



HAL
open science

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*)

Cyril Dégletagne

► **To cite this version:**

Cyril Dégletagne. 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*). Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10348 . tel-00755130

HAL Id: tel-00755130

<https://theses.hal.science/tel-00755130>

Submitted on 20 Nov 2012

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.

N° Ordre : 348 - 2011

Année 2011

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

L'ÉCOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES SANTÉ

DIPLÔME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Discipline : Physiologie

Présentée et soutenue publiquement le 16 décembre 2011

par **Cyril Dégletagne**

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*)

Sous la direction du Pr. Claude DUCHAMP et du Dr. Mireille RACCURT

Composition du jury :

M. Joël LACHUER, PU, Université Claude Bernard Lyon 1	Président
M. Christian DIOT, DR INRA, Agrocampus Ouest, Rennes	Rapporteur
M. Jean Patrice ROBIN, CR CNRS, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg	Rapporteur
M. Claude DUCHAMP, PU, Université Claude Bernard Lyon 1	Directeur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. A. Bonmartin

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. le Professeur J-F. Mornex

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurances

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. P. Fournier

Directeur : M. G. Pignault

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M. R. Bernard

Remerciements :

Arrivé à la fin de cette grande aventure de 3 ans (et un peu plus), je souhaite présenter mes plus sincères remerciements à l'ensemble des personnes qui m'ont permis par leur présence, leur enthousiasme et leur soutien, de finaliser cette thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier le **Pr. Joël Lachuer** qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Son expertise des puces à ADN nous a encouragé à relever ce défi un peu fou d'utiliser des puces à ADN de poulet pour observer des modifications d'expression de gènes chez le manchot Royal.

Je remercie sincèrement le **Pr. Christian Diot** et le **Dr. Jean Patrice Robin** qui ont accepté d'évaluer mon travail dans les moindres détails en tant que rapporteurs et ont posé un regard critique sur ce manuscrit. Je les remercie d'avoir affronté vents et marées en ce vendredi 16 décembre pour assister à ma présentation orale ; la discussion scientifique qui en a découlé a dévoilé de nouvelles interrogations, apportant de nouvelles pistes de réflexions à ce travail. J'espère que nous pourrons de nouveau confronter nos définitions « d'espèces exotiques » et arriver à définir si l'environnement antarctique est vraiment « extrême » pour les manchots.

Un grand merci au **Pr. Claude Duchamp**, pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ces années, pour m'avoir accueilli dans l'équipe « Thermorégulation, Energétique et Adaptations Métaboliques » lors du stage de M1, pour avoir accepté de me confier ce sujet périlleux lors de mon stage de M2 qu'il m'a permis de développer librement tout au long de ma thèse. Merci aussi pour les séances de préparation à l'oral, que ce soit pour les congrès ou ma thèse.

Je tiens aussi à remercier deux personnes, absentes physiquement de ce jury, dont le soutien indéfectible, même depuis l'autre bout de la Terre, a énormément participé à la réussite de cette aventure :

- **Dr. Mireille Raccurt** (alias Mimie), qui m'a permis de vivre une campagne d'été à DDU, une expérience véritablement inoubliable ! Je te remercie pour ta disponibilité de tous les instants, ta générosité, ta confiance, ta bonne humeur et ton soutien, même depuis l'Antarctique. Un immense merci pour avoir relu et corrigé l'ensemble de mon manuscrit de thèse, même lors de tes déplacements en train entre Lyon et Paris. Ce travail a fortement bénéficié de nos échanges plus ou moins scientifiques (je retiendrai certaines phrases inattendues et bluffantes) lors des « Tea Time » ou autour d'un bon repas (merci à **Jean Paul** et ses fameuses quenelles sauce nantua dont lui seul a le secret... un régal !). Promis, je vais essayer de diminuer le nombre de « exceptionnel », « fantastique », « génial » de mes présentations... mais rien n'est sûr !!!
- **Dr. Benjamin Rey**, pipette d'or et chercheur au grand cœur, qui m'a guidé sur le chemin tortueux de la recherche scientifique dès mon stage de M1, et m'a proposé ce projet fou

d'utiliser des puces à ADN de poulet pour analyser le transcriptome de manchot lors du stage de M2. Ton ouverture d'esprit, ton enthousiasme débordant et ton imagination sans limite m'ont permis de m'aventurer hors des sentiers classiques de la science et de surmonter certains défis méthodologiques et/ou rédactionnels. Je te remercie pour ta disponibilité et ton attention, spécialement lorsqu'on évoque des projets (scientifiques ou non) un peu fous. J'espère que tu trouveras toujours un défi à ta hauteur...

Ce travail n'aurait jamais été possible sans l'implication de nombreuses personnes, rencontrées tout au long de ces 3 années, que je tiens également à remercier.

Je souhaite remercier le **Dr. Céline Keime** pour son implication dans ce projet et qui a pris beaucoup de son temps pour m'expliquer les algorithmes d'analyse des puces à ADN, pour m'initier à la programmation sous R et me guider dans la rédaction de mes réponses aux reviewers concernant les statistiques liées à notre analyse du transcriptome. Merci pour cette collaboration fructueuse !!! Merci aux **Dr. Paul Chuchana** et **Pr. Christian Gautier** pour avoir participé à ce projet.

Merci au **Dr. Marc de Dinechin** pour son enthousiasme débordant et ses idées parfois « farfelues », où physiologie et évolution des manchots ne semblent pas si éloignées.

Dr. Fabien Forcheron, formateur hors pair en PCR quantitative. Merci pour ta bonne humeur, ton efficacité et ta rigueur au laboratoire. Déjà 4 ans ***** ! (tu sauras remplacer les étoiles). Merci au **Pr. Giampiero Bricca**, **Dr. Nadjiba Hamlat**, **Hanene Ayari** et **toutes les personnes de l'ex ERI 22** pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire, de jours comme de nuit quand la science l'imposait. Merci au **Dr. Olivier Lohez** pour les grandes discussions de biologie moléculaire que nous avons eu entre 2 runs de qPCR.

Ces années ont été l'occasion de collaborations, sans trop de rapport avec mon sujet de thèse (souvent des études sur la souris, le rat ou le canard ! allez comprendre), avec les **Dr. Benjamin Rey**, **Dr. Olivier Levillain**, **Pierre Eyenga**, **Dr. Karyn Julliard** et **Dolly Al Koborssy**. Merci de m'avoir accordé votre confiance.

Un grand merci à toute l'équipe pédagogique de physiologie, qui m'a permis de réaliser mon monitorat dans les meilleurs conditions. Merci aux **Dr. Sylvie Dupré**, **Christophe Chouabe**, **Damien Roussel**, **Delphine Baetz** et **Christine Berthier** pour m'avoir confié entièrement la réalisation de TP/TD/Cours de physiologie. Merci aussi à toutes les personnes qui interviennent (ou intervenaient) dans ces TP/TD pour leur bonne humeur et leur dévouement (**Pr. Fabien Van Coppenolle**, **Sabine**, **Gaëlle**, **Romeo**, **Daisy**, **Julie**, **Tina**, **Céline**, **Pierre**, **Loïc**, **Emmanuelle**).

Merci à toutes les personnes de l'ex UMR 5123. J'adresse un remerciement tout particulier au **Dr. Dominique Desplanches** pour sa patience et sa rigueur, particulièrement lors des dosages enzymatiques. Merci pour ton oreille attentive et ta disponibilité quand j'avais besoin de discuter de

mes résultats (mais pas seulement). Merci aussi à **Jacqueline Pequignot** qui a eu la patience de m'apprendre différentes techniques de dosage enzymatique, indispensables à la réalisation de ce travail. Un grand merci aussi au **Pr. Jean Marc Pequignot**, ancien directeur de l'UMR 5123 et ancien directeur du M2 « *Physiologie intégrée en conditions extrêmes* », qui a su, par ses cours et diverses discussions, me convaincre de l'utilité (que dis-je, le côté indispensable !!) de la physiologie intégrative. Merci pour votre gentillesse !

Merci à **Julie** et **Sophie**, animalières au grand cœur, qui me préparent (presque) toujours les rats pour les TP ! Merci pour votre bonne humeur.

Pour finir, je tiens à associer à ces remerciements ceux qui m'ont supporté tout au long de cette aventure, que j'ai cotoyé tous les jours... **tous les membres de l'équipe TEAM**. Merci à vous !!!

Merci à **Marie Thérèse Boillon**, ancienne secrétaire du laboratoire, pour sa bonne humeur quotidienne et sa gentillesse. Ton expertise, en particulier du logiciel SIFAC, nous a rendu à tous de fiers services et nous a permis de nous démêler des subtilités administratives. Merci pour tes gateaux et clafoutis qui ont grandement participé à l'ambiance qui règne au 4^{ème} étage. Merci pour tout !

Considéré comme la « Dream Team », ou je dirais plutôt le trio de choc, ces 3 barbus (récemment réduits à 2) sont la mémoire du laboratoire. J'ai nommé **Dr. Harry Koubbi**, syndicaliste convaincu et cuisinier inattendu, **Dr. Jean Louis Rouanet**, expert en métabo et grand spécialiste des manchots, et **Guy Dallevet**, ACMO très à cheval sur l'utilisation des blouses/lunettes/gants, philosophe/artiste dont le calme légendaire ne peut être altéré (dans la majorité des situations !). Merci à vous trois pour votre bonne humeur et toutes les discussions, plus ou moins scientifiques, que l'on a pu partager.

Un immense merci au **Dr. Damien Roussel** pour sa patience pour répondre à mes différentes questions, sa rigueur scientifique, sa réactivité lors de l'écriture des articles et son enthousiasme à toutes épreuves. Je pense que je viendrai de nouveau te demander quelques explications sur la mitochondrie et l'énergétique cellulaire pour changer un peu !

Un grand merci à tous les autres : *ceux qui sont toujours présents* : **Dr. Yann Voituron** (nouveau chef adepte des bêtes à sang froid... quelle idée bizarre !!, grand consommateur de Coca, dont la culture scientifique/musicale/cinématographique m'a surpris de nombreuses fois), **Dr. Caroline Romestaing** (mito woman dynamique capable de gérer une dizaine de projets/étudiants/cours en parallèle dont le fameux barbecue annuel), **Dr. Olivier Levillain**, **Dr. Karine Salin**, **Pierre Eyenga** (médecin le jour et thésard la nuit), **Jean Pierre** ; *ceux qui sont partis* : **Dr. Delphine Baetz**, **Dr. Loïc Teulier** (bonne chance pour ton post doc outre-atlantique), **Dr. Dominique Letexier** et **Dr. Maud Belouze** (les premiers à m'avoir initié aux techniques de biologie moléculaire en stage de M1), **Dr. Julien Tirard**, **Dr. Sahra Borgès**, **Dr. Cécile Vouyovitch**. Merci à tous pour votre bonne humeur, votre disponibilité pour des discussions plus ou moins scientifiques !

Une dédicace spéciale à **Aurély**, blablateuse hors pair et technicienne en or, capable de faire fonctionner n'importe quel Western Blot/kit EIA, et même d'amplifier son propre ADN !!! Je te souhaite une bonne continuation dans ton nouveau labo, tu vas nous manquer ainsi que tes blagounettes !!! Un bonjour à ton specimen, je parle de **Cyrille** bien sûr. Un grand merci aussi à **Lara, Odile, Marie Rose, Elo, Nathalie** que j'embête régulièrement quand arrive 11h30 ! Merci à vous tous pour votre gentillesse et votre bonne humeur.

Un immense merci à **tous les étudiants du labo et de l'UMR**. Certains m'ont d'ailleurs supporté au quotidien (pendant une période limitée je vous rassure !) comme **Anaïs Fongy** et **Nadia El Guelta**, « stagiaires exploitées » avec qui j'ai eu énormément de plaisir à travailler. Je vous souhaite le meilleur pour la suite ! D'autres se sont retrouvés dans le même bureau que moi durant la dernière ligne droite de cette thèse, n'est ce pas **Lorraine** (heureusement que les gauffres existent !). Une mention spéciale à **Benjamin Ladeuix**, rugbyman qui préférerait que les matchs durent 11 minutes, grand spécialiste de l'eau athée, source inépuisable de blagues (que tu rattrapes parfaitement bien soit dit en passant...) et partenaire de « craquage ». Merci pour ta bonne humeur quotidienne et ta gentillesse ; et courage pour cette fin de thèse !

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'IPEV et **l'ensemble des hivernants du programme 131**. Merci à vous qui vivez (avez vécu) plus d'un an dans ces contrées lointaines où vivent ces fameux manchots. Merci à toutes les personnes présentes pendant la campagne d'été 2009-2010 à DDU (**Alex, Pop** et tous les autres). Et surtout un immense merci à **Mimie** et **Sophie** pour cette campagne d'été mémorable, ces quelques mois hors du temps... c'était trop de la bombe de balle !!!

Un immense merci à tous mes amis, qui m'ont supporté tout au long de ces 3 années de thèse (certains n'ont d'ailleurs pas été assez dégouté pour goûter à cette aventure !)... et qui ont même suivi les 3h de soutenance... vous êtes vraiment géniaux ! **A tous mes amis de la danse** (je peux pas tous les nommer ici, faute de place... certains m'ont connu en cours de physio avant... les pauvres !), **Mac** (qui a tenu le blog de mon aventure polaire), **Adriana** (toujours cool sauf en période de gala de danse), **Julien** et **Manue** (qui m'ont accueilli en Australie), **Julien** et **Virginie** (et Migou, actuellement en Suède pour une nouvelle aventure !), **Sylvain, Seb, Lysianne, Andréanne, Tony** (potes de fac et coureurs du mardi soir), **Nicolas** (toujours présent quand j'en ai besoin).

Je tiens à remercier toute **ma famille, mes parents** et **ma sœur Alicia** (je ne t'oublie pas **Flo**), pour leur soutien et m'avoir laissé le choix de vivre mon rêve, partir en Antarctique. Merci aussi à **René** (sans qui les ordis ne marcheraient pas aussi bien), **Elisabeth, Christian, Tristan** qui ont subi, comme **mes parents**, ma soutenance. Merci à vous tous d'être présent !

Et enfin, la meilleure pour la fin, merci énormément à celle qui me soutient depuis 2 ans et qui a accepté de voir l'appartement envahi de manchots. Merci d'avoir été présente durant cette période stressante de rédaction de la thèse et de préparation de soutenance. Merci **Chloé** d'être à mes côtés !

Résumé :

Les manchots ont colonisé les écosystèmes froids de l'hémisphère sud en développant des mécanismes physiologiques dont la compréhension est encore très imparfaite. Ce travail de thèse a pour but de décrypter, à différents niveaux d'intégration (du gène à l'animal entier), les réponses fonctionnelles développées par ces oiseaux pour survivre aux contraintes des milieux antarctique et sub-antarctique. Nous nous sommes focalisés sur les mécanismes d'acclimations développés lors de deux phases cruciales du cycle de vie des manchots : le passage de la vie terrestre à la vie marine du manchot Royal immature (*Aptenodytes patagonicus*) et la croissance rapide du poussin manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*).

Pour explorer les variations d'expression génique musculaire chez le manchot Royal lors de son passage du milieu terrestre au milieu marin, nous avons utilisé une technologie de puces à ADN Affymetrix développées pour le poulet. Dans un premier temps, ce travail a donc nécessité le développement et la validation d'un algorithme d'analyse (maxRS) des puces à ADN dans le cadre d'une hybridation hétérologue. Cette approche a permis de montrer une modification coordonnée de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, suggérant une augmentation de l'utilisation des substrats lipidiques, pour subvenir aux forts besoins énergétiques de la thermogenèse et de l'activité locomotrice endurante nécessaire aux longs voyages alimentaires en mer. Ceci s'accompagne d'une augmentation de l'activité de différentes enzymes du métabolisme lipidique (HAD, citrate synthase) et de la respiration mitochondriale en présence de substrats lipidiques chez les oiseaux acclimatés au milieu marin. Nos résultats ont aussi révélé une sur-expression des gènes impliqués dans les mécanismes de lutte contre les radicaux libres de l'oxygène (ROS) et les dégâts associés. Le développement d'une réponse anti-oxydante globale, corroboré par l'activation des enzymes anti-oxydantes et la diminution de la production mitochondriale de ROS, permet à cet oiseau de se protéger contre la probable surproduction de ROS induite lors des phases de plongée en apnée longues et répétées.

Dans un second temps, nous avons recherché les mécanismes qui permettent au poussin manchot Adélie de grandir rapidement dans un environnement très contraignant sur le plan énergétique. Nous avons montré, par une approche intégrative (du gène à l'animal entier), que le poussin développe une stratégie originale d'orientation séquentielle de son métabolisme vers la croissance puis vers la thermogenèse. D'abord protégé par son parent, la croissance du poussin est favorisée comme en témoigne la forte expression musculaire du GHR (Growth Hormone Receptor). L'exposition au froid du poussin induit une diminution de sa croissance. Ceci s'accompagne d'un accroissement du phénotype oxydatif du muscle pectoral et d'une augmentation de l'expression des protéines découplantes (avUCP, avANT), corrélés à une activation des mécanismes thermogènes, indispensables pour que le poussin acquière son autonomie thermique.

Nos résultats montrent que ces deux espèces de manchots développent des réponses physiologiques complexes et coordonnées pour surmonter les contraintes de l'environnement polaire illustrant leur remarquable plasticité phénotypique. De l'efficacité de ces réponses dépend la survie de ces oiseaux.

Title : Penguin acclimatization to polar environmental constraints : a transcriptomic and integrative study in King (*Aptenodytes patagonicus*) and Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*).

Abstract :

King penguins have successfully colonized cold ecosystems of the southern hemisphere by developing physiological mechanisms that are not well understood. The aim of this study was to investigate, at different integrative levels from the gene to the whole animal, the functional responses developed by penguins to overcome antarctic and sub-antarctic constrains. We focused on acclimatization mechanisms enabling the first departure to sea of king penguin immatures and the rapid growth of Adélie penguin chicks.

To explore differentially expressed genes in pectoralis muscle between never immersed and sea acclimatized penguins, we used Affymetrix microarrays design for chicken. We first set up and validated a new method to analyze heterologous hybridization transcriptomic profiles. We highlighted coordinated gene expression modifications suggesting a selective shift in metabolic pathways favoring the use of lipids as fuel to sustain highly energetic needs imposed by immersions into cold sea water and the prolonged and intense exercise occurring during foraging trips. It is associated with an increase of enzyme activities from lipid metabolism and respiration of mitochondria energized with lipid substrates after penguins' sea acclimatization. Our results revealed an upregulation of genes involved in cellular defenses against reactive oxygen species and associated injuries. The increase of anti-oxydant enzyme activities and the reduction of mitochondrial H₂O₂ production protect penguins against reactive oxygen species over production, potential consequences of penguin marine life-style that imposes repeated dives under apnea.

Secondly, we investigated the physiological mechanisms developed by Adélie penguin chicks to ensure a rapid growth in a cold environment. By an integrative study, we showed that penguin chicks develop an original strategy by first allocating most of the energy to growth and then promoting thermogenic processes. First protect by their parents, chicks favor growth as evidenced by the high expression of GHR. Chick cold exposition decreases growth rate. The progressive increase in oxidative myofiber phenotype and the over expression of uncoupling proteins (avUCP, avANT) was correlated with the activation of thermogenic mechanisms, essential for chick rapid thermal emancipation.

Our results showed that both king and Adélie penguins develop complex and coordinated physiological responses to energetic constraints highlighting their high phenotypic plasticity. These remarkable acclimatization mechanisms may be essential for penguin survival in polar environment.

