uL: 5uL/well		

Annexe 16: Exemple de plan de plaque de qPCR avec micPCR



*Annexe 17 : Exemple de résultats d'une PCR micPCR, on retrouve le Cq, l'efficacité et le R2 des duplicats.*



*Annexe 18 : Exemple de quantification des échantillons avec courbe étalon d'une PCR avec micPCR.*

### Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>

Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Constante	1	4,944	13,339	,015
Group	1	41,074	,065	,800
Sex	1	41,516	,321	,574
Stade	3	119,239	7,285	<,001
Group * Sex	1	41,340	,769	,386
Group * Stade	3	119,266	10,212	<,001
Sex * Stade	3	119,238	,345	,793
Notehémolyse	1	133,031	,004	,947

a. Variable dépendante : [CORT]\_4PLC.

### Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>

Stade	Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Before	Constante	1	9,029	2,848	,126
	Group	1	37,343	,492	,487
	Sex	1	37,439	1,604	,213
	Group * Sex	1	37,551	1,653	,206
	Notehémolyse	1	37,805	2,051	,160
J6	Constante	1	8,552	20,042	,002
	Group	1	37,367	12,533	,001
	Sex	1	37,346	,088	,768
	Group * Sex	1	37,511	,311	,580
	Notehémolyse	1	39,513	,144	,706
R1	Constante	1	9,532	13,236	,005
	Group	1	34,889	,015	,904
	Sex	1	34,834	,756	,390
	Group * Sex	1	34,799	1,435	,239
	Notehémolyse	1	35,440	1,042	,314
R2	Constante	1	26,104	2,047	,164
	Group	1	30,465	1,025	,319
	Sex	1	30,902	,269	,608
	Group * Sex	1	30,910	,095	,760
	Notehémolyse	1	31,510	,082	,776

a. Variable dépendante : [CORT]\_4PLC.

**Annexe 19** : Effets fixes et effets fixes par stade de la concentration en corticostérone ; Sont étudiés les effets de groupes, de sexe, de stade, de note d'hémolyse ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade, sexe-stade.

**Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>**

Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Constante	1	11,189	1463,043	<,001
Group	1	40,081	,020	,888
Sex	1	43,708	,041	,841
Group * Sex	1	43,641	2,478	,123
Stade	3	121,631	,794	,500
Sex * Stade	3	122,283	3,309	,022
Group * Stade	3	121,662	2,648	,052
Notehémolyse	1	155,092	23,901	<,001

a. Variable dépendante : Glycémie en g/L .

**Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>**

Stade	Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Before	Constante	1	21,212	411,269	<,001
	Group	1	37,370	1,838	,183
	Sex	1	37,828	1,244	,272
	Group * Sex	1	37,756	6,084	,018
	Notehémolyse	1	39,054	2,980	,092
J6	Constante	1	22,770	695,435	<,001
	Group	1	38,356	2,820	,101
	Sex	1	38,336	4,182	,048
	Group * Sex	1	38,923	4,780	,035
	Notehémolyse	1	41,750	13,545	<,001
R1	Constante	1	20,642	961,503	<,001
	Group	1	36,189	,188	,668
	Sex	1	35,979	,414	,524
	Group * Sex	1	36,136	5,109	,030
	Notehémolyse	1	37,270	4,250	,046
R2	Constante	1	40,395	290,016	<,001
	Group	1	36,323	,010	,921
	Sex	1	36,029	1,183	,284
	Group * Sex	1	35,903	,122	,729
	Notehémolyse	1	37,259	7,667	,009

a. Variable dépendante : Glycémie en g/L .

*Annexe 20 : Effets fixes et effets fixes par stades de la concentration en glucose; Sont étudiés les effets de groupe, de sexe, de stade, de note d'hémolyse ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade, sexe-stade.*

### Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>

Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Constante	1	155,000	133,276	<,001
Group	1	155,000	,205	,651
Sex	1	155,000	1,527	,218
Stade	3	155,000	,767	,514
Group * Sex	1	155,000	,263	,609
Group * Stade	3	155,000	,896	,445
Sex * Stade	3	155,000	2,033	,112
Notehémolyse	1	155,000	,744	,390

a. Variable dépendante : [LAC] en g/L.

**Annexe 21** : Effets fixes de la concentration en lactate; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade.

**Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>**

Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Constante	1	38,679	191,495	<,001
Group	1	40,561	,185	,669
Sex	1	41,536	49,860	<,001
Stade	3	118,301	20,811	<,001
Group * Sex	1	41,236	1,461	,234
Group * Stade	3	118,663	1,359	,259
Sex * Stade	3	118,630	23,468	<,001
Notehémolyse	1	157,010	1,575	,211

a. Variable dépendante : [TRIGS] en g/L.

**Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>**

Stade	Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
before	Constante	1	40	42,223	<,001
	Group	1	40	,204	,654
	Sex	1	40	38,849	<,001
	Group * Sex	1	40	1,750	,193
	Notehémolyse	1	40	,232	,633
J6	Constante	1	16,427	109,558	<,001
	Group	1	36,283	9,341	,004
	Sex	1	38,550	5,493	,024
	Group * Sex	1	36,186	,003	,954
	Notehémolyse	1	38,993	1,735	,196
R1	Constante	1	38	100,125	<,001
	Group	1	38	,446	,508
	Sex	1	38	20,325	<,001
	Group * Sex	1	38	1,291	,263
	Notehémolyse	1	38	1,076	,306
R2	Constante	1	30,913	27,940	<,001
	Group	1	31,612	,023	,881
	Sex	1	32,041	3,118	,087
	Group * Sex	1	33,052	1,539	,224
	Notehémolyse	1	33,675	3,215	,082

a. Variable dépendante : [TRIGS] en g/L.

**Annexe 22** : Effets fixes de la concentration en triglycérides; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade.

**Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>**

Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Constante	1	6,562	56,003	<,001
Group	1	154,841	5,036	,026
Stade	3	154,020	7,926	<,001
Sex	1	155,293	25,498	<,001
Group * Stade	3	154,422	2,029	,112
Group * Sex	1	154,782	,943	,333
Stade * Sex	3	154,162	13,857	<,001
Notehémolyse	1	154,651	2,198	,140

a. Variable dépendante : [UA] en g/L.

**Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>**

Stade	Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
before	Constante	1	19,458	30,037	<,001
	Group	1	39,848	,423	,519
	Sex	1	39,999	25,664	<,001
	Group * Sex	1	37,711	,102	,751
	Notehémolyse	1	37,107	,557	,460
J6	Constante	1	8,978	30,749	<,001
	Group	1	35,894	12,140	,001
	Sex	1	37,166	3,730	,061
	Group * Sex	1	36,136	,601	,443
	Notehémolyse	1	37,852	2,598	,115
R1	Constante	1	13,445	73,360	<,001
	Group	1	37,292	,253	,618
	Sex	1	37,333	2,016	,164
	Group * Sex	1	35,741	,336	,566
	Notehémolyse	1	36,278	,813	,373
R2	Constante	1	22,893	24,974	<,001
	Group	1	30,625	,174	,680
	Sex	1	30,673	,371	,547
	Group * Sex	1	30,288	,905	,349
	Notehémolyse	1	31,501	1,028	,318

a. Variable dépendante : [UA] en g/L.

**Annexe 23 :** Effets fixes et effets fixes par stades de la concentration en acide urique; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade.

**Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>**

Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Constante	1	3,810	251,518	<,001
Group	1	38,708	2,397	,130
Sex	1	46,030	6,082	,017
Stade	3	110,383	,429	,732
Group * Sex	1	45,875	,713	,403
Group * Stade	3	110,359	2,058	,110
Sex * Stade	3	110,404	,763	,517
Notehémolyse	1	124,387	,147	,702

a. Variable dépendante : OXY.

**Annexe 24** : Effets fixes de la capacité antioxydante totale; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade, de note d'hémolyse ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade.

**Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>**

Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Constante	1	22,013	4,993	,036
Sex	1	30,247	,801	,378
Stade	3	88,786	,283	,838
Group	1	30,105	2,333	,137
Sex * stade	3	89,238	2,186	,095
Sex * Group	1	33,175	,152	,699
Stade * Group	3	89,305	1,896	,136
BCA	1	112,410	2,471	,119

a. Variable dépendante : SOD.

*Annexe 25 : Effets fixes de la concentration en SOD; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade, de BCA ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade.*

**Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>**

Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Constante	1	27,400	2,629	,116
sex	1	40,448	,111	,741
stade	3	116,156	2,054	,110
Group	1	40,813	,156	,695
sex * stade	3	115,458	,849	,470
sex * Group	1	42,823	,508	,480
stade * Group	3	115,653	1,204	,312
BCA	1	138,536	88,717	<,001

a. Variable dépendante : GPx.

*Annexe 26 : Effets fixes de la concentration en GPx; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe et groupe-stade.*

### Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>

Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Constante	1	3,713	4,733	,100
Group	1	37,056	1,047	,313
Sex	1	37,578	3,143	,084
Stade	3	109,701	9,034	<,001
Group * Sex	1	37,506	,011	,916
Group * Stade	3	109,975	,411	,746
Sex * Stade	3	109,899	1,963	,124
Notehémolyse	1	137,651	17,682	<,001

a. Variable dépendante : dROMs.