Sommaire

Liste des publications et des communications scientifiques	19
Introduction	21

Rappels bibliographiques 25

Chapitre 1 : Le manchot, oiseau emblématique de l'Antarctique 27

1/ Description générale..... 27

2/ L'environnement antarctique 28

3/ Les différentes espèces de manchots..... 30

4/ Impact de l'environnement sur le cycle de reproduction des manchots 32

a/ Le manchot Royal (Aptenodytes patagonicus) 32

b/ Le manchot Adélie (Pygoscelis adeliae)..... 33

Chapitre 2 : La contrainte thermique 37

1/ Influence de l'environnement sur le maintien de la température interne..... 37

a/ Dans l'océan antarctique 38

b/ En milieu terrestre..... 39

2/ Comment lutter contre le froid ? Diminuer la thermolyse... 39

a/ Les adaptations morphologiques..... 39

b/ Un comportement adapté..... 40

3/ ... et produire de la chaleur..... 41

a/ La thermogénèse de frisson..... 41

b/ La thermogénèse sans frisson 42

Rappel sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale..... 43

c/ Les autres mécanismes impliqués dans la thermogénèse..... 46

Chapitre 3 : L'acclimatation au milieu marin des manchots immatures 49

<u>1/ Les ajustements métaboliques.....</u>	51
<i>a/ En réponse aux contraintes physico-chimiques de l'environnement.....</i>	<i>51</i>
<i>b/ En réponse à l'activité physique</i>	<i>52</i>
<i>c/ En réponse aux contraintes de la plongée en apnée</i>	<i>56</i>
<u>2/ La contrainte pro-oxydative.....</u>	57
<i>a/ Le stress oxydant, définition.....</i>	<i>57</i>
<i>b/ Les facteurs pro-oxydants</i>	<i>59</i>
- Production de ROS par la mitochondrie.....	59
- Autres générateurs de ROS	61
<i>c/ Altérations des mécanismes cellulaires par les radicaux libres</i>	<i>61</i>
- La peroxydation des lipides.....	61
- L'oxydation des acides nucléiques.....	62
- La carbonylation des protéines.....	63
<i>d/ Les mécanismes anti-oxydants.....</i>	<i>64</i>
- Prévenir la formation des ROS.....	64
- Dégrader les espèces réactives de l'oxygène.....	67
- Réparer les dégâts cellulaires occasionnés	68
<i>e/ Le manchot : comment vivre longtemps dans un environnement pro-oxydant?.....</i>	<i>69</i>
<u>3/ Le muscle pectoral, au cœur de l'acclimatation du manchot au milieu marin ?.....</u>	70

Chapitre 4 : La croissance en milieu polaire 71

<u>1/ Quelques généralités</u>	71
<u>2/ Les paramètres agissant sur le taux de croissance de l'organisme</u>	72
<i>a/ Données quantitatives de croissance</i>	<i>72</i>
<i>b/ Apports alimentaires.....</i>	<i>72</i>
<i>c/ Allocation d'énergie, gestion du budget énergétique</i>	<i>73</i>
<i>d/ Prolifération cellulaire, croissance tissulaire.....</i>	<i>74</i>
<u>3/ Le développement des muscles squelettiques : variation du typage des fibres.....</u>	75
<u>4/ Régulation des caractéristiques morpho-fonctionnelles du muscle lors de la croissance au froid</u>	78

Chapitre 5 : Les approches de biologie moléculaire 81

1/ Méthode basée sur l'amplification, qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) 81

a/ Principe général..... 81

b/ Utilisation des intercalants..... 82

c/ PCR quantitative : méthode de quantification..... 83

2/ Méthode basée sur l'hybridation, la puce à ADN..... 84

a/ Principe général..... 84

b/ Les puces Affymetrix® 84

c/ De l'échantillon à l'analyse par puce à ADN Affymetrix® 85

d/ Cas particulier de l'hybridation hétérologue..... 89

Objectifs 93

Travail expérimental 95

1 – Développement d'une méthode d'analyse pour l'utilisation des puces à ADN dans le cadre d'une hybridation hétérologue 97

Publication n°1 : Transcriptome analysis in non-model species: a new method for the analysis of heterologous hybridization on microarrays 99

Abstract 102

Background 103

Results and Discussion 105

Conclusions 112

Methods 112

Principaux résultats présentés dans la publication 1 117

2 – Réponses physiologiques développées par le manchot Royal immature lors de son passage du milieu terrestre au milieu marin. 123

Publication n°2 : Selective upregulation of lipid metabolism in skeletal muscle of foraging juvenile king penguins, an integrative study.....	125
<u>Abstract</u>	128
<u>Introduction</u>	129
<u>Results</u>	130
<u>Discussion</u>	137
<u>Materials and Methods</u>	141

Principaux résultats présentés dans la publication 2..... 145

Publication n°3 : Physiological response of king penguins to oxidative challenge of living at sea	147
<u>Abstract</u>	150
<u>Introduction</u>	151
<u>Material and methods</u>	153
<u>Results and discussion</u>	157

Principaux résultats présentés dans la publication 3..... 167

3 –La croissance en milieu polaire, un défi énergétique pour le poussin manchot Adélie 169

Publication n°4 : Growth or thermogenesis: a dilemma for Adélie penguin chicks (<i>Pygoscelis adeliae</i>) towards successful development in Antarctica..	171
<u>Abstract</u>	174
<u>Introduction</u>	175
<u>Materials and methods</u>	176
<u>Results</u>	179
<u>Discussion</u>	188

Principaux résultats présentés dans la publication 4..... 193

Discussion générale & Conclusion 195

<u>1/ L'exploration du transcriptome, un atout pour les études d'écophysiologie</u>	197
<i>a/ Utilisation des puces à ADN</i>	197
<i>b/ Des technologies d'avenir : les techniques de séquençage dernière génération</i>	199
<i>c/ Avantages et inconvénients des techniques de puces à ADN et de séquençage massif (NGS)</i>	202
<u>2/ L'acclimatation au milieu marin du manchot Royal immature</u>	202
<i>a/ Les ajustements métaboliques</i>	202
<i>b/ La contrainte oxydative</i>	205
<u>3/ La croissance en milieu polaire</u>	208
<i>a/ Favoriser la croissance</i>	209
<i>b/ ... pour mieux développer les mécanismes thermogènes</i>	210
<u>4/ L'énergétique cellulaire, au cœur des mécanismes d'acclimatation</u>	211
<u>5/ Perspectives</u>	215

Références bibliographiques 219

Liste des publications et des communications scientifiques

Publications présentées et discutées dans le manuscrit

Cyril Dégletagne*, Céline Keime*, Benjamin Rey, Marc de Dinechin, Fabien Forcheron, Paul Chuchana, Pierre Jouventin, Christian Gautier and Claude Duchamp (2010). Transcriptome analysis in non-model species: a new method for the analysis of heterologous hybridization on microarrays. *BMC Genomics* **11**, 344

Loïc Teulier*, **Cyril Dégletagne***, Benjamin Rey, Jérémy Tornos, Céline Keime, Marc de Dinechin, Mireille Raccurt, Jean-Louis Rouanet, Damien Roussel and Claude Duchamp. Selective upregulation of lipid metabolism in skeletal muscle of foraging juvenile king penguins, an integrative study. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences, In press*

Benjamin Rey, **Cyril Dégletagne**, Damien Roussel, Jacques Bodennec, Jean-Louis Rouanet, Jeremy Tornos, Loïc Teulier, Mireille Raccurt, and Claude Duchamp. Physiological response of king penguins to oxidative challenge of living at sea. *En préparation*

Cyril Dégletagne, Damien Roussel, Steve Harvey, Jean-Louis Rouanet, Fanny Baudimont, Claude Duchamp and Mireille Raccurt. Growth or thermogenesis: a dilemma for Adélie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*) towards successful development in Antarctica. *Soumis pour publication à Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*

* Contributed equally

Publications non présentées dans le manuscrit

Benjamin Rey, Damien Roussel, Loïc Teulier, Pierre Eyenga, **Cyril Dégletagne**, Maud Belouze, Claude Duchamp (2011). Functional argument for the existence of an avian nitric oxide synthase in muscle mitochondria: Effect of cold acclimation. *FEBS Letters* **585** 173–177

Olivier Levillain, **Cyril Dégletagne**, Dominique Letexier and Henri Déchaud. Orchidectomy and Testosterone Treatment Downregulate the Expression of Ornithine Aminotransferase Gene in the Mouse Kidney. *Endocrinology / Book 3*

Aimé P., Hegoburu C., Jaillard T., **Dégletagne C.**, Letexier D., Garcia S., Messaoudi B., Thevenet M., Lorsignol A., Duchamp C., Julliard A.K., A physiological increase of insulin in the olfactory bulb decreases olfactory detection and sniffing behavior during food-odor presentation. *Soumis à The Journal of Neuroscience*

Article de vulgarisation scientifique

Raccurt M., Rey B., **Dégletagne C.**, Teulier L., Roussel D., Rouanet J-L., Duchamp C. (2010) Penguins as models of genetic adaptations to polar environments. *Activity report of the French Polar Institute (IPEV - <http://www.institut-polaire.fr/>)*, Pages 28-30.

Publication de séquences : Gene Expression Omnibus

Dégletagne C., Keime C., Rey B., de Dinechin M., Forcheron F., Chuchana P., Jouventin P., Gautier C., Duchamp C. Gene expression profile in the pectoralis muscle of penguin before and after acclimatisation to marine life. *Microarray data set - Gene Expression Omnibus n° GSE17725*.

Participation à des congrès scientifiques

Congrès internationaux

3 - 6 août 2010 : Scientific Committee on Antarctic Research XXXI & Open Science Conference – Buenos Aires – Argentine. **Poster** : « DNA microarray : a new tool for a better understanding of skeletal muscle adaptations to marine life in king penguin juveniles (*Aptenodytes patagonicus*) »
Prix du meilleur poster : Best poster presentation in session 23 (Antarctica – Witness to the past and guide to the future : ecosystem health)

18 – 22 avril 2009 : Experimental Biology 2009 – New Orleans – Etats-Unis. **Présentation orale et poster**: « Transcriptional analysis of skeletal muscle adaptations to marine life in king penguin juveniles (*Aptenodytes patagonicus*) ». Publié dans *The FASEB Journal* **23**, 629.5

Congrès nationaux

19-20 mai 2011 : Comité National Français des Recherches Arctiques et Antarctiques – Paris – France. **Présentation Orale** : « Grandir vite et/ou résister au froid polaire, un compromis énergétique pour le poussin manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*) »

24 mars 2011 : Congrès de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences – Santé – Lyon – France. **Présentation Orale** : « Approche intégrative de la transition métabolique induite par le passage à la vie marine du manchot Royal juvénile (*Aptenodytes patagonicus*) »

1er et 2 Octobre 2009 : Comité National Français des Recherches Arctiques et Antarctiques – Paris – France. **Présentation Orale** : « Le développement du tissu adipeux blanc : une nécessité pour les espèces polaires antarctiques »

23 - 24 Octobre 2008 : Comité National Français des Recherches Arctiques et Antarctiques – Paris – France. **Poster** : « Adaptations anti-radicalaires lors du passage en mer chez le juvénile de manchot Royal »

19 mars 2008 : Congrès de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences – Santé – Lyon – France. **Poster** : « Réponses physiologiques au passage en mer chez le manchot Royal : une approche par l'analyse du transcriptome »

Introduction

Comme l'annonçait déjà Charles Darwin : « *Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements* ».

La pérennité des espèces actuelles dépend de leurs capacités à surmonter l'ensemble des contraintes induites par l'environnement. Température, variation de la teneur en oxygène, disponibilité en eau et en nourriture, exposition à certains composés toxiques, présence de prédateurs ou de congénères, etc. sont autant de paramètres avec lesquels tout organisme vivant doit composer pour survivre et se reproduire.

Parmi les vertébrés, les oiseaux ont été capables de coloniser la majorité des écosystèmes terrestres, défiant ainsi avec succès une large gamme de contraintes environnementales. Pour exemple, le manchot Empereur (*Aptenodytes forsteri*) est le seul organisme vertébré capable de se reproduire en plein cœur de l'hiver antarctique. Il maintient son homéothermie (température interne à 38°C) malgré des températures de l'environnement négatives (-16°C) et des vents violents (10 m.s⁻¹) (Ancel *et al.* 1997). Migrateurs hors pair, certains oiseaux réalisent des voyages de plusieurs milliers de kilomètres. Le Puffin Fuligineux, oiseau d'environ 800g, parcourt ainsi plus de 64 000 km par an au dessus des océans Pacifique et Antarctique (Shaffer *et al.* 2006). D'autres oiseaux, comme l'Oie à Tête Barrée, réalisent des migrations à plus de 9000 m d'altitude, au dessus de la chaîne himalayenne, et soutiennent une activité physique intense liée au vol battu alors que la pression partielle en oxygène est très faible, exposant ces oiseaux à une hypoxie de longue durée (Scott *et al.* 2009a ; Butler 2010) associée à des températures très basses (-45°C). Enfin, les colibris, oiseaux de quelques grammes, approchent les limites maximales des capacités métaboliques aérobies des vertébrés (40 mL O₂.g⁻¹.h⁻¹) pour soutenir l'effort musculaire requis lors de leur vol stationnaire (Suarez & Gass 2002).

Les oiseaux sont ainsi capables de repousser les limites de la physiologie afin de maintenir leur homéostasie et de coloniser de nouvelles niches écologiques. Ceci passe obligatoirement par une gestion très fine de leur budget énergétique déterminé par leur capacité d'adaptation métabolique. Aux contraintes énergétiques imposées par l'environnement s'ajoutent, pour certains oiseaux, une production importante de radicaux libres générés par l'hypoxie épisodique à laquelle ils peuvent être soumis, par exemple lors de vols à haute altitude pour les migrants ou lors de la plongée en apnée pour les oiseaux plongeurs.

Les oiseaux plongeurs des régions polaires sont des modèles pertinents pour caractériser les mécanismes leur permettant de surmonter les contraintes à la fois énergétiques et oxydatives. Les manchots notamment, qui vivent dans les régions antarctiques et sub-antarctiques, sont constamment exposés à de basses températures, défavorables au maintien de leur endothermie. Ils sont aussi

naturellement soumis à des variations de leur état nutritionnel, alternant des phases de jeûne prolongé à terre et de réalimentation en mer, conditionnées par leur cycle de reproduction. Ils sont complètement dépendants des réserves halieutiques de l'océan et de la couverture glaciaire qui impose de longs voyages alimentaires et des plongées profondes et répétées en apnée, favorisant des variations importantes de la disponibilité en oxygène. En réponse à ces différentes contraintes, ces oiseaux alternent des épisodes d'hypermétabolisme en mer et d'hypométabolisme à terre.

L'intérêt du laboratoire pour l'étude des mécanismes physiologiques développés en réponse aux contraintes environnementales, et plus particulièrement les basses températures, a conduit de nombreux chercheurs à étudier le manchot Royal (*Aptenodytes patagonicus*) à Crozet et le manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*) en Terre Adélie, oiseaux présentant un grand intérêt scientifique vis-à-vis de leurs capacités importantes de thermorégulation au froid et de gestion de leur budget énergétique. Nous avons pu bénéficier des approches expérimentales et des prélèvements musculaires effectués sur des manchots Royaux à divers moments de leur vie. Parallèlement, nous avons eu l'immense bonheur de poser le pied sur le continent antarctique lors d'une mission de 3 mois en terre Adélie et de partager notre temps entre le suivi « terrain » de la croissance du manchot Adélie, les prélèvements et les analyses tissulaires et moléculaires. Nous avons ainsi pu travailler sur deux espèces de manchots ayant des cycles de vie et de reproduction court (4 mois) pour le manchot Adélie, ou long pour le manchot Royal (14 mois), chacun de ces oiseaux étant soumis à différentes contraintes environnementales.

Si le développement de mécanismes adaptatifs particuliers sélectionnés au cours de l'évolution a certainement joué un rôle central dans la conquête de ces milieux polaires par les différentes espèces de manchots, l'explication de leur survie repose aussi sur leur plasticité phénotypique, capacité permettant d'exprimer plusieurs phénotypes à partir d'un même génotype, ceci grâce à des modifications d'ordre comportementales, physiologiques, etc... En effet, les changements brutaux de contraintes environnementales (dus à l'alternance entre milieu terrestre et marin par exemple) les obligent à s'acclimater pour optimiser leurs performances et maintenir au mieux leur homéostasie. Il nous a donc paru essentiel d'explorer les mécanismes d'acclimatation qui, tout au long de leur cycle biologique, assurent la survie des manchots dans l'environnement polaire. Ceux-ci doivent probablement être sous-tendus par des variations d'expression de gènes clés jusqu'alors inexplorées.

La mise en œuvre d'une technologie d'exploration génique à large échelle, comme la puce à ADN, apparaît pertinente pour décrypter ces mécanismes moléculaires. Cependant, l'utilisation de ces puces à ADN commerciales restreint cette technique aux seuls modèles de laboratoire, privant tout un volet de l'écophysiologie du bénéfice de ces approches. Nous avons donc d'abord étudié la faisabilité d'utiliser pour le manchot une puce à ADN spécialement conçue pour le poulet, développé un algorithme d'analyse, nommé **maxRS**, capable d'interpréter les données issues de l'hybridation hétérologue, puis validé une partie de ces résultats par une autre approche méthodologique, la PCR

quantitative. Nous avons choisi d'étudier les régulations géniques à l'origine des mécanismes d'acclimatation impliquant le muscle squelettique, en raison de son rôle dans l'équilibre du budget énergétique, la locomotion et le développement d'une thermogenèse adaptative chez l'oiseau.

Ce développement méthodologique nous a permis de cribler, à large échelle, un grand nombre de gènes dont l'expression varie lors de **l'acclimatation au milieu marin du manchot Royal juvénile** qui doit faire face brutalement à une multitude de contraintes énergétiques (thermogenèse, exercice physique intense et endurant) et oxydatives (hypoxies intermittentes liées au comportement de plongée), affectant le muscle squelettique. Nous avons ainsi mis en évidence l'activation ou l'inhibition de familles de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et les mécanismes de lutte contre les radicaux libres de l'oxygène. Ces résultats ont été recoupés avec d'autres approches plus intégratives (abondance des protéines, activité enzymatique, calorimétrie indirecte), permettant à la fois de mieux caractériser les mécanismes d'acclimatation développés par les manchots Royaux lors de cette étape et de compléter la validation de nos résultats obtenus grâce à cette technologie de puces à ADN.

Ciblant encore les processus d'acclimatation, nous avons utilisé la situation particulièrement contraignante du **poussin manchot Adélie** qui ne dispose que de 2 mois pour croître, acquérir son autonomie thermique et ses plumes définitives pour réussir son départ en mer et acquérir ainsi son autonomie nutritionnelle. Le coût énergétique engendré par ces contraintes est lourd et nécessite un ajustement métabolique qui a motivé le dernier volet de notre étude. Par une approche intégrative de l'animal entier à l'expression génique, nous avons caractérisé les mécanismes compétiteurs qui permettent au poussin d'assurer à la fois sa croissance et la maturation des mécanismes thermogènes dans des conditions climatiques sévères où la température est toujours négative.

Aussi, la première partie consiste en une synthèse bibliographique dont le but est de présenter la biologie des deux espèces de manchots utilisées comme modèle d'étude, et de décrire brièvement les différentes contraintes auxquels ces oiseaux sont soumis tout au long de leur cycle de vie. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux contraintes énergétiques et oxydatives et essaierons de remettre en perspective les mécanismes physiologiques connus chez différentes espèces pour répondre à ces contraintes. Nous consacrerons la fin de cette partie à des rappels concernant les principes de nos approches moléculaires et leurs limites. La deuxième partie est consacrée aux résultats des études expérimentales présentés sous forme d'articles publiés, soumis pour publication ou en préparation permettant d'explicitier notre approche moléculaire et mettre en évidence les mécanismes d'acclimatation développés par ces oiseaux au cours de différents stades de leur cycle biologique. Dans une dernière partie, nous nous sommes enfin attachés à élargir notre discussion pour placer nos résultats dans un contexte écophysiologique et montrer leur intérêt pour évaluer les formidables capacités que possèdent ces oiseaux pour survivre dans un environnement aussi « extrême ». Nous

proposons de nouvelles perspectives, de nouveaux questionnements, en relation avec le développement actuel de nouvelles techniques d'études de ces mécanismes d'acclimatation.

Rappels bibliographiques

Chapitre 1 : Le manchot, oiseau emblématique de l'Antarctique

« Cet oiseau-poisson, que nous avons déjà vu à l'île Tristan da Cunha, est organisé de manière à pouvoir plutôt nager que voler. Au lieu d'ailes, il a deux nageoires aplaties, et son corps est couvert d'un feutre serré, plutôt semblable à de la soie qu'à de la plume ; on dirait même que ses petites rames sont couvertes d'écailles »

L'explorateur Jules Dumont d'Urville, début du 19^{ème} siècle.

1/ Description générale

Son nom d' « oiseau-poisson », utilisé par les explorateurs de ces contrées de l'extrême sud, provient de sa longue évolution dans le milieu marin qui a conduit au développement de caractéristiques anatomiques et physiologiques adaptées à la plongée, rendant alors le manchot inapte au vol. Oiseau pélagique, le manchot passe 80% de sa vie dans l'océan et effectue des voyages alimentaires de plusieurs jours voire semaines en haute mer, pouvant représenter jusqu'à plusieurs centaines de kilomètres (Pütz 2002). Il revient à terre uniquement pour muer et se reproduire (Marion 1995).

Parmi les adaptations les plus remarquables, nous pouvons noter l'évolution des ailes fragiles en palettes natatoires courtes et rigides, dont les mouvements ascendants puis descendants assurent la propulsion (Bannasch 1995 ; Watanuki *et al.* 2003 ; Schmidt 2006). Ceci s'est accompagné d'un aplatissement des os et d'une modification du système tendineux pour rigidifier l'aileron et augmenter l'hydrodynamisme. De plus, l'ossature du manchot est dense (ossature calcifiée non pneumatique) afin de diminuer la flottabilité et donc faciliter son immersion lors des plongées (Wilson *et al.* 1992). Le plumage, court (~30-40 mm) et très dense (de 17 à 35 plumes par cm² de peau), assure l'hydrodynamisme, une isolation thermique et une étanchéité maximale (Le Maho *et al.* 1976 ; Dawson *et al.* 1999). La couleur des plumes permet un camouflage efficace en mer : blanc sur le ventre pour mimer la lumière du soleil et tromper les prédateurs quand il est en surface, et sombre sur le dos pour se confondre dans les profondeurs (Marion 1995).

Sous le terme vernaculaire « manchot » ont été regroupées les espèces d'oiseaux de la famille des Sphéniscidés, toutes présentes dans les océans de l'hémisphère sud, des eaux tempérées des Galapagos jusqu'au bord du continent antarctique (Bertelli & Giannini 2005 ; Clarke *et al.* 2007).

2/ L'environnement antarctique

Les deux espèces de manchots qui ont fait l'objet de notre étude vivent et se reproduisent soit sur le continent antarctique pour le manchot Adélie (*Pygoscelis Adeliae*), soit dans les îles sub-antarctiques pour le manchot Royal (*Aptenodytes patagonicus*) ; il nous a donc paru intéressant de décrire ces environnements antarctique et sub-antarctique, source de contraintes majeures pour les espèces (Marion 1995).

Depuis le créacé, le continent antarctique est localisé au pôle sud et isolé des autres continents par l'océan austral. Le courant circumpolaire antarctique (ACC : Antarctic Circumpolar Current), entourant le continent depuis l'ouverture du passage de Drake entre l'Antarctique et l'Amérique du sud (41 millions d'années), a favorisé le refroidissement du continent et l'accumulation des glaces (70% des eaux douces mondiales sont contenues sous forme de glace dans cette calotte polaire) (Turner *et al.* 2009).

Du fait du contact de l'océan antarctique avec les 3 principaux océans de la planète (Pacifique, Indien, Atlantique), l'ACC représente l'un des moteurs de la circulation thermohaline autour de la planète (Wunsch 2002 ; Turner 2009), favorisant les flux de chaleur et de sel entre les océans (**Figure 1A**). En effet, les effets conjugués de la salinité et de la température font varier la densité de l'eau, créant ainsi les courants océaniques à l'origine de cette circulation thermohaline. Il en résulte une répartition des différentes masses d'eau autour de l'Antarctique selon une structure latitudinale très marquée, avec des transitions abruptes en termes de caractéristiques physico-chimiques, limitant le brassage des eaux. De l'Antarctique vers l'Equateur, la répartition des masses d'eau est hétérogène et est subdivisée en différentes zones (**Figure 1B**) (Grant 2006):

- La PFZ (Polar Front Zone) (en gris clair), au nord de l'océan Austral avec la succession du Front Polaire Antarctique (FPA), du Front Sub-Antarctique (FSA) et du Front Sub-Tropical (FST),
- La POOZ (Permanently Open Ocean Zone) (en bleu) se trouve entre la limite Nord du FPA et la limite d'extension maximale de la banquise sud,
- La SIZ (Seasonal Ice Zone) (en violet) s'étend du continent à la zone marginale de la glace de mer en hiver.

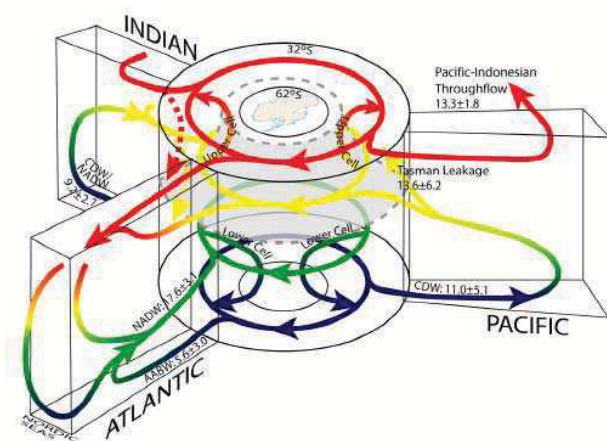
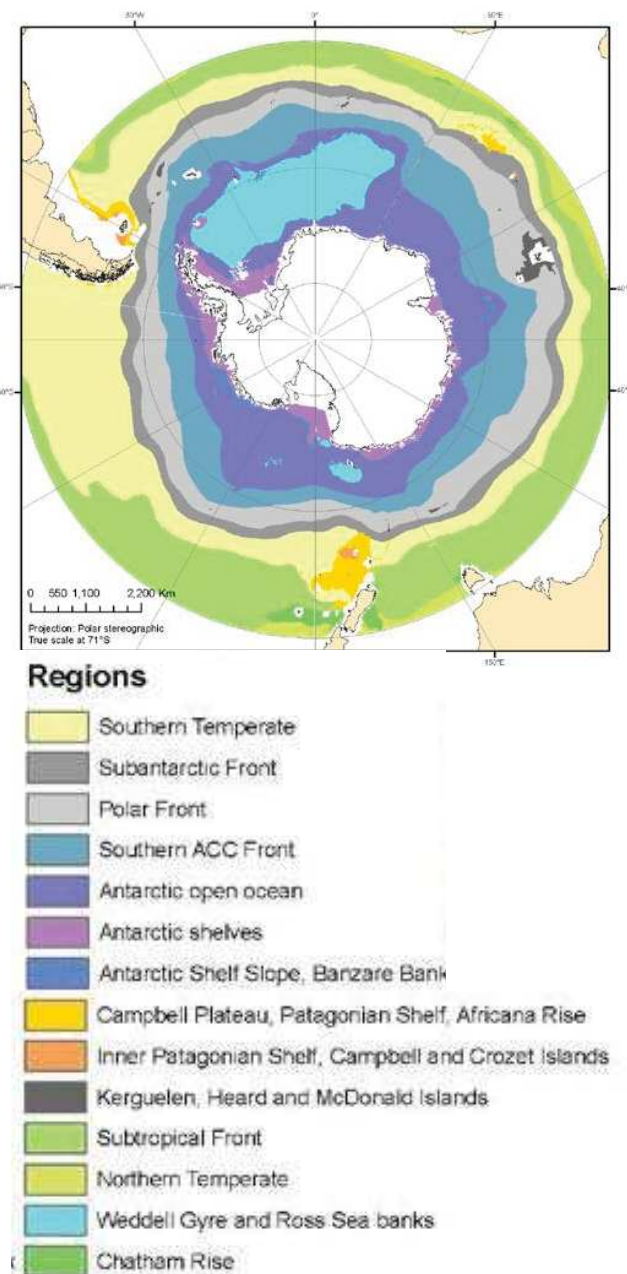


Figure 1 : L'importance du courant circumpolaire

A : Le courant circumpolaire représente un des moteurs de la circulation thermohaline à l'échelle planétaire. Ce schéma montre les liens entre les différents courants océaniques (profond et superficiel), symbolisés par des flèches, dont l'une des principales cellules de convection tourne autour du continent antarctique, favorisant le déplacement de ces courants au niveau planétaire (Turner et al. 2009)

B : Biorégionalisation de l'Océan Austral reposant sur l'utilisation de facteurs abiotiques et la chlorophylle (Grant et al. 2006).



Cette régionalisation des masses d'eau influence les conditions environnementales des écosystèmes océaniques et terrestres répartis autour de l'Antarctique. Communément, deux grandes écozones sont retrouvées (**Figure 2**) :

- **Le milieu Antarctique**, comprenant les zones continentales et océaniques (jusqu'au front polaire). Le continent est un désert glacé, avec des températures moyennes, à l'intérieur, qui fluctuent entre -60°C l'hiver et -30°C l'été, empêchant toute vie. Sur les côtes, les températures sont plus élevées avec des moyennes négatives mais avoisinant 0°C l'été et -16°C en hiver. Ces températures « extrêmes » sont associées à des précipitations rares ainsi qu'à des vents violents (200 km/h) faisant de ce continent l'un des plus arides du globe (Turner et al. 2009).

- **Le milieu Sub-antarctique** se situe entre le front polaire et la convergence Sub-Tropicale. Les îles de cette zone bénéficient de température plus clémentes (entre -5 et +15°C avec une moyenne annuelle de 5°C) associées à des vents importants (100km/h) et fréquents, ainsi qu'un taux d'humidité élevé (85%) dû aux précipitations quotidiennes (300 jours par an) et conséquentes (2500 mm par an) (Turner *et al.* 2009).

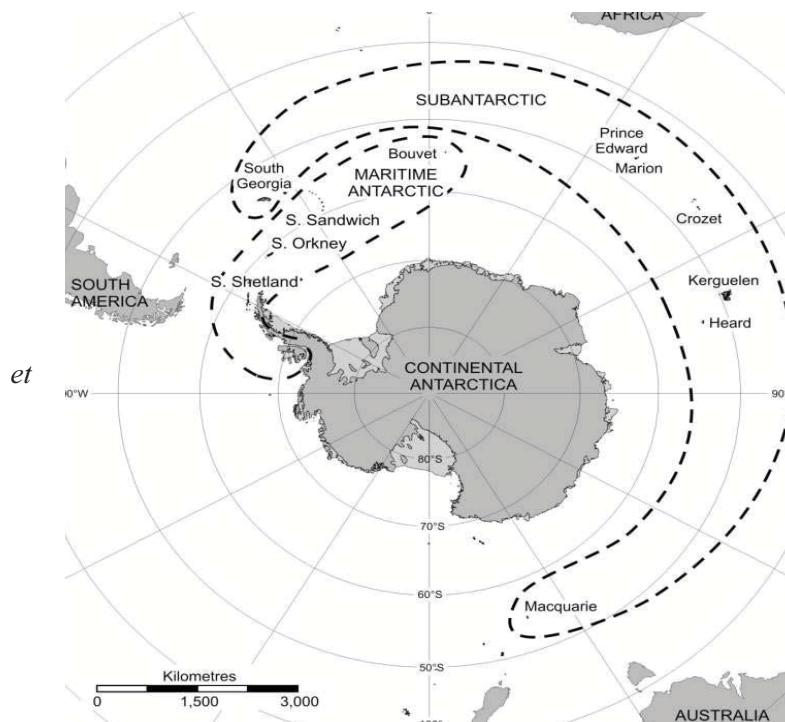


Figure 2 : Les grandes écozones présentes autour de l'Antarctique. *Le rôle du courant circumpolaire dans la répartition des masses d'eaux autour de l'Antarctique délimite différentes écozones dont les paramètres physico-chimiques influencent fortement l'apparition la répartition des espèces de manchots vivant autour de l'antarctique.*

3/ Les différentes espèces de manchots

Dans la famille des Sphéniscidés, 17 espèces de manchots sont actuellement inventoriées, dont 2 sous-espèces de Gorfous Sauteurs (*Eudyptes chrysocome*) (**Figure 3**), et pas moins d'une quarantaine d'espèces fossiles (Clarke *et al.* 2007). Toutes ces espèces sont présentes dans des régions traversées soit par le courant circumpolaire, soit par ses ramifications. Des études morphologiques et moléculaires ont permis de mettre en évidence une origine phylogénique commune pour les différentes espèces actuelles de manchots (Bertelli & Giannini 2005), avec des phénomènes de spéciation calqués sur les différents environnements présents autour de l'Antarctique (Mackintosh 1960) (**Figure 3**).

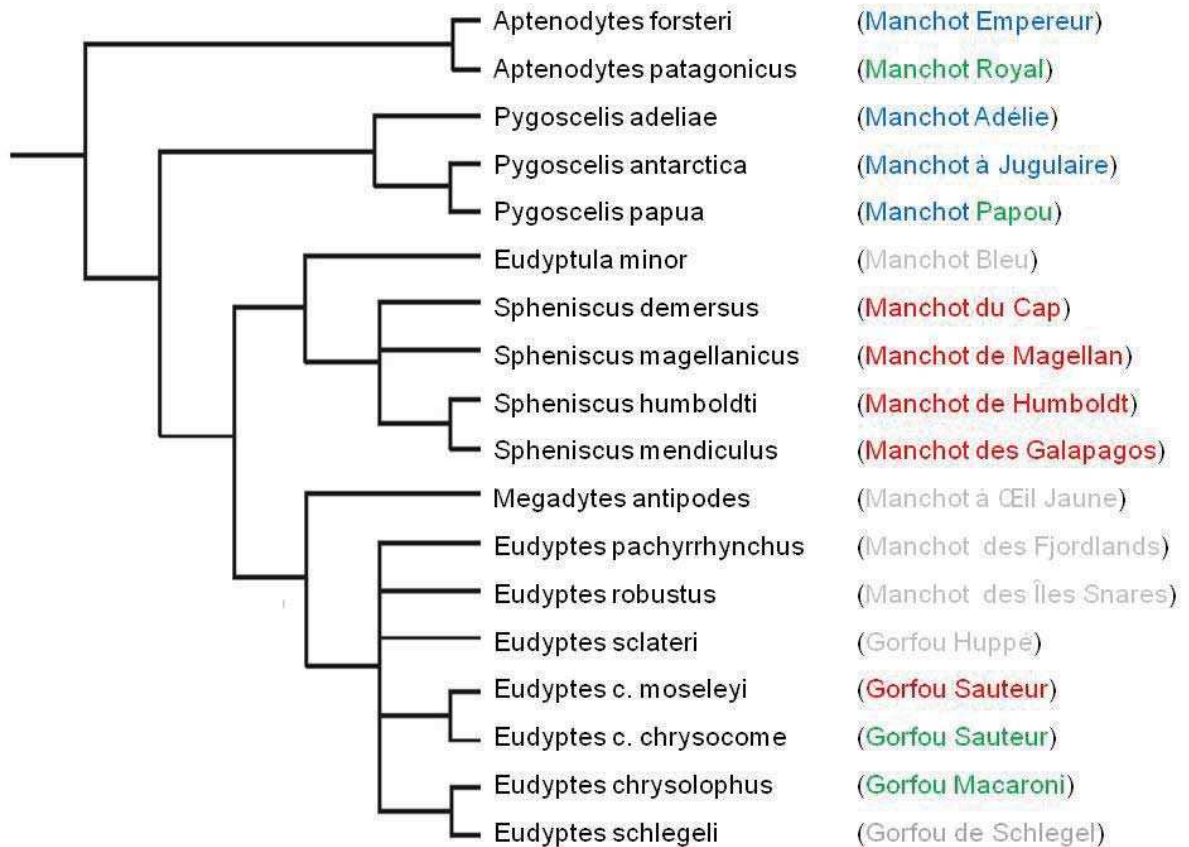


Figure 3 : Classification phylogénétique des différentes espèces de manchots proposée par (Bertelli & Giannini 2005). Sont représentés : en bleu, les manchots de la zone antarctique ; en vert, ceux de la zone sub-antarctique ; en gris ceux de la zone proche de l’australie et nouvelle zélande ; en rouge ceux de la zone sub-tropicale et tropicale (cas particulier du manchot papou dont une de ces sous-espèce possède une répartition dans la zone antarctique et l’autre dans la zone sub-antarctique). (D’après Jouventin *et al.* 1980)

Les différentes masses d’eaux jouent le rôle de véritables barrières physiques (comme en milieu terrestre, l’apparition d’une chaîne de montagne) qui isolent les populations et favorisent la mise en place d’une spéciation vicariante. Celle-ci a d’ailleurs déjà été mise en évidence chez des populations benthiques (Clarke *et al.* 1992 ; Clarke *et al.* 2004) et pélagiques de l’océan austral (Patarnello *et al.* 1996). Ainsi, les évènements géologiques antérieurs ayant modifié la limite entre ces masses d’eaux concourent à l’apparition de nouvelles espèces, comme décrit par De Dinechin *et al.* (de Dinechin *et al.* 2009) dans son étude sur les Gorfous Sauter. De plus, la fidélité des manchots à leur lieu de reproduction (Forcada *et al.* 2008) et l’insularité ont pu favoriser l’évolution de différents traits spécifiques liés à chaque île, et à terme, la spéciation (Blondel 2000). Par comparaison avec les études réalisées chez les organismes habitant en milieu désertique (Williams & Tieleman 2005), il est envisageable que les différences de températures des masses d’eaux aient exercé des pressions de

sélection sur certains gènes impliqués dans la thermogénèse de ces oiseaux, favorisant ainsi la séparation de certaines populations de manchots (Jouventin *et al.* 2006 ; de Dinechin 2009 ; de Dinechin *et al.* 2009).

4/ Impact de l'environnement sur le cycle de reproduction des manchots

La forte production primaire qui se situe aux alentours des convergences entre les différentes masses d'eaux explique la présence des manchots qui bénéficient d'une nourriture abondante (Charrassin & Bost 2001). Les conditions environnementales très contraignante, notamment les basses températures, vont obliger ces oiseaux à développer des stratégies comportementales et physiologiques afin de conserver leur température interne à un niveau élevé et constant, crucial pour leur survie dans les milieux antarctiques et sub-antarctiques (Marion 1995). L'intérêt de ces stratégies visant à conserver la chaleur interne de ces oiseaux et leur fonctionnement sera explicité dans le prochain chapitre. Utilisant le gradient de température entre les zones sub-antarctiques et antarctiques, nous avons ciblé l'étude des mécanismes d'acclimatation au froid chez 2 espèces de manchots, d'une part le manchot Royal à Crozet, île sub-antarctique, et le manchot Adélie en Terre Adélie sur le continent Antarctique, lors de phases clés de leur développement.

a/ Le manchot Royal (*Aptenodytes patagonicus*)

Inféodé aux eaux froides de la zone sub-antarctique, le manchot Royal est réparti en 2 sous-espèces qui se distinguent par leur zone géographique de reproduction. *Aptenodytes p. halli* est présent dans les îles Macquarie, Kerguelen, Crozet, Prince Edouard, Marion, Heard et Mc Donald, alors que *Aptenodytes p. patagonicus* se reproduit sur les îles Malouines et la Géorgie du Sud. Leur population totale est estimée à 1,6 millions de couples (Woelher 1993 ; Marion 1995).

Les températures clémentes de la zone sub-antarctique permettent au Manchot Royal d'accéder librement aux zones de reproduction tout au long de l'année (Le Maho 1981). Cet oiseau, mesurant 85-95 cm de haut pour une masse moyenne de 12-14 kg, possède un cycle de reproduction relativement long, 14 à 16 mois, induisant une absence de synchronisation des cycles de reproduction entre les différents oiseaux de la colonie (Le Maho 1981 ; Barré 1984b) et ne permettant que 2 reproductions tous les 3 ans.

Les manchots Royaux pondent un unique œuf par an. Pendant les 33 premiers jours post-éclosion, le poussin est protégé par la poche incubatrice parentale. A la fin de cette période d'élevage

individuel, le poussin, recouvert d'un épais duvet très isolant (Duchamp *et al.* 2002), s'émancipe thermiquement et se regroupe avec ses congénères pour constituer une crèche. Le nourrissage du poussin oblige les parents à réaliser de nombreux allers-retours pendant toute la période estivale, qui vont se raréfier durant la période hivernale du fait de l'éloignement de la ressource alimentaire. Cet oiseau a donc dû développer des stratégies spécifiques afin de survivre aux contraintes du milieu sub-antarctique. Après cette période de jeûne alimentaire, le poussin mue et acquiert ses plumes de nage, indispensables à sa vie marine (Rey 2008).

Comme nous le décrivons plus précisément dans le prochain chapitre, l'immersion du juvénile dans les eaux froides de la zone sub-antarctique de l'océan Indien représente une contrainte énergétique majeure (Barré & Roussel 1986). Au cours de cette phase, il développe alors un ensemble de mécanismes de lutte contre le froid, indispensables à sa survie dans l'océan, milieu dans lequel il évoluera durant 80% de son temps (Rey 2008).

Nous avons résumé la chronologie des étapes fondamentales de la vie du manchot Royal dans le schéma ci-dessous :



Figure 4 : Cycle de reproduction du manchot Royal (D'après Barré 1984b)

b/ Le manchot Adélie (Pygoscelis adeliae)

Avec une population estimée à 5,2 millions d'individus, dont 2,5 millions de couples, le manchot Adélie est au 4^{ème} rang des espèces de manchot les plus abondantes (Woehler *et al.* 1993). Les colonies de manchots Adélie sont présentes en bordure du continent antarctique, sur les rochers libres de glace, proches des zones de polynies (zones d'eau libre entourées de glace), lieux favorables à la présence du krill, principale source de nourriture de ces oiseaux. Malgré une diminution des

populations de manchots Adélie vivant en péninsule antarctique, la population globale est en augmentation significative depuis 50 ans (Woehler 2001 ; Ainley *et al.* 2003).

Haut de 75 cm, cet oiseau de 5-6 kg profite du court été antarctique pour se reproduire. Arrivés sur la colonie mi-octobre, dès le début de la débâcle, les mâles s'installent dans les zones rocheuses et confectionnent chacun un nid de cailloux. Avec l'arrivée des femelles débutent les parades précédant la phase d'accouplement quelques jours plus tard. Une semaine après l'accouplement, la femelle pond 2 œufs qui éclore environ 35 jours plus tard (Marion 1995).

Les poussins manchots Adélie, espèce semi-altricielle, naissent couverts d'un mince duvet et restent sur le nid, nourris et protégés par leurs parents. Pendant les 7 premiers jours, les poussins sont complètement dépendants de la protection thermique parentale puis, trop gros pour bénéficier de la poche incubatrice, ils sont soumis à une exposition partielle au froid jusqu'au 15^{ème} jour de leur développement. Pendant cette période, ils sont nourris alternativement par l'un ou l'autre membre du couple, consommant jusqu'à 60% de leur masse en krill (Culik 1994). Dès la troisième semaine, ils s'émancipent thermiquement et affrontent l'environnement froid. La multiplication des voyages alimentaires des parents assurent aux poussins un nourrissage intensif nécessaire à leur croissance rapide. A 2 mois, après avoir mué et acquis leurs plumes de nage, les poussins doivent réussir leur passage en mer, juste avant l'embâcle (Raccurt *et al.* 2008).

La croissance du poussin Adélie est donc extrêmement rapide, liée étroitement aux conditions climatiques. Les étapes importantes sont représentées sur le diagramme ci-dessous.

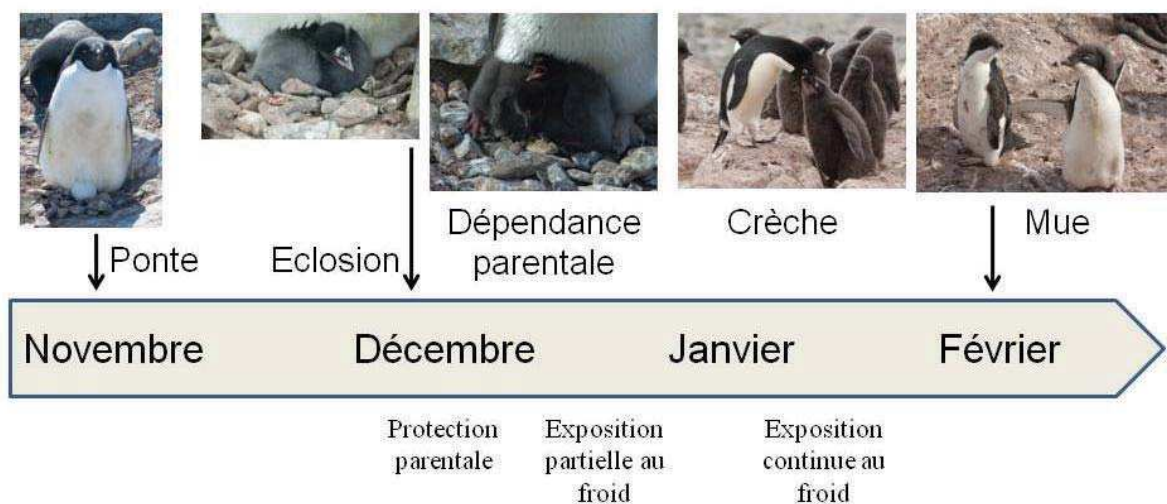


Figure 5 : Croissance du poussin manchot Adélie (D'après Bucher *et al.* 1990)

Le poussin manchot Adélie doit donc simultanément optimiser sa croissance et développer des mécanismes efficaces de lutte contre le froid. Ceci représente une contrainte énergétique majeure qui implique probablement un compromis physiologique entre croissance et thermogenèse, en harmonie avec les étapes cruciales du développement du poussin.

En résumé, nous avons utilisé les différences dans la biologie et la répartition de deux espèces de manchots, manchot Royal et manchot Adélie, soumis chacun à des contraintes environnementales spécifiques et présentant des cycles de reproduction bien différents, 14 mois pour le manchot Royal et 4 mois pour le manchot Adélie, pour mettre en évidence des processus de plasticité phénotypique plus ou moins importants impliqués dans les capacités d'acclimations de ces oiseaux au froid. Au cours de leur cycle de vie, les manchots sont constamment soumis aux températures froides de l'environnement polaire. Deux phases d'exposition au froid nous ont cependant semblé critique chez ces oiseaux : i) le passage du manchot Royal de la vie terrestre à la vie marine, où des études antérieures ont montré des modifications métaboliques et des capacités d'isolation de ces oiseaux (Barré 1984b ; Barré & Roussel 1986) et ii/ la croissance extrêmement rapide du poussin manchot Adélie dans un environnement très hostile où les températures sont toujours négatives et les vents violents. Ces 2 investigations n'ont pu être réalisées sur la même espèce du fait de l'absence de retour des manchots Adélie immatures sur la colonie la saison suivante (ceux-ci ne revenant que lorsqu'ils peuvent se reproduire) et, pour le manchot Royal, d'un cycle de développement très long (plus d'un an) entrecoupé de périodes de jeûne alimentaire. L'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à l'acclimation au froid au cours de ces phases critiques et chez ces deux espèces d'oiseaux polaires a été notre objectif.

Chapitre 2 : La contrainte thermique

La température ambiante est un facteur qui limite la survie et oriente la distribution géographique des espèces (Duchamp 1990 ; de Dinechin 2009). Comme tous les oiseaux, les manchots sont des endothermes. Ils sont capables de réguler leur température corporelle à un niveau élevé et constant, dans une large gamme de températures extérieures. Contrairement aux ectothermes, organismes (amphibiens, reptiles, poissons, insectes) dont la température corporelle est influencée par les fluctuations thermiques de l'environnement, les endothermes peuvent accroître leur niveau de métabolisme afin de produire de la chaleur et maintenir leur température corporelle. Ce maintien de la température interne permet aux organismes de conserver un niveau d'activité indépendant des conditions extérieures, tout en maintenant l'intégrité de l'organisme (Barré *et al.* 2001). Les manchots, confrontés régulièrement à des températures très basses, ont dû développer différents mécanismes pour vivre et se reproduire dans de telles conditions.

1/ Influence de l'environnement sur le maintien de la température interne

La régulation de la température interne résulte d'un équilibre entre les mécanismes de pertes de chaleur (thermolyse) et de production de chaleur (thermogenèse). Classiquement, cet équilibre est atteint lorsque : $M \pm K \pm C \pm R - E = 0$

Avec M la production de chaleur par le métabolisme, K les échanges par conduction, C les échanges par convection, R les échanges par radiation, et E les pertes thermiques par évaporation (Duchamp 1990).