### Comparaisons appariées<sup>a</sup>

(I) Stade	(J) Stade	Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	ddl	Sig. <sup>c</sup>	Intervalle de confiance à 95 % pour la différence <sup>c</sup>	
						Borne inférieure	Borne supérieure
before	J6	,187	,585	108,202	,749	-,972	1,347
	R1	1,118	,597	109,325	,064	-,066	2,302
	R2	2,927*	,621	111,770	<,001	1,697	4,158
J6	before	-,187	,585	108,202	,749	-1,347	,972
	R1	,931	,597	108,210	,122	-,254	2,115
	R2	2,740*	,620	110,790	<,001	1,512	3,968
R1	before	-1,118	,597	109,325	,064	-2,302	,066
	J6	-,931	,597	108,210	,122	-2,115	,254
	R2	1,809*	,631	110,393	,005	,559	3,059
R2	before	-2,927*	,621	111,770	<,001	-4,158	-1,697
	J6	-2,740*	,620	110,790	<,001	-3,968	-1,512
	R1	-1,809*	,631	110,393	,005	-3,059	-,559

Basées sur les moyennes marginales estimées

\*. La différence moyenne est significative au niveau ,05.

a. Variable dépendante : dROMs.

c. Ajustement pour les comparaisons multiples : Différence la moins significative (aucun ajustement).

**Annexe 27 : Effets fixes et comparaisons appariées de dROMs; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade, de note d'hémolyse ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade.**

### Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>

Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Constante	1	1,818	70,445	,018
Sex	1	43,329	,770	,385
Stade	2	82,837	1,152	,321
Group	1	43,755	,068	,796
Sex * Stade	2	83,118	,056	,946
Sex * Group	1	46,542	,267	,608
Stade * Group	2	82,940	,802	,452

a. Variable dépendante : [8OHdG] pg/ug DNA.

**Annexe 28** : Effets fixes de la concentration en 8-OHdG avec matrice ADN; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade.

**Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>**

Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Constante	1	2,035	33,605	,027
Sex	1	40,338	1,184	,283
Stade	2	71,549	5,752	,005
Group	1	39,601	1,902	,176
Sex * Stade	2	69,720	,287	,751
Sex * Group	1	42,671	1,102	,300
Stade * Group	2	69,258	3,455	,037
Notehémolyse	1	99,979	4,860	,030

a. Variable dépendante : [8OHdG] ng/mL plasma.

**Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>**

Stade	Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
J6	Constante	1	37,000	58,070	<,001
	Sex	1	37,000	,491	,488
	Treatment	1	37	3,058	,089
	Sex * Treatment	1	37	1,409	,243
	Notehémolyse	1	37,000	2,501	,122
R1	Constante	1	2,425	68,435	,008
	Sex	1	36,487	1,095	,302
	Treatment	1	36,261	,056	,814
	Sex * Treatment	1	36,623	,771	,386
	Notehémolyse	1	36,398	2,539	,120
R2	Constante	1	35	58,657	<,001
	Sex	1	35	,315	,578
	Treatment	1	35	,553	,462
	Sex * Treatment	1	35	,238	,628
	Notehémolyse	1	35	1,315	,259

a. Variable dépendante : [8OHdG] ng/mL plasma.

**Annexe 29** : Effets fixes de la concentration en 8-OHdG avec matrice plasma; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade, de note d'hémolyse ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade.

### Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>

Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Constante	1	8,742	124,260	<,001
Group	1	25,939	1,198	,284
Sex	1	27,960	1,446	,239
Stade	3	101,635	7,129	<,001
Group * Sex	1	17,599	,566	,462
Group * Stade	3	105,271	,877	,456
Sex * Stade	3	105,130	,175	,913

a. Variable dépendante : mtDNAcn.

### Comparaisons appariées<sup>a</sup>

(I) Stade	(J) Stade	Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	ddl	Sig. <sup>c</sup>	Intervalle de confiance à 95 % pour la différence <sup>c</sup>	
						Borne inférieure	Borne supérieure
before	J6	,421*	,098	100,604	<,001	,227	,615
	R1	,058	,100	101,186	,562	-,140	,256
	R2	,144	,103	102,366	,167	-,061	,349
J6	before	-,421*	,098	100,604	<,001	-,615	-,227
	R1	-,363*	,101	101,221	<,001	-,563	-,163
	R2	-,277*	,104	102,854	,009	-,484	-,071
R1	before	-,058	,100	101,186	,562	-,256	,140
	J6	,363*	,101	101,221	<,001	,163	,563
	R2	,086	,105	101,831	,417	-,123	,295
R2	before	-,144	,103	102,366	,167	-,349	,061
	J6	,277*	,104	102,854	,009	,071	,484
	R1	-,086	,105	101,831	,417	-,295	,123

Basées sur les moyennes marginales estimées

\*. La différence moyenne est significative au niveau ,05.

a. Variable dépendante : mtDNAcn.

c. Ajustement pour les comparaisons multiples : Différence la moins significative (aucun ajustement).

**Annexe 30** : Effets fixes et comparaisons appariées du nombre de copies de l'ADN mitochondrial; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe, groupe-stade et sexe-stade.

**Tests des effets fixes de type III<sup>a</sup>**

Source	Ddl du numérateur	Ddl du dénominateur	F	Sig.
Constante	1	9,932	233,000	<,001
Group	1	35,714	2,152	,151
Sex	1	32,489	,738	,396
Stade	3	121,043	,808	,492
Group * Sex	1	40,576	2,288	,138
Group * Stade	3	122,262	1,628	,186
Sex * Stade	3	122,155	2,362	,075

a. Variable dépendante : rTL.

*Annexe 31 : Effets fixes de la longueur relatives des télomères ; Sont étudiés les interactions de groupes, de sexe, de stade ainsi que les interactions groupe-sexe et groupe-stade.*

**RÉSUMÉ-** *Naturellement équipés pour faire face au “stress” ? Réponses physiologiques de manchots royaux adultes à une augmentation expérimentale des niveaux d’hormones glucocorticoïdes.*

L’exposition des animaux à des stress environnementaux répétés dans leur biotope naturel pourrait impacter leurs cycles biologiques et avoir des effets délétères à long terme. Les glucocorticoïdes, hormones du stress, favorisent une réponse adaptative et une modulation de la physiologie énergétique de l’animal lui permettant de gérer un état de stress aigu. Cependant, il est supposé qu’une exposition chronique à taux élevés de glucocorticoïdes peut engendrer du stress oxydant et impacter durablement l’organisme. Récemment, des études ont cherché à montrer que les espèces vivant dans des milieux contraignants présentent des adaptations pour limiter les effets négatifs d’un stress chronique sur le stress oxydant. Nous avons testé cette hypothèse sur des manchots royaux adultes en induisant une exposition chronique à de hauts niveaux de corticostérone par la pose d’implants de corticostérone. Par la suite, nous avons mesuré ces taux de corticostérone, les dynamiques énergétiques ainsi que les variations de différents marqueurs de stress oxydatif durant plusieurs semaines. Malgré une augmentation de la corticostérone, un seul marqueur du stress oxydant témoin de la réparation des dommages oxydants à l’ADN s’est révélé significatif. Des légères variations du métabolisme glucidique et protéique pourraient aussi témoigner des adaptations au stress chronique. Cette étude souligne la capacité d’adaptation des animaux à leur milieu de vie et entrouvre la porte sur des possibles mécanismes physiologiques leur permettant d’éviter ou d’alléger les effets néfastes de la surcharge allostatique en glucocorticoïdes.

**Mots clés :** Corticostérone - Manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) - Métabolisme énergétique - Mitochondrie - Stress chronique - Stress oxydant - Surcharge allostatique - Télomère - Théorie radicalaire du vieillissement

**ABSTRACT-** *Naturally equipped to resist ‘stress’? Physiological responses of adult king penguins to an experimental increase in glucocorticoid levels.*

Animals' exposure to repeated environmental stress in their natural habitat could impact their life-history stage and have long-term deleterious effects. Glucocorticoids, which are stress hormones, allow adaptive response and modulation of energetics of the animal enabling it to cope with acute stress. However, it is widely assumed that chronic exposure to high glucocorticoids levels can cause oxidative stress and have a lasting impact on organisms.

Recently, some studies have tried to highlight that species living in challenging environments exhibit adaptations in order to alleviate chronic stress' negative effects on oxidative stress. We tested this hypothesis on adult king penguins in inducing chronic exposure to corticosterone high levels with corticosterone implants. Thereafter, we measured corticosterone levels, energetics dynamics and multiple oxidative stress markers over several weeks. Despite an increase in corticosterone levels, only one oxidative stress marker which shows oxidative damage reparations to DNA was significant. Slight variations in glucose and protein metabolism may also reflect adaptations to chronic stress.

This study highlights the ability of animals to perfectly fit their environment and opens the door on possible physiological mechanisms allowing them to avoid or alleviate the adverse effects of a glucocorticoid allostatic overload.

**Keywords:** Allostatic overload - Corticosterone - Chronic stress - Energetics - Free radical theory of ageing - King penguin (*Aptenodytes patagonicus*) - Mitochondria - Oxidative stress - Telomere