Pour maintenir leur homéothermie, les endothermes doivent réguler précisément l'activité des mécanismes de production (thermogenèse de régulation) et de perte de chaleur (évaporation) en fonction de la température ambiante (**Figure 6**). Au-delà de la température critique supérieure, ils doivent augmenter leurs pertes de chaleur (sudation, polypnée, vasodilatation périphérique) afin d'éviter l'hyperthermie, qui n'apparaît que lorsque les mécanismes de thermolyse sont dépassés. A l'inverse, lorsque la température ambiante est inférieure à la température critique inférieure, l'endotherme doit produire de la chaleur, se traduisant par une augmentation de son métabolisme, conséquence de l'activation d'une thermogenèse de régulation. Dans notre cas particulier, nous nous intéresserons uniquement aux mécanismes de lutte contre le froid (Barré *et al.* 2001).

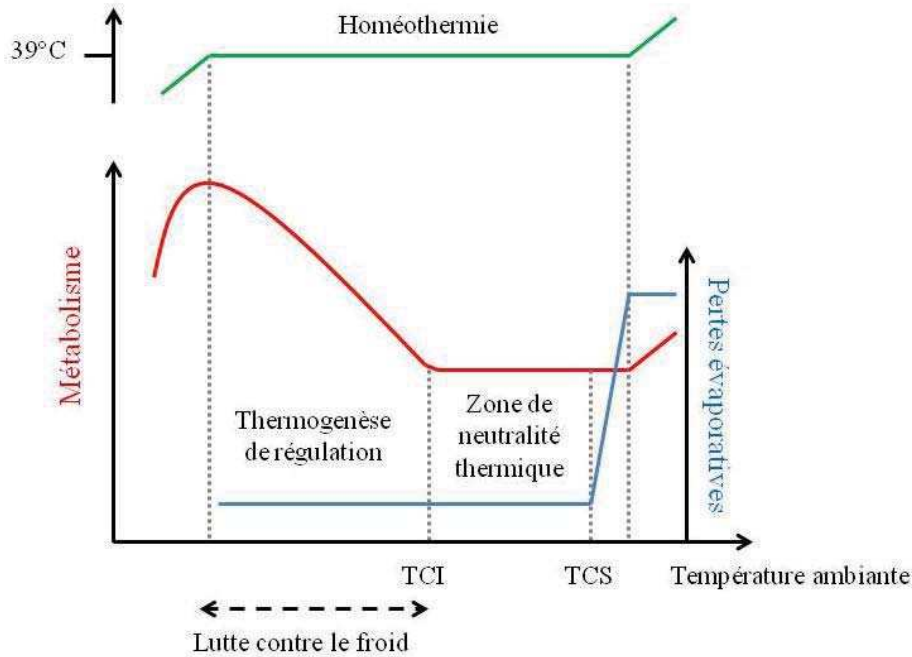


Figure 6 : Variation de la température interne d'un endotherme et de son métabolisme en fonction de la température ambiante (D'après Barré 1984b et Teulier 2010). *Un endotherme est capable de maintenir sa température interne dans une large gamme de températures ambiantes que nous pouvons subdiviser en 3 zones : la zone de neutralité thermique entre la température critique inférieure (TCI) et la température critique supérieure (TCS), la zone au delà de la TCS où la thermolyse intervient pour augmenter les pertes thermiques, la zone en dessous de la TCI où la thermogénèse de régulation s'active afin de produire de la chaleur.*

Comme l'indique la **figure 6**, la température joue un rôle essentiel dans la stimulation des mécanismes thermogènes. Cependant, à une température donnée en dessous de la TCI, l'augmentation de la conductivité thermique du milieu va accroître les pertes thermiques, et stimuler plus intensément les mécanismes thermogènes, se traduisant par une augmentation du métabolisme de l'animal. La conductivité thermique dépend des caractéristiques physico-chimiques de l'environnement et nous oblige à distinguer l'environnement marin de l'environnement terrestre (Barré *et al.* 2001 ; Teulier 2010).

a/ Dans l'océan antarctique

L'immersion d'un endotherme en milieu marin représente un stress thermique important. En effet, la conductivité de l'eau, 23 fois supérieure à celle de l'air ($0,6 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ contre $0,026 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ respectivement), augmente les pertes thermiques (Barré & Roussel 1986). Pour exemple, le temps de survie d'un humain dans une eau dont la température se situe en dessous de zéro n'excède pas plus de

quelques minutes (Ducharme & Lounsbury 2007). Les manchots, quant à eux, évoluent la majorité de leur vie dans l’océan austral, dont la température moyenne est de $-1,5^{\circ}\text{C}$ aux abords de la Terre Adélie et même le manchot Royal peut être exposé à une température de l’eau de $-0,8^{\circ}\text{C}$ lors de certains voyages alimentaires (Charrassin & Bost 2001). Leur vie dans le milieu marin favorise les pertes par conduction, lesquelles sont renforcées par les phénomènes de convection dus au déplacement dans l’eau ($2\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ pour le manchot Royal) (Kooyman *et al.* 1992).

b/ En milieu terrestre

La différence importante entre la température interne du manchot (aux alentours de 39°C) et la température de l’environnement polaire (inférieure à 0°C) favorise les pertes thermiques par conduction. Ces pertes, plus faibles que dans le milieu marin, sont énormément augmentées sous l’effet des vents violents (pouvant atteindre 200km/h) et de l’hygrométrie (particulièrement élevée à Crozet) qui renforcent le pouvoir refroidissant de l’air (effet Windchill).

Pour maintenir leur endothermie, les manchots ont développé différentes stratégies visant d’une part à limiter les pertes thermiques et d’autre part à optimiser l’efficacité des mécanismes thermogènes.

2/ Comment lutter contre le froid ? Diminuer la thermolyse...

a/ Les adaptations morphologiques

La **forme ovoïde** du manchot associée à la réduction de ses extrémités (membres inférieurs courts, absence de cou) **diminue son ratio Surface/Volume**. Ceci permet de minimiser la surface exposée, lieu d’échanges thermiques avec l’environnement, et les pertes caloriques par unité de poids.



Figure 7 : Photographie du plumage d’un manchot Adélie adulte au niveau du dos. *Au centre de la photographie apparaît le duvet blanc isolant recouvrant la surface cutanée, le duvet est protégé par des plumes rigides.*

Une bonne isolation thermique est essentielle pour maintenir la température interne de l’oiseau. Elle est assurée, au stade poussin, par un **duvet épais, très isolant** lorsque l’air est sec, mais dont l’efficacité est fortement compromise en cas de précipitations ou de

fortes rafales de vent (Duchamp *et al.* 2002). Les manchots adultes possèdent **des plumes serrées (Figure 7)** qui jouent le rôle d'un véritable rempart du fait de leur faible conductivité thermique ($1,93 \text{ W} \cdot \text{°C}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ mesurée chez le manchot Papou (*Pygoscelis papua*)) (Kooyman *et al.* 1976) et de leur étanchéité (Dawson *et al.* 1999). Elles permettent de limiter les pertes thermiques par convection et réduire au minimum celles qui sont produites par radiation (Dawson *et al.* 1999). Cette protection est très efficace dans l'air, représentant 73 à 87% de l'isolation globale (Le Maho *et al.* 1976 ; Barré 1984a), mais relativement limitée dans l'eau, puisqu'elle représente seulement 8 à 10% de l'isolation totale pour les manchots Macaroni (*Eudyptes chrysolophus*) et Royaux respectivement (Barré & Roussel 1986 ; Green *et al.* 2005).

Le développement d'**un tissu adipeux sous-cutané** renforce cette isolation (Raccurt *et al.* 2008). En milieu naturel, une étude chez le manchot Macaroni montre qu'une modification de la répartition des réserves énergétiques depuis le tissu adipeux abdominal vers le tissu adipeux sous-cutané permet, lors de l'hiver austral, d'accroître son isolation thermique (Green *et al.* 2005).

Afin de limiter les pertes de chaleur par les extrémités, les manchots possèdent un système vasculaire particulier avec la présence d'**échangeurs thermiques à contre-courant** au niveau des membres supérieurs et inférieurs lesquels sont associés à des mécanismes de vasoconstriction périphérique permettant une redistribution de sang vers les organes profonds (Trawa 1970 ; Kooyman 1989). Chez de nombreuses espèces, la mise en place d'hétérothermies tissulaires favorisées soit par une hypoperfusion sanguine, soit par une perfusion spécifique de sang froid en provenance de la périphérie, permet de diminuer le gradient de température avec l'environnement (favorable à une moindre déperdition de chaleur) et d'abaisser le coût métabolique des tissus refroidis (diminution du coût de la thermogenèse et de l'activité métabolique de ces organes) (Dumonteil *et al.* 1994b ; Handrich *et al.* 1997 ; Schmidt *et al.* 2006 ; Eichhorn *et al.* 2011).

b/ Un comportement adapté

Contrairement à certains oiseaux marins arctiques nidifuges (*Calidris canutus*) qui sont capables de survivre temporairement en dehors du nid malgré des mécanismes thermogènes encore immatures (Schekkerman *et al.* 2003), le manchot, oiseau semi-altricial, reste sur le nid, nourri et protégé par ses parents. A l'éclosion, **les poussins profitent de la chaleur des parents pour conserver leur endothermie** (manchots Papou (*Pygoscelis papua*) et à Jugulaire (*Pygoscelis antarctica*) : (Taylor 1985), manchot Royal : (Barré 1978 ; Duchamp *et al.* 2002), manchot Adélie : (Bucher *et al.* 1990)). Ce **transfert de chaleur** s'effectue **via la poche incubatrice**, zone déplumée du bas-abdomen, richement vascularisée, permettant de maintenir la température du poussin à des valeurs

proches de celles des adultes. Lors de cette phase, le duvet du poussin est mince ce qui favorise les échanges thermiques (Barré 1978 dans Duchamp *et al.* 2002).

Au stade poussin plus avancé et chez les adultes, particulièrement chez les manchots empereurs (*Aptenodytes forsteri*) en période hivernale, **les manchots se regroupent afin de limiter leurs pertes thermiques** avec l'environnement. En effet, cette proximité diminue la surface exposée à l'environnement, favorise l'augmentation de la température au sein de la formation et protège les individus du vent. Ce comportement a pour but de diminuer, à l'échelle de plusieurs individus, le ratio surface exposé sur volume totale de la formation. Observé chez les poussins de différentes espèces de manchots, ce comportement est aussi utilisé par les manchots Empereurs adultes lors de la période de couvaison en plein hiver antarctique. Ceci permet chez ces derniers une réduction de plus de 39% de leur métabolisme par rapport aux oiseaux isolés (Ancel *et al.* 1997 ; Gilbert *et al.* 2008).

Le développement d'une isolation thermique efficace et d'un comportement adapté permet au manchot de limiter au maximum ses pertes thermiques et, par conséquent, diminuer sa température critique inférieure (TCI). Cependant, les conditions climatiques de l'environnement antarctique exposent le manchot à des températures ambiantes inférieures à sa TCI, le contraignant à développer des mécanismes de thermogenèse pour maintenir sa température interne aux alentours de 39°C.

3/ ... et produire de la chaleur

a/ La thermogenèse de frisson

Le frisson thermique est observé lors d'une exposition aigüe au froid des endothermes. Principalement déclenché dans le pectoral et les muscles des pattes chez l'oiseau, le frisson consiste en une contraction involontaire et asynchrone des muscles squelettiques antagonistes, n'induisant aucun mouvement mais produisant de la chaleur. Ce frisson est contrôlé par les motoneurones α suite à une stimulation des récepteurs cutanés et/ou abdominaux, ou à un refroidissement de la moelle épinière, et permet de recruter séquentiellement les fibres musculaires oxydatives puis glycolytiques, si la production de chaleur est insuffisante (Aulie & Tøien 1988). A chaque contraction, le calcium présent dans le réticulum endoplasmique des cellules musculaires est libéré. Son repompage du cytoplasme vers le réticulum par les SERCA (Sarco endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase) augmente la consommation d'ATP, induisant une augmentation de l'activité des voies métaboliques productrices d'ATP. Ceci se traduit alors par une augmentation du métabolisme et une dissipation de l'énergie, normalement allouée à un travail musculaire (mouvement), sous forme de chaleur (Hohtola 2004).

Ce mécanisme de thermogenèse de frisson peut être préjudiciable pour les activités de locomotion, surtout lors d'une exposition chronique au froid. Même si cette hypothèse reste controversée (Hohtola 2004), des études chez différentes espèces d'oiseaux ont montré, lors d'une exposition prolongée au froid, la disparition du frisson thermique, mesuré par l'activité électromyographique musculaire, au profit d'un autre mécanisme de production de chaleur indépendant de l'activité contractile des muscles squelettiques : la thermogenèse sans frisson (synthèse dans Teulier 2010).

b/ La thermogenèse sans frisson

La thermogenèse sans frisson (ou NST pour Non Shivering Thermogenesis) a été observée chez les nouveaux-nés de mammifères ou lors de l'exposition chronique au froid de certains rongeurs.

Chez ces derniers, la présence d'un tissu thermogène spécifique, le tissu adipeux brun (TAB), permet le maintien de l'homéothermie. Cette production de chaleur s'effectue dans les nombreuses mitochondries du tissu, *via* un découplage entre les oxydations des substrats au niveau de la chaîne respiratoire et la phosphorylation de l'ADP en ATP par l'ATP synthase.

Lors d'une exposition au froid des rongeurs, le système nerveux sympathique libère de la noradrénaline qui : **1/ augmente la transcription du gène de l'UCP1** (UnCoupling Protein 1) dans le BAT, **2/ stimule la lipolyse et la libération d'acides gras** pour alimenter la β -oxydation et le cycle de Krebs, fournisseurs d'équivalents réduits à la chaîne respiratoire, **3/ les acides gras activent l'UCP1** qui découple les réactions d'oxydation et de phosphorylation. Ce découplage accroît la consommation de substrats énergétiques et d'oxygène sans augmentation de la production d'ATP. L'énergie du gradient de protons et des oxydations est alors dissipée sous forme de chaleur (Cannon & Nedergaard 2004).

Rappel sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie est un organe intracellulaire, siège de la respiration cellulaire. Le catabolisme des substrats énergétiques par les voies de glycolyse, β oxydation et cycle de Krebs vont aboutir à la formation d'équivalents réduits (NADH , FADH_2). Ces équivalents réduits sont alors oxydés par la chaîne respiratoire mitochondriale, composée de 4 complexes protéiques présents sur la membrane interne des mitochondries. Selon la théorie chimio-osmotique de Mitchell (Mitchell 1961), l'oxydation de ces équivalents réduits par les complexes I (NADH) et II (FADH_2) induit :

- un transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire jusqu'au complexe IV (cytochrome c oxydase) permettant la réduction de l'oxygène en eau ;
- une translocation des protons au niveau des complexes I, III, IV depuis l'espace matriciel vers l'espace intermembranaire.

L'imperméabilité relative de la membrane interne favorise la formation d'un gradient transmembranaire de protons. L'énergie de ce gradient est alors utilisée par l'ATP synthase pour la phosphorylation de l'ADP en ATP, source cellulaire d'énergie, d'où un couplage entre oxydations et phosphorylations.

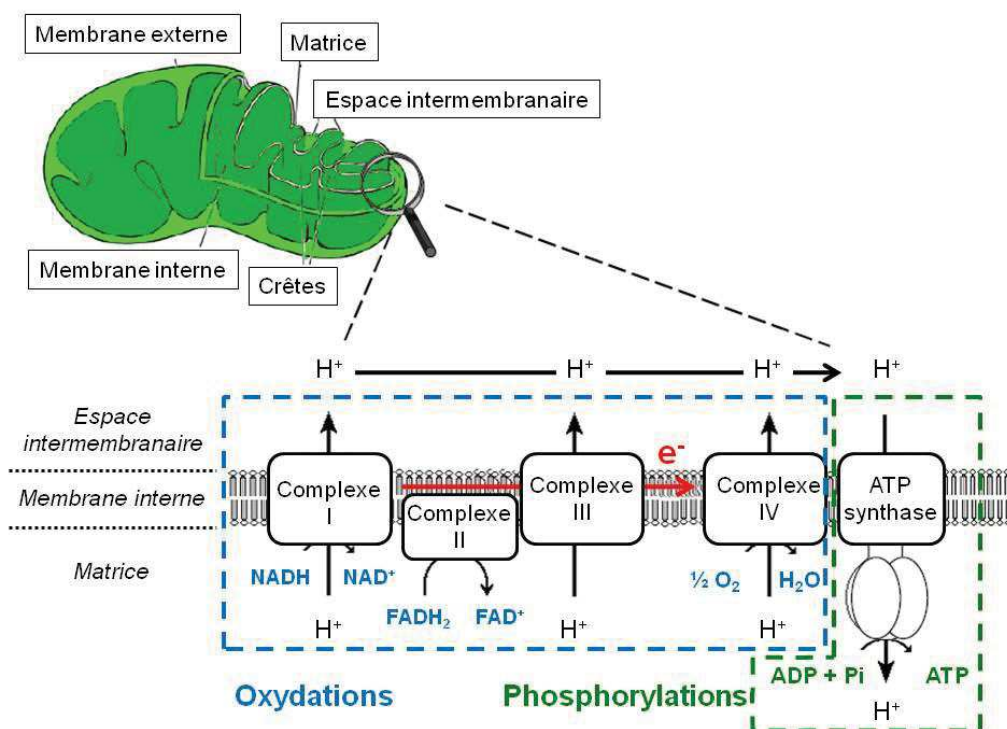


Figure 8: Schéma du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. En bleu sont identifiés les complexes impliqués dans l'oxydation des équivalents réduits favorisant le transfert des protons vers l'espace intermembranaire. En vert, nous avons noté l'ATP synthase, impliquée dans la phosphorylation de l'ADP en ATP.

En l'absence d'un tissu adipeux brun chez l'oiseau, le frisson a longtemps été considéré comme le seul mécanisme de thermogénèse. Des études du laboratoire ont montré que certains oiseaux, dont le poussin manchot Royal, sont capables de développer des mécanismes de NST (Duchamp *et al.* 1989 ; Teulier 2010). Tissu fortement thermogène, le muscle squelettique participe pour près de 70% à la thermogénèse sans frisson chez les canetons acclimatés au froid (Duchamp *et al.* 1993), mais les mécanismes sub-cellulaires mis en jeu sont encore débattus. Deux hypothèses non mutuellement exclusives sont proposées pour expliquer cette NST musculaire :

- La première consiste en une stimulation de la consommation d'ATP, induisant une augmentation du métabolisme mitochondrial et une production de chaleur. La stimulation des cycles futiles du calcium, consistant en une libération du calcium du réticulum sarcoplasmique à travers les récepteurs à la ryanodine puis un repompage grâce aux pompes calcium ATPase, augmente la consommation d'ATP cellulaire (**Figure 9-Hypothèse 1**). L'augmentation du contenu en Ca²⁺ ATPase et en récepteur à la ryanodine mesurée dans le muscle squelettique de canetons acclimatés au froid est un élément en faveur de l'implication de ce cycle futile du calcium dans le développement d'une NST musculaire (Dumonteil *et al.* 1993). Cette hypothèse est appuyée par l'activation de ce mécanisme cellulaire par les acides gras acylés à longue chaîne, lesquels sont accumulés dans le muscle de canard au cours de l'acclimatation au froid (Dumonteil *et al.* 1994a).

- La seconde consiste en un découplage mitochondrial induit par l'acclimatation au froid, à l'image du mécanisme présent dans le BAT des mammifères. Ce découplage a été mis en évidence chez les canetons acclimatés au froid (Roussel *et al.* 1998) et lors de l'acclimatation au milieu marin chez le manchot Royal (Talbot *et al.* 2004), sous contrôle des acides gras. La concentration de ces derniers est d'ailleurs augmentée dans le sang chez le manchot immergé dans l'eau froide (Talbot *et al.* 2004) et dans le muscle squelettique chez le caneton acclimaté au froid (Dumonteil *et al.* 1994a). Ce découplage pourrait être dû à une augmentation de l'activité de protéines découplantes telles que l'UCP, dont un homologue fonctionnel a été mis en évidence chez l'oiseau, et en particulier chez le manchot (Talbot *et al.* 2003 ; Talbot *et al.* 2004) (**Figure 9-Hypothèse 2**).

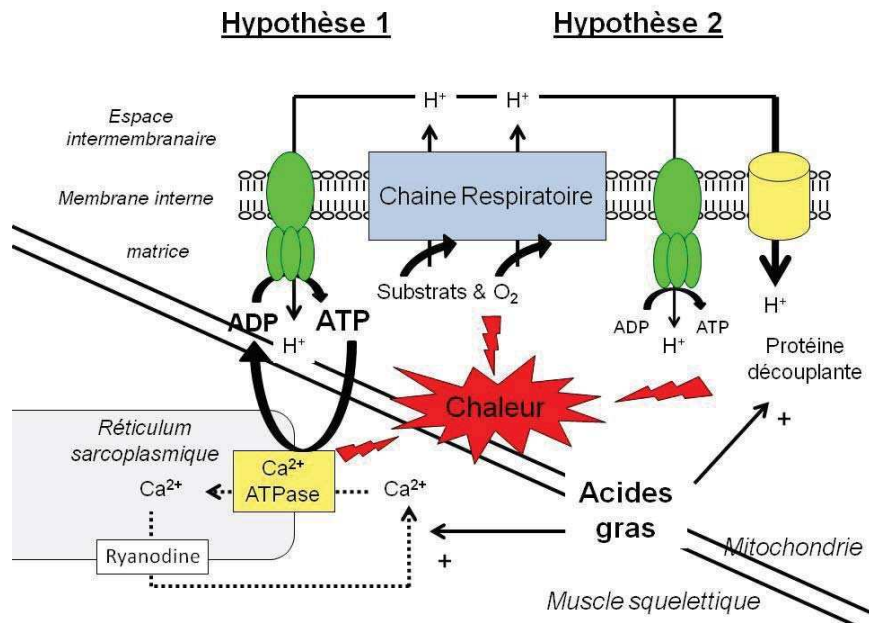


Figure 9 : Schéma simplifié des mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans le développement d'une NST musculaire. *Hypothèse 1 : stimulation des cycles futiles du calcium induisant une consommation de l'ATP ; Hypothèse 2 : découplage des oxydations et des phosphorylations mitochondriales*

L'UCP aviaire (avUCP), découverte en 2001 chez le poulet (Raimbault *et al.* 2001), présente une forte homologie de séquence avec les UCP 1, 2 et 3 de mammifères. Son implication dans la NST *via* un découplage mitochondrial est cependant soumise à controverse. Plusieurs arguments confortent cette hypothèse d'une thermogenèse médiée par un découplage mitochondriale chez l'oiseau en général, et plus particulièrement chez le manchot : 1/ avUCP s'exprime majoritairement dans le muscle squelettique, principal organe de la thermogenèse adaptative chez l'oiseau, 2/ avUCP est sur-exprimée chez le poulet et le canard élevés au froid (Raimbault *et al.* 2001 ; Collin *et al.* 2003a ; Ueda *et al.* 2005) par rapport à ceux élevés à thermoneutralité, et son expression a été corrélée avec l'intensité de NST (Teulier *et al.* 2010 ; Teulier 2010), 3/ l'expression d'avUCP est contrôlée par les hormones thyroïdiennes (T3) (Collin *et al.* 2003b ; Rey *et al.* 2010b), hormone thermogène chez l'oiseau (Duchamp *et al.* 1999) dont la sécrétion est accrue chez les manchots Royaux lors de leur acclimatation au milieu marin (Cherel *et al.* 2004).

L'exposition au froid induit une augmentation du taux circulant de T3, hormone connue pour son rôle dans l'activation de la thermogenèse adaptative chez les oiseaux notamment (Collin *et al.* 2003a). Celle-ci est capable d'induire l'expression de l'avUCP, directement ou par l'intermédiaire de la stimulation d'un facteur de transcription, PGC1 α (Ueda *et al.* 2005), qui est connu pour activer la thermogenèse adaptative chez le rongeur (Puigserver *et al.* 1998) et dont l'augmentation d'expression

précède la sur-expression d'avUCP chez le poulet exposé au froid (Ueda *et al.* 2005). Chez le rongeur, la T3 accroît la dépense énergétique et favorise l'oxydation des lipides (Taleux *et al.* 2009). Comme nous le détaillerons dans un prochain paragraphe, cette augmentation du métabolisme pourrait être médiée par l'activation de l'AMPK, enzyme stimulatrice du métabolisme cellulaire (Hardie *et al.* 2003 ; Walter *et al.* 2010). Cette stimulation du métabolisme en général par la T3, et de l'oxydation des lipides en particulier, peut favoriser la stimulation du découplage mitochondriale via l'activation des protéines découplantes par les acides gras. Chez le manchot, l'augmentation du découplage mitochondrial dans le muscle squelettique observée lors de l'acclimatation au milieu marin (Talbot *et al.* 2004) peut être corrélée à l'accroissement du taux de T3 circulante (Cherel *et al.* 2004).

Ces deux hypothèses mettent en évidence le rôle prépondérant de l'augmentation du métabolisme mitochondrial pour la mise en place de cette thermogénèse sans frisson, dans le muscle squelettique.

c/ Les autres mécanismes impliqués dans la thermogénèse

Chez les manchots, l'**activité contractile** due à la nage contribue aussi fortement au maintien de l'homéothermie (Barré & Roussel 1986 ; Green *et al.* 2005). En effet, l'augmentation de cette activité contractile induit une augmentation de la dépense énergétique, nécessaire au soutien du travail mécanique. Cependant, une grande partie de l'énergie consommée est dissipée sous forme de chaleur, ce déchet métabolique pouvant participer au maintien de la température interne de l'organisme. Des études récentes sur le manchot empereur montrent que sa consommation d'oxygène lors de la plongée est similaire à celle relevée lorsque l'animal flotte en surface (Williams *et al.* 2011) suggérant que le coût énergétique de la thermogénèse seule est équivalent à celui de l'exercice physique associé à la thermogénèse. Nous pouvons penser que la production de chaleur, conséquence de l'activité locomotrice du manchot, recouvre totalement les besoins thermogènes nécessaires au maintien de son endothermie au cours des épisodes de plongée.

Des études montrent que la **thermogénèse alimentaire** participe aussi au maintien de la température interne chez le manchot Adélie (Wilson & Culik 1991) et le manchot Royal (Culik *et al.* 1996). En effet, la stimulation des processus digestifs, permettant *in fine* l'assimilation des nutriments par l'organisme et leur stockage, va produire de la chaleur excédentaire qui pourra aussi être utilisée pour maintenir la température interne du manchot aux alentours de 39°C.

Afin de maintenir son endothermie, le manchot dispose d'un ensemble de mécanismes favorable à une diminution des pertes thermiques et une activation des mécanismes thermogènes. Il est légitime de penser que ces mécanismes vont être particulièrement stimulés lors des périodes d'expositions au froid que représente i/ l'acclimatation au milieu marin du manchot Royal immature, et ii/ la croissance en milieu polaire du manchot Adélie, situations dans lesquelles nous suspectons que les mécanismes thermogènes disponibles ne sont pas suffisant. Cette revue bibliographique montre que la caractérisation de ces mécanismes et leur implication dans le maintien de la température corporelle du manchot sont encore floues et discutées. En effet, les travaux d'analyse sont réalisés sur des animaux sauvages dont il est difficile, voir impossible, de contrôler complètement l'âge, le sexe, le statut nutritionnel, les conditions de vie, paramètres qui peuvent influencer le développement des mécanismes de thermogénèse. De plus, ces animaux sont protégés, et il est difficile de pallier l'hétérogénéité des résultats par l'utilisation d'un plus grand nombre d'individus.

Chapitre 3 : L'acclimatation au milieu marin des manchots immatures

Le passage de la vie terrestre à la vie marine représente, pour les manchots, une étape cruciale dont la réussite repose sur une acclimatation à l'ensemble des contraintes du milieu marin (Barré & Roussel 1986 ; Rey 2008). Particulièrement étudiée chez le manchot Royal, cette phase constitue la véritable émancipation du poussin vis-à-vis de ses parents, il va enfin pouvoir assurer seul ses besoins nutritionnels.

La vie en milieu marin induit 3 contraintes nouvelles pour le manchot immature :

- **la modification des paramètres thermiques de l'environnement** : comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la forte conductivité thermique de l'eau associée aux faibles températures de l'océan des zones antarctiques et sub-antarctiques, induit une augmentation des pertes thermiques. Les mécanismes thermogènes qui permettent au poussin manchot de conserver son homéothermie sont dépassés. Ils le contraignent à accroître sa production de chaleur pour compenser les pertes thermiques, comme ceci a été montré chez le manchot Royal (**Figure 10**) (Barré & Roussel 1986).

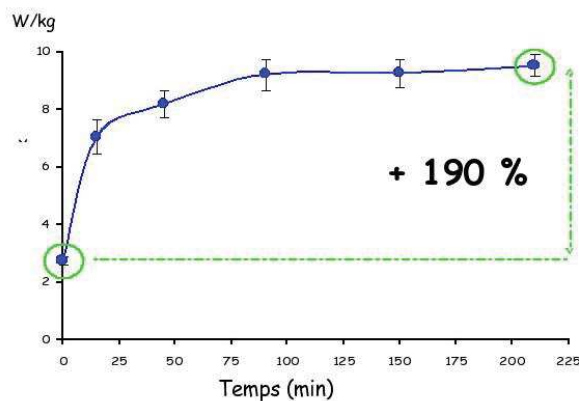


Figure 10 : Variation du métabolisme d'un manchot Royal immature mesuré par calorimétrie indirecte lors d'une immersion en eaux froides (8°C). Le niveau de métabolisme de base d'un manchot immature a été mesuré dans l'air à thermoneutralité (temps = 0 min). Le manchot a ensuite été artificiellement plongé dans une eau à 8°C et le métabolisme a été mesuré à différents temps après l'immersion. Au bout de 3h, une augmentation de +190% du métabolisme est observée, traduisant l'activation de mécanismes thermogènes (Rey 2008)

- **une augmentation importante de son activité locomotrice** : à terre, le poussin utilise la marche pour se déplacer dans une zone relativement limitée autour du nid. En mer, le manchot adulte doit nager sur plusieurs centaines de kilomètres afin d'atteindre les zones de forte productivité primaire (durant la période estivale) et réalise ainsi, lors des voyages alimentaires, une activité physique intense et endurante (**Figure 11**) (Charrassin & Bost 2001).

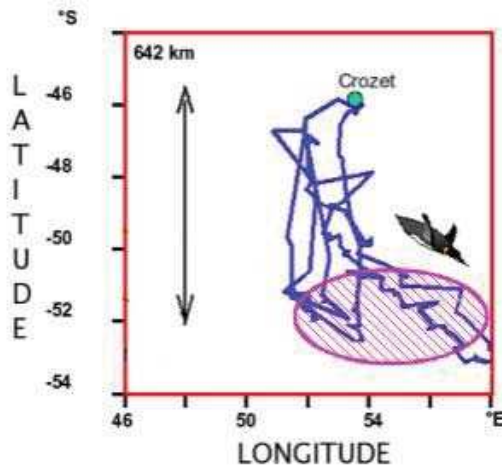


Figure 11 : Suivi GPS de 3 manchots Royaux adultes lors de leur voyage alimentaire au large de l'archipel des îles Crozet. Au départ de Crozet, les manchots Royaux adultes réalisent des voyages alimentaires de plus de 600 km pour atteindre leur zone de pêche (en hachuré sur la figure) situé au niveau du front polaire (Charrassin & Bost 2001).

- **l'acquisition d'un comportement de plongée** : l'accès aux ressources alimentaires (myctophidés, krill) contraint les manchots à réaliser des phases de plongées actives en apnée, de longue durée (7 min pour le manchot Royal et jusqu'à 22 min pour le manchot Empereur), à grande profondeur (250 m pour le manchot Royal et des records de plus de 500 m pour le manchot Empereur), avec une fréquence importante (6 à 8 par heure pour respectivement les manchots Royaux et Empereurs) et ceci plusieurs fois dans la journée (**Figure 12**) (Ponganis & Kooyman 2000 ; Schmidt 2006 ; Meir & Ponganis 2009).

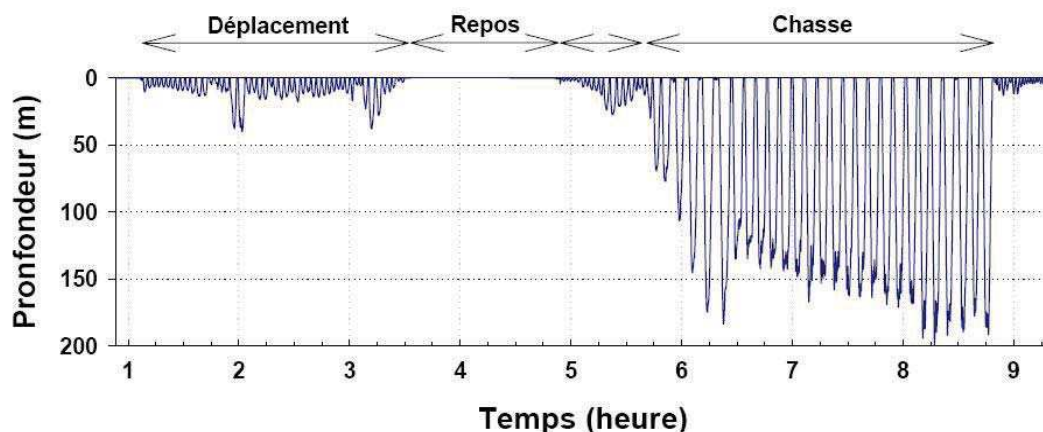


Figure 12 : Profil de plongée d'un manchot Royal au cours d'un voyage alimentaire (Schmidt 2006) Ce comportement induit des contraintes d'approvisionnement en oxygène de l'organisme entre la fin de plongée et la période de récupération de l'animal en surface.

1/ Les ajustements métaboliques

L'augmentation des besoins thermogènes, les voyages alimentaires ainsi que les plongées en apnée vont fortement influencer le métabolisme énergétique de ces oiseaux des régions polaires et sub-polaires. Dans la suite de ce paragraphe, nous décrirons comment le manchot, et plus particulièrement le manchot Royal, ajuste son métabolisme en réponse à ces contraintes.

a/ En réponse aux contraintes physico-chimiques de l'environnement

L'exposition à l'eau froide des manchots Royaux immatures induit une augmentation de leur métabolisme, traduisant une augmentation de leur thermogénèse de régulation (**Figure 9**). De plus, une exposition répétée (10 fois) des juvéniles à l'eau froide induit une augmentation progressive de leur métabolisme de repos, traduisant un phénomène d'acclimatation de ces oiseaux au froid. Le métabolisme de ces oiseaux artificiellement immergés est même plus important que celui des animaux naturellement acclimatés au milieu marin. Cette différence peut s'expliquer par l'augmentation de l'isolation thermique (plumage, tissu adipeux sous-cutané, vasoconstriction périphérique), diminuant les besoins thermogènes chez les animaux naturellement acclimatés (Barré & Roussel 1986). Cette acclimatation au froid du manchot Royal passe par la mise en place de mécanismes de thermogénèse, pouvant impliquer le frisson thermique et/ou la NST, déjà mis en évidence par différentes études lors de différents stades de la croissance du poussin manchot Royal à terre (Duchamp *et al.* 1989 ; Duchamp *et al.* 2002). L'augmentation de l'expression et de l'activité de certaines protéines découplantes mitochondriales (avUCP, avANT) lors de cette phase (Talbot *et al.* 2004), ainsi que l'accroissement des taux circulants de T3 et d'acides gras non estérifiés (Cherel *et al.* 2004 ; Talbot *et al.* 2004), sont en faveur de la mise en place d'un mécanisme thermogène de type NST dans le muscle squelettique. Le frisson thermique peut aussi contribuer à cette augmentation de métabolisme sans représenter une contrainte pour l'activité musculaire de locomotion (Hohtola 2004).

Les données bibliographiques montrent que le manchot doit fortement augmenter sa consommation de substrats énergétiques lors de l'acclimatation au milieu marin, comme le suggère la forte augmentation de la dépense énergétique des manchots Royaux lors de leur immersion dans l'eau (augmentation de leur métabolisme d'un facteur 3,7 à 4,8) (Barré & Roussel 1986). Les seules données qualitatives et quantitatives relatives à la modification de l'utilisation des substrats énergétiques au cours d'une exposition au froid ont été obtenues chez des oiseaux migrants. L'exposition aigüe au froid des oiseaux migrants (*Philomachus pugnax*) provoque une augmentation de l'oxydation des lipides, cette voie représentant alors 82% de la production totale d'ATP durant les épisodes de frisson thermique, ceci quelque soit la température à laquelle l'oiseau est exposé, même

lors d'épisodes de frisson intense quand l'oiseau est exposé à 5°C (Vaillancourt *et al.* 2005). L'utilisation préférentielle des lipides évoquée dans cet article est expliquée par les capacités importantes d'oxydation des lipides développées par le muscle pectoral de ces oiseaux, qui peuvent frissonner continuellement pendant 4,5 jours (Vaillancourt *et al.* 2005). Dans le même sens, l'exposition chronique au froid de canetons et de poussins manchots Royaux, favorise le développement de la NST et se traduit par une augmentation des mécanismes de transport des acides gras vers les muscles oxydatifs, privilégiant ainsi l'activation de leurs capacités thermogènes et le maintien de cette activation (Benistant 1997 ; Bénistant *et al.* 1998). Il est à noter qu'une exposition très courte (30 min) à un froid intense (-25°C) favorise l'utilisation de glycogène pour soutenir les besoins thermogènes chez le pigeon (Parker & George 1975).

Par comparaison, chez les rongeurs, la production de chaleur est soutenue par l'oxydation des lipides à hauteur de plus de 90% (Adán *et al.* 1995 dans Vaillancourt *et al.* 2005). Le TAB, organe thermogène chez les rongeurs utilise la majorité de ces substrats lipidiques. Pourtant, Vaillancourt et collaborateurs (Vaillancourt *et al.* 2009) montrent que le muscle squelettique est aussi le siège d'une thermogenèse pour laquelle l'oxydation des lipides n'intervient qu'à hauteur de 52% (l'oxydation des glucides représente 35% et celle des protéines 13%). Ce pourcentage est retrouvé chez l'homme (ne possédant pas de TAB fonctionnel à l'âge adulte) exposé au froid (Haman *et al.* 2002).

*A l'image des données bibliographiques sur d'autres espèces aviaires comme les oiseaux migrateurs, nous pouvons supposer que l'exposition au froid du manchot Royal immature pourrait s'accompagner d'un ajustement métabolique basé sur l'utilisation préférentielle des lipides. L'augmentation de la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés observée au cours de l'immersion artificielle des manchots Royaux dans l'eau froide (Talbot *et al.* 2004) conforte cette hypothèse.*

b/ En réponse à l'activité physique

Le manchot Royal doit soutenir un exercice intense et endurant au cours de ses longs voyages alimentaires jusqu'au front polaire. Le muscle pectoral, très sollicité pendant la nage, est soumis à une forte dépense énergétique induisant probablement des modifications d'utilisation des substrats énergétiques, à l'image de ce qui a été décrit chez d'autres espèces (Roberts *et al.* 1996 ; Vaillancourt *et al.* 2005).

Chez les mammifères, l'utilisation des acides gras est maximale pour des exercices d'intensité relativement faible, allant jusqu'à 40% de la VO₂ max. A cette intensité, l'énergie produite par

l'oxydation des lipides représente 77% de l'énergie totale utilisée (Roberts *et al.* 1996). L'augmentation de l'intensité de l'exercice induit une baisse importante de l'utilisation des lipides qui ne représentent alors que 20% de l'énergie nécessaire au profit de l'utilisation des substrats glucidiques. Selon les auteurs, cette variation d'utilisation des substrats peut être corrélée au recrutement préférentiel des fibres musculaires lentes, consommatrices de lipides pour des exercices de faible intensité puis des fibres musculaires rapides, plutôt glycolytiques, lorsque l'exercice s'intensifie (Roberts *et al.* 1996). Au niveau moléculaire, les exercices, qu'ils soient intenses ou endurants, augmentent l'expression transitoire des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, la biogenèse mitochondriale, le métabolisme des glucides et l'angiogenèse (Schmutz *et al.* 2006), certainement sous contrôle, plus ou moins partiel, de l'AMPK (Steinberg 2009 ; Weber 2011) (**Figure 13**).

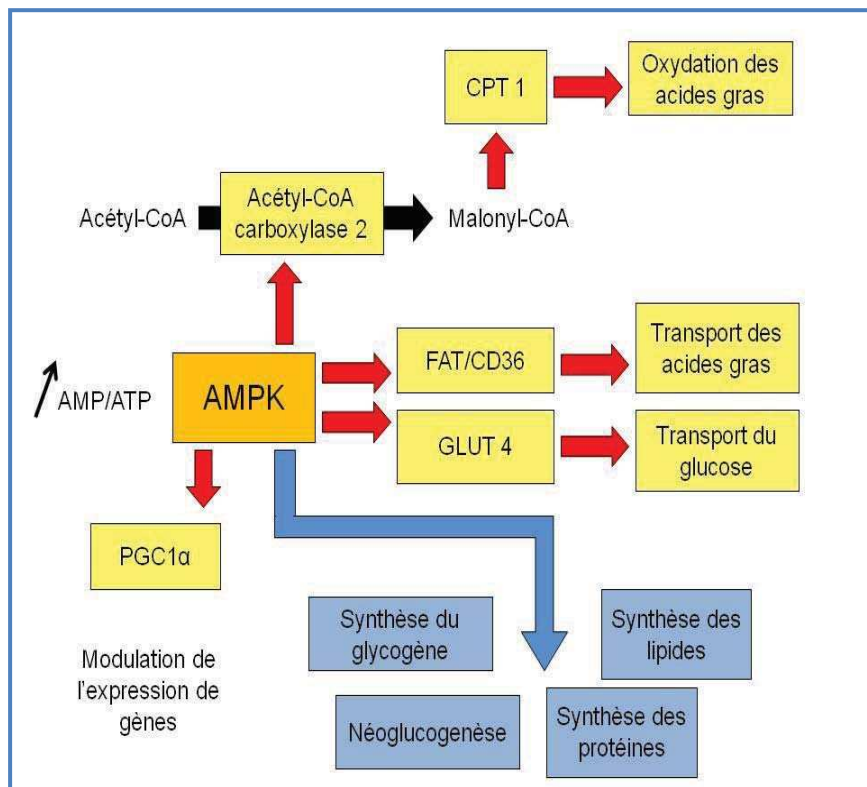


Figure 13 : L'AMP kinase, au centre de la régulation du métabolisme cellulaire. Ce schéma représente les voies stimulées (flèches rouges) et inhibées (flèches bleues) lors de l'activation de l'AMP kinase. Cette enzyme favorise le catabolisme afin de produire de l'énergie (sous forme d'ATP). Son activation est sous le contrôle de l'augmentation du rapport AMP/ATP (traduisant une déplétion des réserves énergétiques cellulaires) (Issue de Weber 2011)

Chez les oiseaux migrateurs (*Philomachus pugnax*), l'intensification de l'exercice physique augmente l'utilisation des lipides alors que la consommation des glucides varie indépendamment de la vitesse à laquelle l'exercice est réalisé. Cependant, aucune modification dans la sélection des substrats énergétiques (lipides, glucides, protéines) en fonction de l'intensité de l'exercice n'est mise en évidence, les lipides produisant toujours la majorité de l'énergie cellulaire (de l'ordre de 58-72% de la consommation d'oxygène) (Vaillancourt *et al.* 2005). L'exercice physique intense et prolongé, comme un vol migratoire, exercice estimé à 60-85% de la VO_2 max de l'oiseau pendant 50 à 100 heures

(Guglielmo *et al.* 2002), nécessite une utilisation majoritaire des substrats lipidiques libérés par le tissu adipeux, représentant plus de 85-95% de l'énergie produite ; les substrats glucidiques étant alors principalement utilisés pour les phases de décollage ou d'atterrissage (Guglielmo *et al.* 2002 ; Jenni-Eiermann *et al.* 2002). Ceci s'accompagne d'une activation simultanée des transporteurs de lipides sur la membrane des cellules (FABP : Fatty Acid Binding Protein) et des mitochondries (CPT : Carnitin Palmitoyl-Transférase), et des enzymes impliquées dans la β -oxydation (HOAD : 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase) et le cycle de Krebs (CS : Citrate Synthase), permettant une stimulation du captage et de l'utilisation des lipides circulants par les muscles pectoraux, très impliqué dans le vol (Guglielmo *et al.* 2002 ; McFarlan *et al.* 2009). Curieusement, il semblerait que l'oiseau anticipe ces épisodes migratoires en ajustant son alimentation afin de consommer des acides gras poly-insaturés n-3 comme l'acide icosapentaénoïque (n-3 20:5) et l'acide docosahexaénoïque (n-3 22:6) (Weber 2009). Ces acides gras sont connus pour modifier la fluidité et la perméabilité membranaire, et sont aussi des ligands naturels pour les PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), facteurs de transcription stimulant les gènes impliqués dans le transport (CPT, FABPs, les transporteurs transmembranaires des acides gras CD36 et FAT) et le métabolisme des lipides (HOAD) (Weber 2009). L'augmentation de la disponibilité de ces acides gras dans l'alimentation (Raclot *et al.* 1998) ainsi que leur incorporation dans les membranes des cellules musculaires ont été montrés chez le poussin de manchot Royal au cours du premier mois de vie (Thil *et al.* 2003).

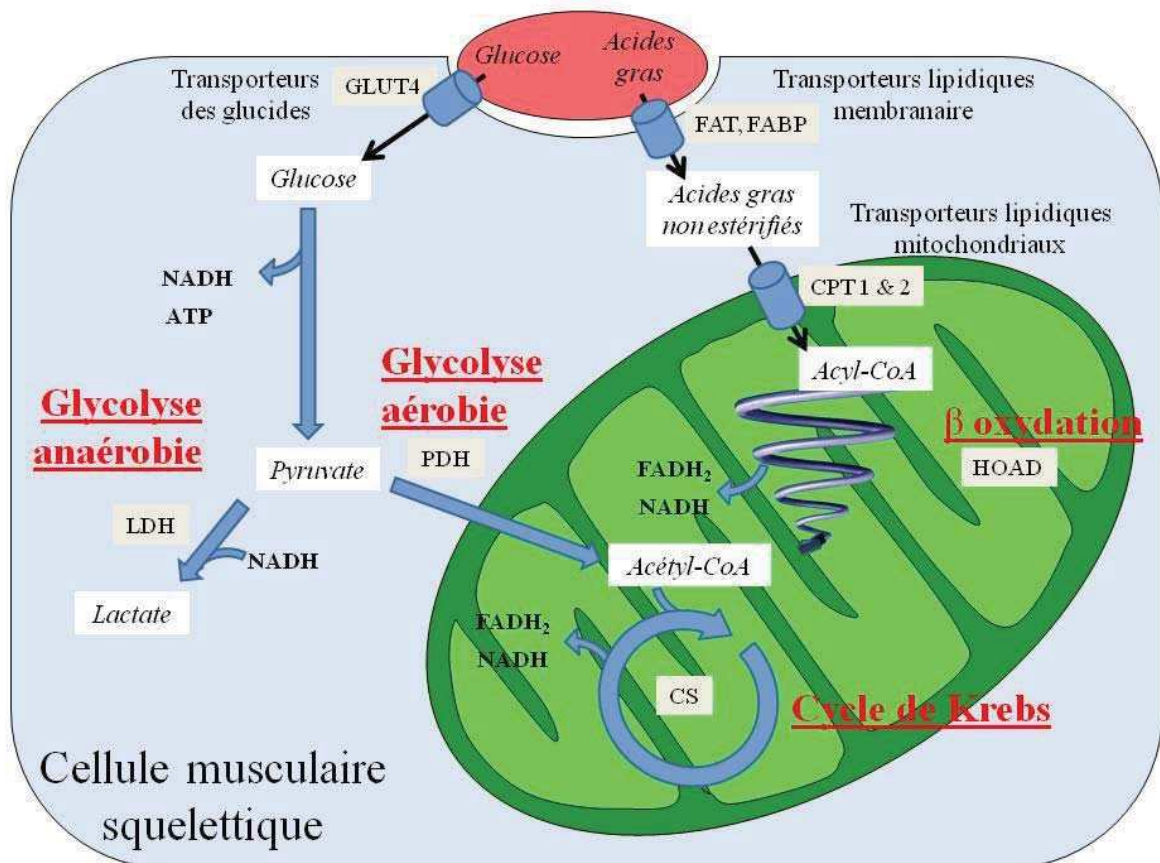


Figure 14 : Représentation schématique des principales voies d'utilisation des substrats énergétiques. Le glucose est dégradé en pyruvate lors de la glycolyse. Ce composé est alors transformé soit en lactate (glycolyse anaérobie) ou en pyruvate (glycolyse aérobie) pour alimenter le cycle de Krebs. Les acides gras sont activés et transportés dans la mitochondrie pour subir la β-oxydation, afin de produire des molécules d'acétyl CoA à destination du cycle de Krebs. Ce dernier produit des équivalents réduits (NADH, FADH₂) qui seront utilisés par la chaîne respiratoire mitochondriale. Sur le schéma sont notées quelques abréviations de transporteurs et d'enzymes impliqués dans ces différentes voies : GLUT4 pour glucose transporter type 4, LDH pour lactate dehydrogenase, PDH pour pyruvate dehydrogenase, FAT pour fatty acid translocase, FABP pour fatty acid binding protein, CPT pour carnitine-palmitoyl-transferase, HOAD pour hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase, CS pour citrate synthase.

A l'image des oiseaux migrateurs qui réalisent des efforts physiques intenses et durables lors des épisodes de migration, il est probable que le manchot Royal réalise le même type d'exercice lors des voyages alimentaires. Nous pouvons alors imaginer qu'il développe des mécanismes favorisant l'utilisation des lipides lors de ces déplacements. De plus, le stockage de ces substrats ne requérant pas d'eau, ils fournissent le meilleur rendement en termes de production d'ATP par gramme de réserves (Weber 2009) permettant aux oiseaux de stocker une quantité importante d'énergie sans surcharge pondérale trop importante.

c/ En réponse aux contraintes de la plongée en apnée

Si la thermogénèse et le maintien d'une activité physique soutenue favorisent l'utilisation des lipides, les épisodes de plongées actives en apnée pour accéder aux ressources alimentaires devraient plutôt favoriser un métabolisme de type anaérobie.

Le comportement de recherche alimentaire du manchot adulte l'oblige à réaliser des plongées en apnée. Au cours de certaines plongées longues et profondes, les manchots dépassent la durée théorique de la plongée en aérobie (cADL : calculated Aerobic Diving Limit) (Ponganis & Kooyman 2000 ; Schmidt 2006 ; Williams *et al.* 2011). Malgré une consommation d'oxygène relativement faible du muscle pectoral au cours de la plongée (Williams *et al.* 2011), la diminution de la disponibilité en oxygène implique la stimulation des mécanismes anaérobies utilisant le glucose afin de produire l'énergie supplémentaire pour augmenter la durée de plongée en maintenant une activité contractile. Ponganis et collaborateurs (Ponganis *et al.* 1997) ont mis en évidence une accumulation de lactate, produit final de la glycolyse anaérobie, après la plongée chez le manchot Empereur, ce lactate est rapidement éliminé lors du retour du manchot à la surface. Les manchots Adélie, Royaux et Empereurs semblent donc répondre aux contraintes énergétiques des plongées de recherche alimentaire par un métabolisme de type glycolytique anaérobie dans leurs muscles locomoteurs (Baldwin *et al.* 1984 dans Ponganis & Kooyman 2000).

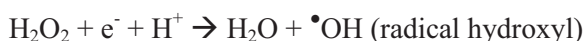
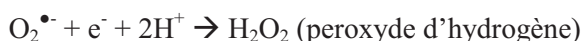
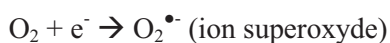
En résumé, l'acclimatation du manchot Royal à la vie marine devrait influencer sur son métabolisme, en modifiant grandement son utilisation des substrats énergétiques. Au cours de sa croissance, le poussin manchot Royal a déjà été soumis à des modifications dans l'utilisation des substrats énergétiques, lors du jeûne alimentaire hivernal (favorisant l'utilisation des lipides) ou au moment de la mue (favorisant l'utilisant des lipides et protéines) par exemple (Cherel et al. 1993). A partir des données de la littérature, nous pouvons supposer que ce manchot va à la fois utiliser 1/ des substrats lipidiques pour soutenir une thermogénèse musculaire et une activité physique intense et endurante, et 2/ des substrats glucidiques, indispensables à son comportement de plongée en apnée. Dans ce travail, nous avons donc cherché à déterminer comment le manchot est capable de soutenir, au niveau du muscle squelettique, des besoins à priori opposées afin de survivre aux contraintes de l'océan austral.

2/ La contrainte pro-oxydative

L'utilisation et la gestion des réserves d'oxygènes sont cruciales pour les animaux plongeurs, comme les manchots. De ces capacités physiologiques dépend la durée de leurs plongées, et par conséquent, l'accès aux ressources alimentaires et leur survie. Chez les différentes espèces de manchots (Ponganis & Kooyman 2000), la durée de plongée excède régulièrement les limites théoriques de plongée en aérobie, induisant une diminution de la quantité d'oxygène disponible dans les tissus, renforcée par des hypoperfusions tissulaires en cours de plongée (Schmidt 2006 ; Williams *et al.* 2011). Le retour en surface des manchots correspond à une phase de réoxygénation (hyperventilation) associée à une redistribution de l'oxygène aux organes (reperfusion tissulaire) (Schmidt 2006). L'alternance des épisodes d'hypoxies/réoxygénation et d'ischémies/reperfusions tissulaires peut favoriser la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) (Hermes-Lima & Zenteno-Savín 2002) et induire une contrainte pro-oxydative, particulièrement lors de la vie marine des manchots. Au regard des théories radicalaires du vieillissement, nous pouvons alors nous demander comment le manchot, oiseau longévif (Lindstedt & Calder 1976 ; Le Bohec *et al.* 2007 ; Lescroël *et al.* 2009), est capable de survivre dans cet environnement particulièrement pro-oxydant.

a/ Le stress oxydant, définition

Conséquence de la vie aérobie, la production de ROS peut être délétère pour l'organisme (Storey 1996). Les ROS sont des espèces chimiques dérivées de l'oxygène qui possèdent un électron célibataire lui conférant une réactivité importante vis-à-vis d'autres molécules (Davies 2000 ; Servais 2004). Ces ROS sont des intermédiaires de la réduction de l'oxygène en eau par la chaîne respiratoire mitochondriale (Storey 1996) :



D'autres composés possèdent des propriétés oxydantes même s'ils ne sont pas considérés comme des ROS *stricto sensu* : l'oxygène singulet, l'ozone, les peroxydes lipidiques, le monoxyde d'azote (NO[•]) et le peroxydinitrite (ONOO⁻), les deux derniers étant classés dans les espèces dérivées de

l'azote (RNS : reactive nitrogen species) (Hermes-Lima & Zenteno-Savín 2002). Toutes ces molécules (ROS et RNS) possèdent une origine commune (**Figure 15**).

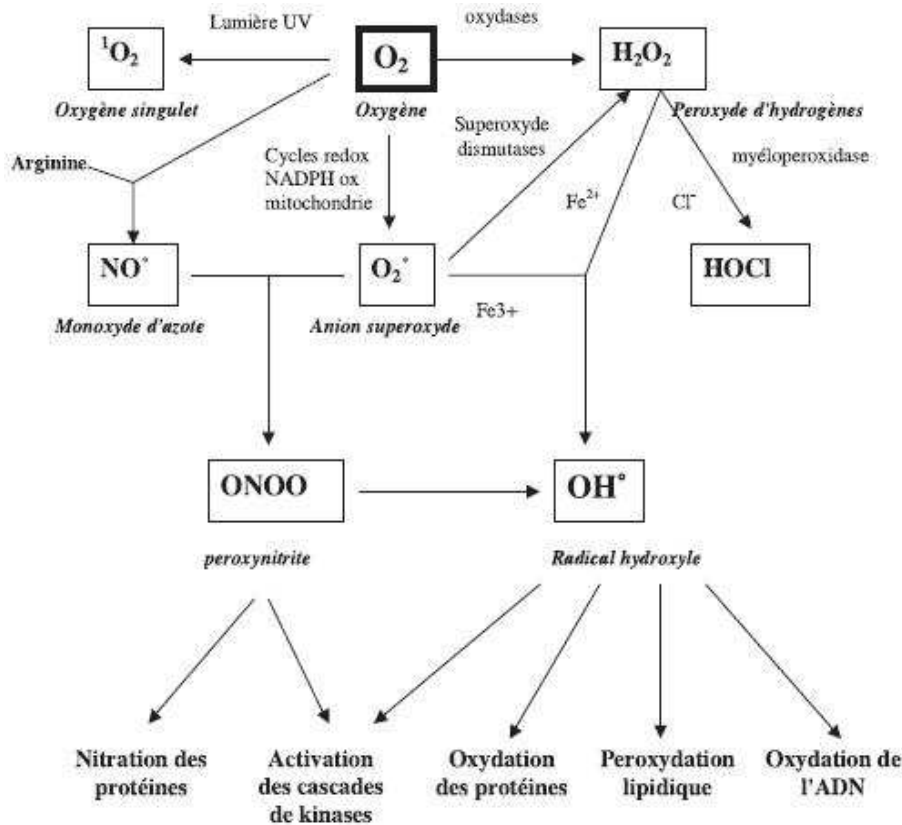


Figure 15 : Origine des différents dérivés réactifs de l'oxygène (D'après Favier 2003)

Ces composés induisent des dommages oxydatifs sur les différentes molécules biologiques (acides nucléiques, lipides insaturés composant les membranes, protéines) (Hermes-Lima & Zenteno-Savín 2002). Nous sommes en présence d'un paradoxe : l'oxygène, essentiel à la vie aérobie produit des ROS, sources de dégâts cellulaires.

Un équilibre subtil entre production et élimination des ROS est donc indispensable. Tout déséquilibre induisant soit une production plus importante de ROS (à défense anti-oxydante égale) soit une moindre efficacité des systèmes anti-oxydants (à production de ROS constante) se traduira par une accumulation de ROS et, par conséquent une augmentation des dégâts cellulaires. Cet état pathologique est nommé **stress oxydant** (Favier 2003).

Dans la suite de mon propos, je décrirai les principaux mécanismes/facteurs producteurs de ROS, puis je m'intéresserai aux dégâts cellulaires engendrés par un excès de radicaux libres, afin de mettre en évidence les différents facteurs anti-oxydants. L'impact de cette contrainte oxydative sur la physiologie du manchot sera alors abordé.

b/ Les facteurs pro-oxydants

- Production de ROS par la mitochondrie

La mitochondrie génère une quantité importante de ROS au niveau des complexes I (NADH déhydrogenase) et III (cytochrome bc1). En effet, l'oxygène peut se combiner avec les électrons transférés le long des complexes et former des ions superoxydes. Environ 1 à 4% de l'oxygène consommé serait transformé en ROS (Storey 1996). Cependant, des études plus récentes estiment que cette mesure est surestimée du fait de la mesure *in vitro* de cette production, en présence d'une pression partielle en oxygène et d'une concentration en substrats supérieure à celle trouvée dans des conditions physiologiques (St-Pierre *et al.* 2002). *In vivo*, la production de ROS est beaucoup plus faible (0,15% des électrons transférés dans la chaîne respiratoire se combinent à l'oxygène pour former des ROS) (St-Pierre *et al.* 2002). Le complexe I est considéré comme le site principal de production de ROS *in vivo* (Miwa & Brand 2003 dans Buttemer *et al.* 2010). Par ailleurs, la moindre production de ROS par mg de mitochondries observée dans le cœur de pigeon par rapport à celui de rat (mammifère de même niveau métabolique que le pigeon) s'explique par une moindre expression du complexe I chez ces oiseaux (St-Pierre *et al.* 2002 ; Buttemer *et al.* 2010) et du maintien de celui-ci dans un état moins réduit (Barja 1998).

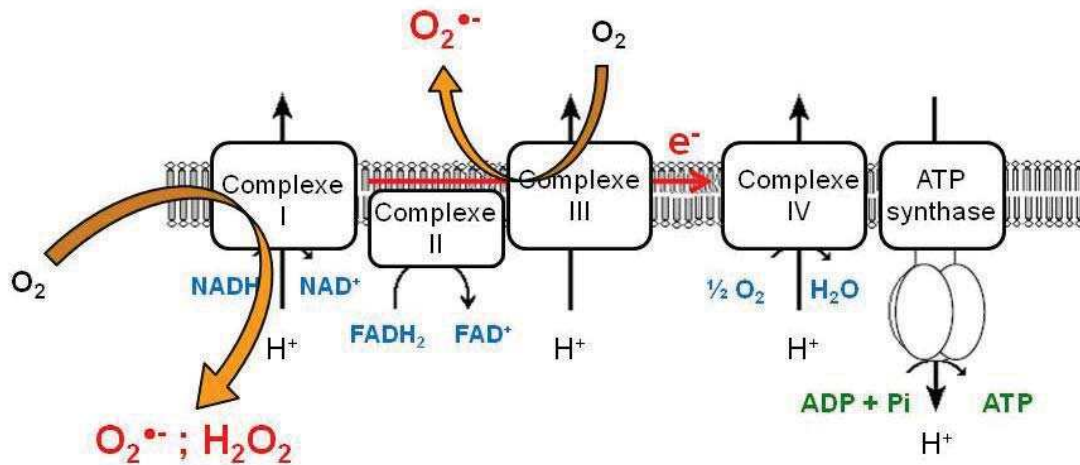


Figure 16 : L'origine de la production des ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les complexes 1 et 3 sont impliqués dans la production de ROS. L'oxygène, présent dans le milieu, peut capter des électrons présents dans la chaîne respiratoire et former des ROS. (D'après Buttemer *et al.* 2010)

Finalement, la production de ROS augmente avec 1/ le **flux d'électrons** le long de la chaîne respiratoire, 2/ le niveau de **réduction des complexes I et III** (Storey 1996), 3/ la **pression partielle en oxygène** mitochondriale ainsi que 4/ l'intensité du **gradient de protons**. Ainsi, la production de

ROS est maximale quand la chaîne respiratoire est totalement réduite, avec un gradient de protons important et un ratio ATP/ADP maximum empêchant le retour des H⁺ vers la matrice par l'ATP synthase et renforçant à la fois ce gradient et la réduction de la chaîne respiratoire du fait d'une accumulation d'électrons (Sachdev & Davies 2008) (**Figure 16**).

Cette production de radicaux libres par la mitochondrie est dépendante de la physiologie de l'organisme et des contraintes environnementales :

➤ **L'activité physique intense** : il a été proposé que l'exercice physique induise une production de ROS musculaire. Cette hypothèse est néanmoins l'objet d'une controverse s'appuyant sur le fait que le besoin important d'ATP induit par l'exercice diminue le gradient de protons, situation plus favorable à une moindre production de ROS. Il semble pourtant que l'augmentation de température provoquée par l'exercice rende l'ubisemiquinone (présent dans le complexe III) instable, favorisant ainsi la production de ROS (Sachdev & Davies 2008). De plus, des études réalisées chez le rat et le pigeon suggèrent que les exercices intenses et durables augmentent la production de radicaux libres (Dröge 2002 ; Costantini *et al.* 2008). La phase de récupération est aussi fortement génératrice de ROS. En effet, la diminution de la consommation d'O₂ en réponse à une diminution de la quantité d'ADP augmente la PO₂ cytosolique et favorise la réduction du Coenzyme Q et du cytochrome b, du fait de l'accumulation des électrons dans la chaîne respiratoire (Rey 2008). Certains auteurs suggèrent que ces ROS puissent aussi agir comme des molécules signal afin d'améliorer les capacités d'endurance musculaire en augmentant la quantité de mitochondrie dans le muscle (Sachdev & Davies 2008).

➤ **Le métabolisme lipidique** : l'oxydation des lipides induit une production de ROS par le complexe I, lesquels seront retrouvés dans le cytosol. A l'inverse, l'utilisation de substrats glucidiques produit des ROS qui seront directement dégradés dans la mitochondrie, limitant ainsi leurs effets indésirables (St-Pierre *et al.* 2002).

➤ **Les variations de pression partielle en oxygène** : la PO₂ cellulaire varie lors des épisodes d'hypoxie/réoxygénation, d'ischémie/reperfusion tissulaires et les passages de l'état d'anaérobiose à aérobie. Ces situations, rencontrées régulièrement par les animaux plongeurs, sont connues pour favoriser la production de ROS dans le cœur des mammifères plongeurs (Vázquez-Medina *et al.* 2006) et du muscle squelettique des manchots empereurs (Zenteno-Savin *et al.* 2010). L'état réduit de la chaîne respiratoire, dû au manque d'O₂, va favoriser la production de ROS lorsque la cellule est brutalement réoxygénée (Storey 1996).

- Autres générateurs de ROS

La mitochondrie ne possède pas l'exclusivité de la production de ROS. D'autres mécanismes cellulaires sont connus pour générer ces dérivés réactifs de l'oxygène. De façon non exhaustive, nous pouvons citer les réactions de Fenton (réaction d'oxydation du fer aboutissant à la production du radical hydroxyle), la NADPH oxydase, la xanthine oxydase (Storey 1996).

La production de radicaux libres de l'oxygène est donc générée par de nombreux mécanismes cellulaires notamment mitochondriaux. Favorisé par différents facteurs environnementaux (hypoxie/réoxygénation par exemple), l'accroissement trop important de cette production risque d'induire des dégâts sur les molécules biologiques et altérer leur fonctionnement.

c/ Altérations des mécanismes cellulaires par les radicaux libres

Si les ROS peuvent jouer un rôle dans la signalisation cellulaire à faible concentration, une quantité excessive peut engendrer des dégâts sur les lipides, les acides nucléiques et les protéines (Dröge 2002).

- La peroxydation des lipides

Directement exposés aux ROS produits par la chaîne respiratoire mitochondriale, les lipides membranaires sont particulièrement sensibles à la peroxydation par les radicaux libres de l'oxygène (Hulbert *et al.* 2007) (**Figure 17**).

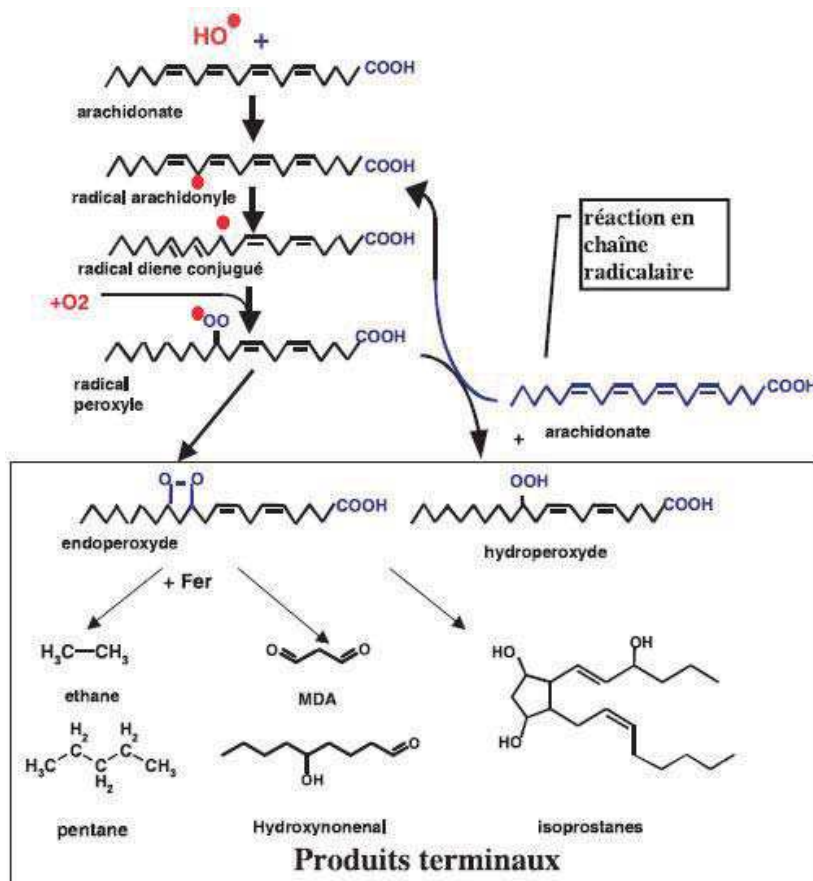


Figure 17 : Réaction en chaîne induisant la peroxydation des acides gras et leur devenir (D'après Favier 2003). Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre 2 doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette peroxydation va ensuite pouvoir se propager entre les différents lipides présents sur les membranes pour se transformer en peroxyde qui peut ensuite se fragmenter et se transformer en alcanes et aldéhydes acides. Le radical peroxyde peut aussi libérer des aldéhydes, tel que malonalaldéhyde (MDA) ou le 4-hydroxy-2-nonénel (4HNE), toxiques pour la cellule du fait de leur forte réactivité avec les autres molécules biologiques.

Les lipides peroxydés peuvent aussi rigidifier la membrane, altérer sa capacité de perméabilité sélective et même induire une perte d'intégrité membranaire (Davies 2000). Tous les lipides ne possèdent pas la même susceptibilité à la peroxydation. En effet, les acides gras poly-insaturés sont plus susceptibles à cette peroxydation que les acides gras saturés ou mono-insaturés (Hulbert *et al.* 2007). Ainsi, la composition membranaire est un élément crucial pouvant limiter, ou au contraire exacerber, les dégâts sur les molécules biologiques. C'est d'ailleurs un élément à l'origine de la « membrane pacemaker theory », théorie selon laquelle les organismes longévifs possèdent des lipides membranaires moins sensibles à la peroxydation (Hulbert *et al.* 2007 ; Buttemer *et al.* 2008 ; Buttemer *et al.* 2010).

- L'oxydation des acides nucléiques

Essentiels pour le maintien d'un fonctionnement cellulaire normal, l'ADN et l'ARN sont pourtant vulnérables face aux ROS. Garant de la mémoire génétique, des ADN modifiés peuvent s'avérer catastrophiques. Dans des conditions physiologiques normales, les dégâts oxydatifs sur l'ADN nucléaire impliquent environ 1 base sur 130000 alors que ceux sur l'ADN mitochondrial sont

estimés à 1 pour 8000 bases (Davies 2000). Plusieurs types d'altérations de l'ADN sont retrouvés: modifications chimiques des bases ou de la partie 2 désoxyribose, des cassures de chaînes, des sites abasiques, des adduits ou des pontages ADN-protéines (Favier 2003 ; Altieri *et al.* 2008) (**Figure 18**).

L'une des lésions les plus communes est l'apparition d'une base 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) remplaçant fréquemment l'adénine (Altieri *et al.* 2008). Celle-ci est d'ailleurs utilisée comme marqueur de l'oxydation de l'ADN. Ces différentes lésions peuvent ainsi induire des mutations sur certains gènes, empêcher la réplication ou la transcription de l'ADN voire même induire l'apoptose (Favier 2003 ; Altieri *et al.* 2008) (**Figure 18**).

L'accumulation de lésions de l'ADN mitochondrial, codant pour les protéines de la chaîne respiratoire, pourrait altérer son fonctionnement (Kowald 2001) et diminuer l'espérance de vie de l'organisme (Barja 1998).

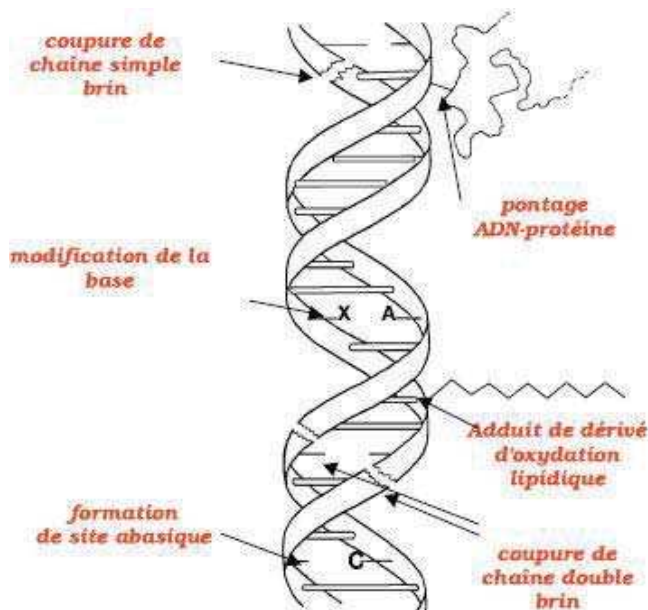


Figure 18 : Les différents dégâts pouvant altérer la molécule d'ADN (D'après Favier 2003).

- La carbonylation des protéines

Les acides aminés sont aussi la cible des attaques radicalaires, et plus spécialement le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, la cystéine et la méthionine (Dröge 2002 ; Hulbert *et al.* 2007), engendrant des dérivés carbonylés. Les protéines ainsi touchées perdent leurs propriétés biologiques et/ou se fragmentent ; ceci facilitant leur dégradation par le protéasome (Davies 2000 ; Dröge 2002 ; Favier 2003). L'attaque radicalaire des protéines interagissant avec l'ADN est problématique (histone,

enzymes de la réplication ou de la transcription) car elles forment des adduits et induisent des dégâts sur les acides nucléiques. De même, l'altération des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale risque de modifier son fonctionnement et de favoriser la formation des ROS (Dröge 2002).

***Pour résumer**, la production de ROS est indissociable du métabolisme aérobie. De nombreux mécanismes cellulaires, surtout mitochondriaux, produisent ces molécules réactives et certaines situations physiologiques (métabolisme lipidique) et contraintes environnementales (alternance hypoxie réoxygénation) peuvent exacerber cette production. Si aucun mécanisme de défense n'est mis en place, cette surproduction de ROS risque de générer l'apparition de dégâts sur les molécules biologiques (acides nucléiques, lipides, protéines) dont l'accumulation altère le fonctionnement cellulaire et diminue la longévité. En effet, selon **la théorie radicalaire du vieillissement**, il existe une **relation linéaire négative entre longévité et l'accumulation de dégâts oxydatifs** (Harman 1956 dans Vina et al. 2007). Afin de limiter l'impact des ROS sur les structures cellulaires, la cellule développe de nombreux mécanismes anti-oxydants.*

d/ Les mécanismes anti-oxydants

Selon Storey (Storey 1996), 3 niveaux de protection contre les ROS, non mutuellement exclusifs, peuvent être envisagés 1/ prévenir leur formation, 2/ les dégrader, et 3/ réparer les dégâts cellulaires occasionnés.

- Prévenir la formation des ROS

La production de ROS par la mitochondrie est positivement influencée, entre autre, par l'intensité du gradient de protons transmembranaire (Korshunov *et al.* 1997). Celle-ci est limitée par la conductance de la membrane aux protons, et donc par la perméabilité membranaire (Brand 2000 ; Brand *et al.* 2004), elle-même caractérisée par :

i/ Sa composition en phospholipides (Figure 19)

La quantité relative d'acides gras insaturés dans les membranes est responsable de la nature perméable de la bicouche lipidique. Or plus les lipides sont insaturés, plus ils sont sensibles aux attaques radicalaires (Hulbert *et al.* 2007). Cependant, la présence d'acides gras mono-insaturés suffit

pour accroître la perméabilité de la membrane. L'addition d'insaturations supplémentaires n'augmente pas proportionnellement la perméabilité membranaire. De plus, parmi les acides gras poly-insaturés, les acides gras oméga 3 sont plus sensibles à la peroxydation que les oméga 6. Selon la « **membrane pacemaker theory** », ce compromis entre fluidité membranaire (diminution de la production de ROS) et susceptibilité des lipides face à la peroxydation (augmentation des dégâts cellulaires due aux ROS) expliquerait la longévité plus importante observée chez les oiseaux par rapport aux mammifères de même masse (Hulbert *et al.* 2007 ; Hulbert 2008 ; Buttemer *et al.* 2010).

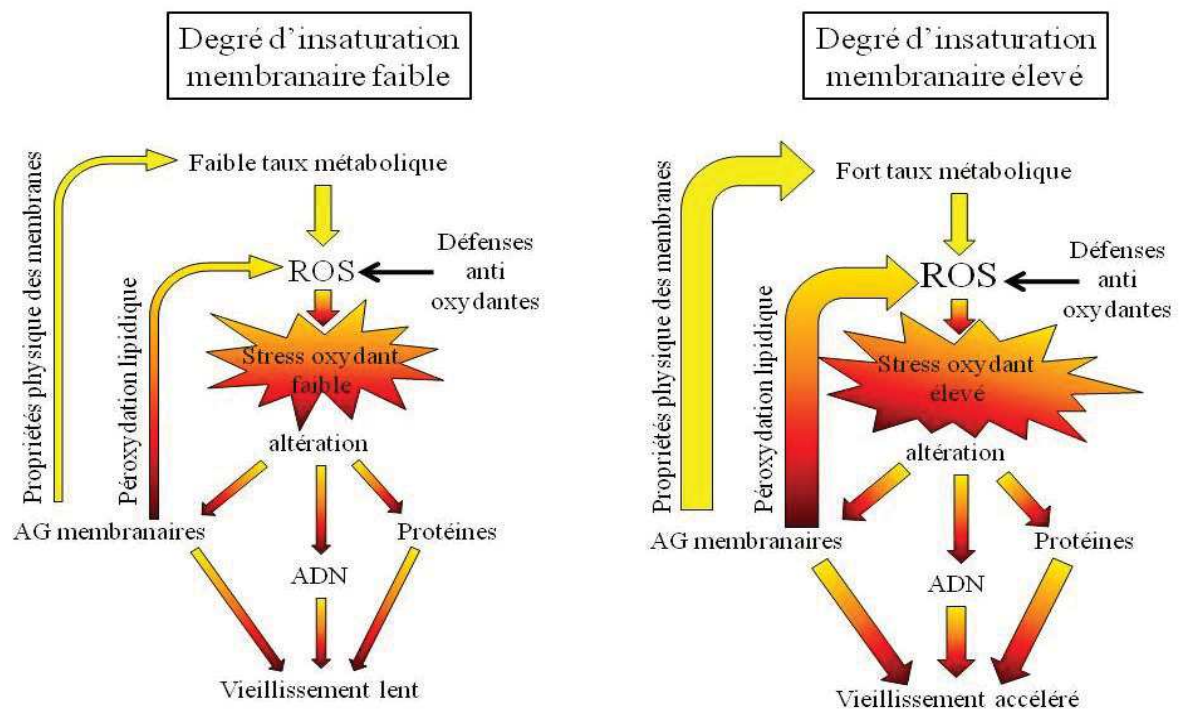


Figure 19 : Illustration de la « membrane pacemaker theory » (D'après Hulbert *et al.* 2007). Selon cette théorie, un faible degré d'insaturation membranaire va être retrouvé chez les organismes à faible niveau métabolique. Ceci va diminuer la production de ROS, et donc générer un faible stress oxydant. Or le faible niveau d'insaturation diminue aussi la susceptibilité des lipides face à la peroxydation, diminuant le stress oxydant. A l'inverse, un fort degré d'insaturation des lipides membranaires est associé à un fort niveau métabolique, dû aux propriétés physiques des membranes qui va stimuler l'activité des protéines liées à celle-ci, et ainsi élever le taux métabolique des cellules, des tissus et de l'organisme entier. Cette augmentation du métabolisme va favoriser la production de ROS, favorisant l'apparition d'un stress oxydant. Or la présence de nombreuses insaturations dans les lipides membranaires va favoriser leur peroxydation, renforçant la concentration de ROS et la survenue d'un stress oxydant.

ii/ La présence de protéines découplantes mitochondriales (**Figure 20**)

Le gradient membranaire de protons peut aussi être réduit *via* l'activation de protéines découplantes comme l'ANT ou l'UCP. Ainsi, une corrélation a été mise en évidence entre l'activation de l'UCP et la diminution de la production de ROS, suggérant un rôle anti-radicalaire de cette protéine (Echtay *et al.* 2002). De plus, en présence d'acides gras, les ions superoxyde induisent l'activation de la protéine et l'augmentation de la conductance membranaire des mitochondries isolées de rats (Echtay *et al.* 2002), et de manchots (Talbot *et al.* 2003). La production de ROS est capable de stimuler l'activité de l'UCP engendrant une légère diminution du gradient de protons mais suffisante pour réduire de façon conséquente la production de ROS au niveau du complexe I (Miwa & Brand 2003 dans Rey 2008). Cette protéine pourrait agir soit comme un canal à protons, soit comme un transporteur des acides gras peroxydés de la matrice vers l'espace intermembranaire. Ce transport consomme des protons lors de la dismutation des acides gras peroxydés dans l'espace intermembranaire, diminuant le gradient de protons et contribuant à la protection de l'ADN mitochondrial, présent dans la matrice (Goglia & Skulachev 2003).

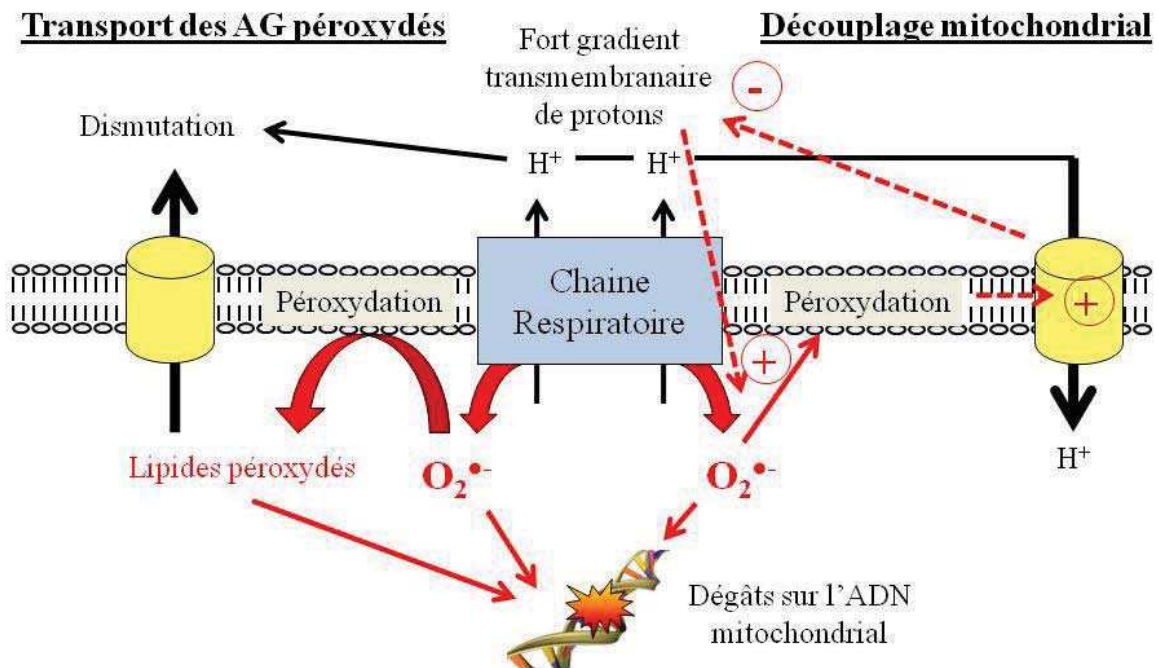


Figure 20 : Illustration du rôle anti-radicalaire de la protéine découplante aviaire
(D'après Echtay *et al.* 2002; Goglia & Skulachev 2003)

- Dégrader les espèces réactives de l'oxygène

Afin de limiter l'impact des ROS produits, la cellule synthétise de nombreuses molécules anti-oxydantes. Celles-ci sont définies comme des substances capables, à faible concentration, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables afin d'en inhiber/retarder l'oxydation. Cette définition regroupe les enzymes et les composés non-enzymatiques (Dröge 2002).

Les enzymes anti-oxydantes :

- La **superoxyde dismutase** (SOD) qui catalyse la dismutation de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, composé moins réactif. Trois isoformes sont retrouvées chez les mammifères (Cu-Zn SOD, Mn SOD, EC SOD) possédant des répartitions cellulaires différentes (cytosolique, mitochondriale et extracellulaire) (Favier 2003).
- La **catalase** (CAT) dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau. Cette enzyme, possédant une faible affinité pour son substrat, est efficace pour de fortes concentrations d'H₂O₂ (Favier 2003).
- La **glutathion peroxidase** (GPX) transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et prend en charge les lipides peroxydés. La GPX utilise le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons. Cette enzyme est plus efficace face aux faibles concentrations d'H₂O₂ (Favier 2003).
- La **glutathion-S-transférase** (GST), comme la GPX, utilise le GSH pour éliminer les dégâts générés par les ROS (Favier 2003).
- Les **peroxyredoxines** ou **thioredoxines** dégradent l'H₂O₂, le peroxyde d'azote et de nombreux hydroperoxydes (Favier 2003).

Ces enzymes présentent une forte activité dans le tissu cardiaque des phoques (Vázquez-Medina *et al.* 2006) ou le muscle pectoral de manchots Empereurs (Zenteno-Savin *et al.* 2010) afin de leur permettre de lutter efficacement contre les ROS produits lors de la réoxygénation chez ces organismes connus pour réaliser de longues plongées en apnée.

Les composés non-enzymatiques : Ces molécules anti-oxydantes sont essentiellement issues de l'alimentation. Elles comprennent la vitamine E (α tocopherol), la vitamine C (acide ascorbique), le glutathion, les β -carotènes, l'ubiquinone (Favier 2003). Une quantité importante de ces molécules est d'ailleurs retrouvée dans le krill, nourriture essentielle des manchots (Beaulieu *et al.* 2010).

- Réparer les dégâts cellulaires occasionnés

L'élimination des dégâts induits par les ROS est vitale pour le maintien d'une activité cellulaire normale. Pour cela, la cellule développe différents mécanismes de réparation/dégradation des molécules oxydées.

➤ Les **lipides peroxydés** sont pris en charge par les différentes enzymes anti-oxydantes (GPX, GST, thioredoxine) pour être réparés ou éliminés (Hulbert *et al.* 2007).

➤ La réparation des **altérations de l'ADN** est cruciale afin de conserver le patrimoine génétique de la cellule. Selon les dégâts, différents mécanismes sont mis en oeuvre : la réparation par excision de base (BER : base excision repair), la réparation par excision de nucléotides (NER : nucleotide excision repair), la réparation des mismatch et la réparation des cassures de brins. La BER utilise l'action des DNA glycosylases, comme l'OGG1 (Oxo Guanine Glycosylase 1) qui va détecter et réparer le 8-oxoG. Les autres mécanismes de réparations vont impliquer des systèmes plus complexes de détection des dégâts (par l'action de DDB1, XPE, XPC,...), d'excision des brins (Exo1, RPA, PCNA,...) puis de reformation du brin (polymérase, ligase, ...). Ces mécanismes, principalement décrits dans le noyau des cellules, sembleraient moins efficaces dans la mitochondrie (synthèse dans Altieri *et al.* 2008).

➤ Les **protéines endommagées** peuvent aussi être réparées ou dégradées. La méthionine, sensible aux oxydations des ROS, peut être réparée par la méthionine sulfoxide réductase (Kültz 2005 ; Hulbert *et al.* 2007). D'autre part, la perte d'activité des protéines induit leur orientation vers le protéasome pour être dégradées (Dröge 2002) ; elles peuvent aussi être prises en charge par les protéines de choc thermique (HSP : Heat Shock Protein) qui sont capables de se lier aux protéines de la cellule pour les protéger en maintenant leur intégrité ou, si elles sont trop endommagées, les orienter vers le protéasome pour les dégrader.

*Le développement de mécanismes anti-oxydants est donc essentiel pour la cellule afin de contre-balancer la production de ROS et conserver une activité cellulaire normale, tout particulièrement chez des espèces constamment exposées à un environnement pro-oxydant comme les manchots (Zenteno-Savin *et al.* 2010).*

e/ Le manchot : comment vivre longtemps dans un environnement pro-oxydant ?

Dans le contexte du vieillissement, le cas des oiseaux est particulièrement intéressant. En effet, ceux-ci présentent une longévité supérieure à celle des mammifères de même masse, malgré un niveau de métabolisme souvent élevé, une température interne et un taux de glucose sanguin supérieur. Or, d'après la théorie radicalaire du vieillissement, ces paramètres devraient induire une augmentation de la production de ROS par la mitochondrie favorisant la sénescence (Costantini 2008). Une augmentation des défenses anti-oxydantes chez l'oiseau a été évoquée pour expliquer ces différences (Barja 1998). Mais cette hypothèse a été mise en défaut par l'établissement d'une corrélation négative entre la quantité d'anti-oxydants et la longévité ainsi que par la mise en évidence d'un taux d'anti-oxydants plus faible chez les oiseaux que chez les mammifères (Barja 1998 ; Pamplona & Costantini 2011). Des études comparatives entre mammifères et oiseaux ont montré que ces derniers produisent moins de ROS dans la mitochondrie, ceci est probablement lié à une plus grande perméabilité des membranes et leur moindre susceptibilité aux phénomènes de peroxydation (Barja 1998 ; Hulbert *et al.* 2007).

Le manchot, oiseau longévif (Le Bohec *et al.* 2007 ; Lescroël *et al.* 2009), est constamment soumis à de nombreuses contraintes pro-oxydantes, essentiellement induites par les caractéristiques physico-chimiques de son environnement et son comportement de recherche alimentaire. Seules quelques études de biologie comparative se sont intéressées à ce modèle et par la mesure d'un seul paramètre, souvent relatif à la capacité anti-oxydante du sang (Corsolini *et al.* 2001 ; Beaulieu *et al.* 2010) ou de certains tissus (muscle squelettique, cœur, foie) (Gavazza *et al.* 2008 ; Zenteno-Savin *et al.* 2010). Les auteurs ont pu déterminer que les capacités de résistance au stress oxydant des manchots sont supérieures à celles d'autres oiseaux mais ces mesures ne nous renseignent en rien sur la survenue d'un possible stress oxydant (Costantini & Verhulst 2009 ; Hōrak & Cohen 2010) ou des mécanismes mis en place par l'animal pour faire face à une possible surproduction de ROS.

Si l'étude des radicaux libres de l'oxygène en relation avec le vieillissement fait encore couler beaucoup d'encre, la capacité des manchots à vivre vieux dans un environnement particulièrement pro-oxydant reste énigmatique. Au cours de son acclimatation au milieu marin, le développement rapide et efficace d'un ensemble de mécanismes complexes pourrait être crucial pour limiter au maximum l'impact des ROS sur ses structures biologiques. Nous nous sommes donc intéressés aux capacités d'acclimatation du manchot aux contraintes pro-oxydatives des océans Antarctique et sub-antarctique en essayant de décrypter au plan moléculaire, les mécanismes anti-oxydants développés au cours de cette étape.

3/ Le muscle pectoral, au cœur de l'acclimatation du manchot au milieu marin ?

La transition entre la vie terrestre et la vie marine des manchots des régions antarctiques et sub-antarctiques pourrait induire un ensemble de modifications afin de permettre à ces oiseaux de surmonter les contraintes de sa vie dans l'océan. Comme nous l'avons vu précédemment, le muscle squelettique, tissu possédant un métabolisme élevé impliqué dans la thermogénèse et la locomotion, peut être un excellent candidat pour appréhender les mécanismes d'acclimatation développés par cet oiseau au cours de cette phase.

Parmi les différents muscles squelettiques, le muscle pectoral, dont la masse cumulée des muscles droit et gauche peut représenter jusqu'à 25% de la masse totale du manchot en cours de reproduction (Cherel *et al.* 1993), possède un rôle important dans la thermogénèse adaptative et la locomotion. Lors de la vie terrestre du poussin, ce muscle joue un rôle important dans la thermogénèse de régulation (Duchamp *et al.* 1989 ; Duchamp *et al.* 2002) mais n'a pas encore acquis toutes les caractéristiques morpho-fonctionnelles nécessaires au développement d'une activité locomotrice efficace (Erbrech *et al.* 2011). Pourtant, lors de sa vie marine, le manchot doit pouvoir soutenir des exercices physiques intenses et endurants au cours des voyages alimentaires, et surmonter l'accroissement des pertes thermiques dues à la forte conductivité de l'eau et sa faible température, que les mécanismes de régulation de sa température interne développés durant les premiers stades ne peuvent pas compenser. Le muscle pectoral subit, au cours de certaines plongées prolongées en apnée, des variations dans son approvisionnement en oxygène (Williams *et al.* 2011) et est donc directement soumis à des épisodes d'hypoxie/réoxygénation et d'ischémie/reperfusion. Ceci suppose que l'acclimatation au milieu marin devrait induire une profonde maturation de ce muscle. Son rôle d'effecteur essentiel nous a fait considérer le muscle pectoral comme le dénominateur commun de nos travaux.

Le muscle pectoral doit alors :

- développer des mécanismes de thermorégulation pour compenser les pertes thermiques dues à l'exposition aux eaux froides de l'océan,***
- pouvoir ajuster rapidement l'utilisation des substrats énergétiques en adéquation avec les contraintes liées à l'environnement et à son comportement,***
- limiter l'impact délétère des radicaux libres de l'oxygène potentiellement produit suite aux plongées en apnée de longue durée.***

De l'efficacité de ces mécanismes dépend la survie du manchot.

Chapitre 4 : La croissance en milieu polaire

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la croissance du manchot Adélie, nous avons donc ciblé notre étude bibliographique sur cette espèce. Malgré les contraintes climatiques extrêmes, les manchots Adélie se reproduisent sur les rochers libres de glace du pourtour du continent Antarctique. Ne pesant que quelques grammes à l'éclosion, les poussins vont devoir atteindre leur taille adulte (augmentation de la masse d'un facteur 40) en moins de 2 mois (Culik 1994 ; Raccurt *et al.* 2008). Définie entre l'éclosion et l'émancipation parentale, cette période de croissance est absolument critique car elle conditionne le développement anatomique et physiologique de ces oiseaux, les préparant pour leur vie future dans l'environnement marin.

1/ Quelques généralités

Au cours de cette période de croissance, les oiseaux, comme tous les organismes, voient leur morphologie évoluer. Cette croissance diffère cependant selon les espèces en termes d'intensité et de durée. Pour expliquer cette diversité, David Lack (Lack 1968) suggère que la vitesse de croissance dépend de la mortalité des juvéniles et des ressources alimentaires. Une croissance rapide permet d'échapper aux prédateurs alors qu'une croissance lente diminue l'effort parental en terme de nourrissage, favorisant l'élevage d'un nombre plus important de descendants (Lack 1968 dans Ricklefs 1979). De nombreux exemples mettent néanmoins cette hypothèse en défaut.

La croissance n'est pas linéaire au cours du temps car la courbe de croissance forme une sigmoïde : $W(t) = A/(1+\exp(-K(t-t_i)))$ avec $W(t)$ la masse à l'instant t , A l'asymptote de la courbe de croissance à la valeur maximale, K la constante du taux de croissance et t_i le point d'inflexion (Ricklefs 1979). Des études sur différents oiseaux atteignant la même taille à l'âge adulte montrent que le taux croissance (K) est inversement proportionnel à la précocité des poussins. Ceci révèle 2 catégories d'oiseaux :

- les oiseaux nidifuges (ou précoces) : ils naissent recouverts d'un duvet, les yeux ouverts et sont capables de réguler leur température interne et de s'alimenter eux-mêmes.
- les oiseaux nidicoles (ou altriciaux) : nus et aveugles à l'éclosion, ils sont complètement dépendants de leurs parents pour réguler leur température interne et se nourrir.

Chez les manchots, oiseaux semi-altriciaux, les poussins sont incapables de maintenir leur endothermie à la naissance et se réfugient sous la poche incubatrice parentale. L'acquisition de l'autonomie thermique est estimée à différents âges selon les espèces : 9 jours pour le manchot Adélie

(Sapin-Jaloustre 1960), 15 jours pour les manchots Jugulaire et Papou (Taylor 1985), 15 - 20 jours pour le manchot Empereur (Prévost 1961) et 20 jours pour le manchot Royal (Duchamp *et al.* 2002).

Ils sont également complètement dépendants du nourrissage parental. Leur croissance rapide (Bucher *et al.* 1990), diminue efficacement leur ratio surface / volume pour minimiser les pertes de chaleur. Parallèlement, ils développent leurs capacités de thermogenèse basées essentiellement sur le frisson thermique dans les premiers jours [pour exemple chez le manchot Royal (Duchamp *et al.* 2002)]. L'acquisition de l'autonomie thermique du poussin lui permet de rester seul sur le nid et autorise la multiplication des voyages alimentaires parentaux nécessaires à son nourrissage intensif.

2/ Les paramètres agissant sur le taux de croissance de l'organisme

Ricklefs (1979) définit la constante du taux de croissance (K), exprimé en jour⁻¹, comme la mesure globale du taux d'accroissement de masse d'un organisme. Cette mesure présente l'avantage d'être directement comparable entre les espèces. Il émet alors l'hypothèse que celui-ci est influencé par de nombreux paramètres, comme la **disponibilité en ressources** alimentaires et **l'allocation d'énergie** à l'échelle de l'organisme, **ou le taux de prolifération et de croissance cellulaire** dans certains tissus.

a/ Données quantitatives de croissance

La croissance du poussin Adélie est exponentielle durant les premiers jours de vie : pendant la phase d'élevage individuel, la masse du poussin est multipliée par 10, passant de 80 g en moyenne à l'éclosion à 800 g vers l'âge de 21 jours. Sa masse atteint une moyenne de 3 kgs vers l'âge de 50-55 jours (Salihoglu *et al.* 2001 ; Raccurt *et al.* 2008). Ainsi, la constante du taux de croissance (K) du poussin manchot Adélie, calculée à partir de l'équation de Ricklefs (1979), atteint une valeur de 0,148 jour⁻¹ (Bucher *et al.* 1990). Cette valeur relativement importante est typique des oiseaux altriciaux ou semi-altriciaux (Bucher *et al.* 1990).

b/ Apports alimentaires

Les besoins de nourriture du poussin Adélie pendant sa croissance sont évalués à environ 25 - 30 kg de krill et de *Pleuragramma antarcticum* (Beaulieu *et al.* 2010), pour une période de 50 jours

(Culik 1994). La quantité et la qualité du krill ainsi que la fréquence du nourrissage ont une forte influence sur la croissance du poussin (Salihoglu *et al.* 2001). A partir du 21^{ème} jour de la vie du poussin, les voyages alimentaires des 2 parents permettent d'augmenter considérablement la quantité de nourriture rapportée aux poussins, par rapport à la phase d'élevage au nid. Dans ces conditions, l'éloignement de la ressource alimentaire diminuant le nombre de voyages alimentaires possibles représente un gros handicap pour la croissance programmée du manchot Adélie. Quoi qu'il arrive, il devra partir en mer vers l'âge de 7 à 8 semaines, avant l'embâcle antarctique. Le comportement est tout autre chez d'autres espèces dont la quantité de nourriture disponible se raréfie au cours de leur cycle de reproduction (exemple du jeûne hivernal du poussin manchot Royal). C'est alors un facteur limitant leur croissance (Heath & Randall 1985 dans Erbrech *et al.* 2011), obligeant le poussin à décaler son développement à une période ultérieure, lorsque la nourriture redeviendra abondante (Schew & Ricklefs 1998 dans Erbrech *et al.* 2011).

c/ Allocation d'énergie, gestion du budget énergétique.

La température ambiante ne semble pas influencer la croissance si nous comparons les résultats disponibles dans la littérature entre les espèces d'oiseaux polaires et tropicaux. En effet, le taux de croissance (K) des espèces des hautes latitudes n'est pas différent par comparaison à celui des espèces d'oiseaux tropicaux (Kleiber & Dougherty 1934 dans Ricklefs 1979). Cependant, des études à l'échelle intraspécifiques sur des canetons élevés au froid montrent un retard de croissance par comparaison à ceux élevés à thermoneutralité (Bénistant *et al.* 1998 ; Chaïnier *et al.* 2000 ; Teulier *et al.* 2010). D'autre part, le manchot Adélie, comme le manchot Empereur, possède la répartition géographique la plus basse en latitude parmi toutes les espèces de manchots. Une croissance extrêmement rapide dans un environnement aussi froid représente en conséquence un coût énergétique d'importance pour un endotherme. Ceci implique une gestion fine des substrats énergétiques disponibles pour assurer la mise en place d'une thermorégulation efficace en même temps que la croissance. Cette allocation d'énergie, probablement finement régulée, n'est que très peu documentée dans la littérature. Un premier travail du laboratoire a démontré néanmoins l'importance de la constitution précoce du tissu adipeux pendant les premières semaines de vie du poussin Adélie alors qu'il profite de la protection thermique parentale et d'un bon apport énergétique (Raccurt *et al.* 2008). Cette réserve énergétique joue probablement un rôle fondamental pour permettre au poussin manchot Adélie de surmonter avec succès l'ensemble des contraintes liées à sa croissance.

d/ Prolifération cellulaire, croissance tissulaire

Si nous considérons maintenant non plus la croissance globale mais la croissance sélective des organes ou des tissus dont la fonction est essentielle à la survie du poussin, nous constatons, du moins chez le manchot Adélie, une croissance accrue du tissu adipeux et du muscle pectoral (Raccurt *et al.* 2008). Parmi les organes et tissus considérés, ces deux tissus voient leur masse augmenter d'un facteur 80 alors que d'autres comme le muscle gastrocnémien ou le quadriceps ne multiplient leur masse que d'un facteur 30, ceci entre l'éclosion et le stade 30 jours de la vie du poussin (Raccurt *et al.* 2008).

Le tissu adipeux possède un rôle essentiel dans le stockage de l'énergie de l'organisme, en particulier au cours de la croissance (Raccurt *et al.* 2008). Lors de cette période, ce tissu présente 2 phases distinctes et séquentielles de développement chez l'oiseau. Une première phase de prolifération cellulaire des préadipocytes, qui permet une augmentation exponentielle de la masse tissulaire sous le contrôle de différents facteurs endocriniens tels que l'hormone thyroïdienne (T3) ou de l'hormone de croissance (Growth Hormone: GH). Cette dernière est connue pour favoriser la prolifération cellulaire des préadipocytes chez l'oiseau (Raccurt *et al.* 2008), *via* son récepteur GHR (Growth Hormone Receptor). Elle est aussi impliquée dans le contrôle de la différenciation des préadipocytes, en synergie avec IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1), facteur insulino mimétique produit par le foie (Raccurt *et al.* 2008), capable d'accroître la sécrétion de T3 (Kühn *et al.* 2002). L'action de ces différents facteurs va permettre la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures, incapables de se diviser, limitant ainsi l'augmentation de taille de l'organe au seul accroissement du volume cellulaire dû au stockage des acides gras. Cette phase s'accompagne d'un profond remaniement cellulaire pour permettre aux cellules d'acquérir l'ensemble de la machinerie enzymatique nécessaire à leur fonctionnement.

De tous les tissus présents chez les oiseaux, le muscle squelettique est le tissu dont le développement va le plus influencer sur la croissance générale de l'organisme (Ricklefs 1979). En effet, ce tissu est le plus représenté chez la majorité des oiseaux. Il est donc légitime de supposer que le taux de croissance de l'organisme va plutôt se rapprocher du taux de croissance du tissu le plus représenté dans l'organisme que de celui le moins représenté (Ricklefs 1979). A l'instar du tissu adipeux, les cellules fonctionnelles ne peuvent pas se diviser, la prolifération cellulaire est donc assurée par des myoblastes indifférenciés, dont la prolifération puis la différenciation sont aussi contrôlées par des hormones, telles que la T3 ou la GH (Halevy *et al.* 1996).

Lors de la croissance du manchot, le développement des muscles squelettiques est crucial. En effet, ceux-ci permettent à l'oiseau d'assurer les fonctions de locomotion et de thermogénèse. Parmi ces tissus, le muscle pectoral est particulièrement intéressant car il présente une croissance extrêmement rapide, bien supérieure à celle des autres muscles squelettiques chez le manchot Adélie

(Raccurt *et al.* 2008). Cette différence pourrait s'expliquer par le rôle particulier de ce muscle dans la thermogénèse, comme observé chez le poussin manchot Royal (Duchamp *et al.* 1989 ; Duchamp *et al.* 2002), et, plus tardivement, dans la nage. Nous pouvons supposer que ce muscle va subir une forte maturation fonctionnelle, nécessaire au développement de ces différentes fonctions, à l'image de ce qui est observé chez le manchot Royal (Erbrech *et al.* 2011).

La plasticité métabolique qui conditionne la survie du poussin, repose sur une gestion très fine de l'allocation énergétique aux fonctions vitales prioritaires de l'organisme. Ainsi, nous supposons que le développement du muscle pectoral va requérir une forte allocation d'énergie, au détriment de la croissance des autres organes. Il nous a alors paru intéressant d'étudier, au cours de nos travaux, la variation de la fonctionnalité de ce muscle pectoral en tant qu' effecteur des processus thermogènes et muscle essentiel pour la nage.

3/ Le développement des muscles squelettiques : variation du typage des fibres

Après la naissance, les muscles squelettiques évoluent de manière spécifique en termes de performances et de spécialisation. La diversité des muscles squelettiques repose sur leur composition en types de fibres, chacune ayant des propriétés énergétiques et fonctionnelles spécifiques (**Table 1**).

Type de fibre	Fibres Lentes	Fibres Rapides	
	<u>Oxydatives lentes</u> (SO : Slow Oxidative)	<u>Oxydatives rapides</u> (FOG : Fast twitch Oxidative-Glycolytic)	<u>Oxydatives rapides</u> (FG : Fast twitch Glycolytic)
Vitesse de contraction	Lente	Rapide	Rapide
Activité ATPasique	Faible	Elevée	Elevée
Résistance à la fatigue	Elevée	Intermédiaire	Faible
Capacité de phosphorylation oxydative	Elevée	Elevée	Faible
Enzymes de la glycolyse anaérobie	Peu	Intermédiaire	Beaucoup
Nombre de mitochondries	Beaucoup	Beaucoup	Peu
Diamètre de la fibre	Petit	Intermédiaire	Grand
Force par surface de section	Faible	Intermédiaire	Elevée

Table 1 : Caractéristiques morpho-fonctionnelles des différents types de fibres musculaires (D'après Eckert *et al.* 1999). *Les caractéristiques de ces différents types de fibres ont été réalisées principalement chez les mammifères.*

La mise en place des caractéristiques contractiles et métaboliques des fibres s'effectue progressivement au cours du développement embryonnaire, plus ou moins rapidement selon les espèces. Plus les espèces ont un développement important à la naissance (grands mammifères, oiseaux), plus la différenciation contractile et métabolique est avancée bien que des modifications du typage de fibres continuent à se produire pendant les premières semaines de vie.

Chez le rat ou l'Homme, chacun de ces types de fibres est associé à une isoforme de chaîne lourde de myosine (Myosin Heavy Chain : MyHC) qui caractérise la fonctionnalité de la fibre (MyHC I, IIA/IIIX, IIB pour les fibres lentes oxydatives, rapides oxydatives-glycolytiques et rapides glycolytiques respectivement en plus des isoformes embryonnaires et cardiaques) (**Table 1**). Si les caractéristiques morpho-fonctionnelles des fibres sont retrouvées chez l'oiseau, les auteurs définissent 9 types de MyHC différentes (**Table 2**) (Bandman & Rosser 2000).

Type	MyHC	Abbréviation
Rapide	Embryonic 1	Cemb1
	Embryonic 2	Cemb2
	Embryonic 3	Cemb3
	Neonatal	Cneo
	Adult	Cadult
Lente et cardiaque	Slow 1	SM1
	Slow 2	SM2
	Atrial / Slow 3	Atrial/SM3
	Ventricular	Cvent

Table 2 : Description des chaînes lourdes de myosine chez le poulet (D'après Bandman & Rosser 2000). *Il apparaît un nombre plus important de chaînes lourdes de myosine chez les oiseaux par comparaison avec les mammifères. Sont notées dans le tableau les abréviations de chacun des types de MyHC que nous utiliserons dans ce paragraphe.*

Quelques études ont cherché à caractériser l'expression des différents types de chaînes de myosine au cours de la croissance chez l'oiseau.

Les fibres lentes, adaptées aux activités durantes, sont requises pour le maintien de la posture. Au cours du développement péri-éclosion, parmi les isoformes lentes de chaînes lourdes de myosine, SM3 est exprimée dans les fibres au cours de l'embryogenèse précoce puis est progressivement remplacée par SM1 (stade embryonnaire / stade adulte) puis SM2 (stade adulte). Contrairement à ce qui se passe chez les mammifères, des isoformes embryonnaires de MyHC sont retrouvées chez les oiseaux adultes. La diversité des isoformes lentes de MyHC au stade adulte pourrait s'expliquer notamment par les multiples contraintes musculaires rencontrées plus spécifiquement par les muscles du vol lors des phases de repliement des ailes ou lors du vol plané (Meyers 1992 et Rosser *et al.* 1994 dans Bandman & Rosser 2000).

Les fibres rapides, adaptées aux contractions intenses mais limitées dans le temps, sont principalement décrites dans les muscles locomoteurs. Au stade adulte, la proportion entre les fibres de type rapides oxydatives-glycolytiques et/ou rapides glycolytiques varie selon les muscles considérés.

Ceci s'accompagne d'une séquence d'expression différente des isoformes des MyHC au cours de la croissance (**Figure 21**) avec pour le muscle pectoral, muscle majoritairement composé de fibres de type glycolytique chez le poulet (Joubert 2009), un remplacement total des isoformes embryonnaires par des Cadult, alors que des isoformes embryonnaires perdurent au stade adulte dans le gastrocnémien, muscle plutôt composé de fibres de type oxydatif-glycolytique (Tidyman *et al.* 1997).

Cependant, cette proportion entre les types de fibres varie au sein d'un même muscle entre les espèces. En effet, l'étude du muscle pectoral chez le pigeon montre une composition mixte de ce muscle entre fibres rapides oxydatives-glycolytiques (majoritaires) et rapides glycolytiques (minoritaires), ces dernières étant utilisées lors de phases d'atterrissage. A l'inverse, chez les oiseaux migrateurs, une hétérogénéité du pectoral est décrite, avec la présence de fibres de type rapides oxydatives-glycolytiques en superficie, et des types de fibres lentes oxydatives dans le pectoral profond, permettant de soutenir les efforts musculaires indispensables respectivement au vol battu et au vol plané (Bandman & Rosser 2000). Ces modifications du typage des fibres sont caractérisées par des différences dans la composition des MyHC au stade adulte. Curieusement, dans le pectoral de manchot Royal, aucune différence de composition en MyHC (même si les isoformes précises n'ont pas été déterminées) n'est observée au cours du premier mois de croissance (Erbrech *et al.* 2011). Cet organe étant essentiellement utilisé pour la thermogenèse à terre, les auteurs suggèrent que l'oiseau réalise un compromis énergétique qui se traduit dans un premier temps, par une maturation des muscles impliqués dans la locomotion terrestre (le gastrocnémien présente une variation dans sa composition en MyHC) et, plus tardivement, par une maturation du pectoral, organe de la nage, *via* l'augmentation de la taille des fibres musculaires, en vue de l'acclimatation au milieu marin (Erbrech *et al.* 2011).

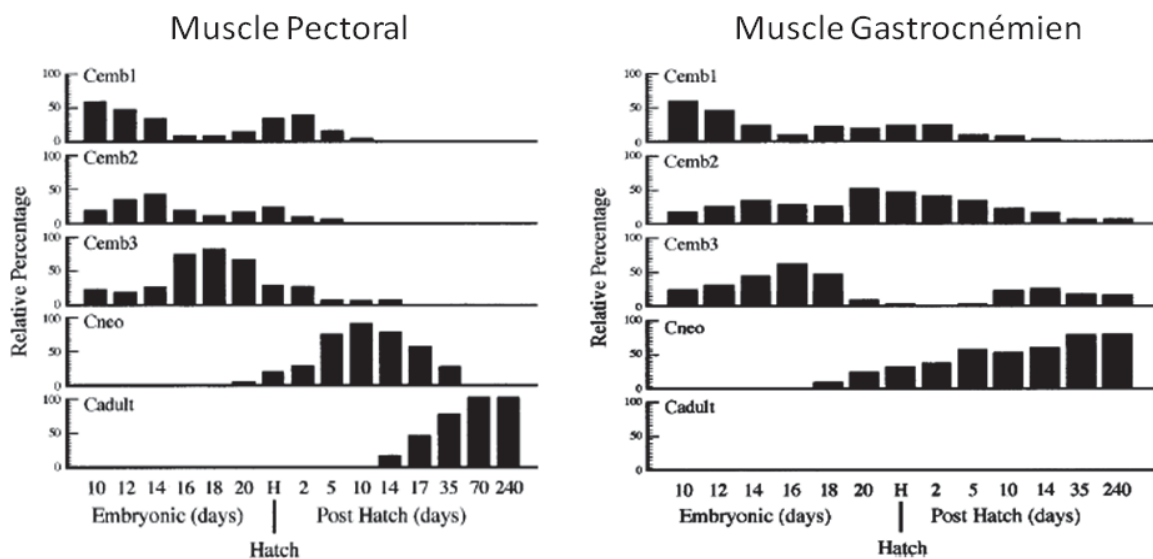


Figure 21 : Evolution de l'expression des ARN messagers codant les isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) de type rapide dans 2 muscles squelettiques de poulet (*Gallus gallus*) au cours de la croissance (D'après Bandman & Rosser 2000). Dans le muscle pectoral, nous observons uniquement la présence de MyHC « Cadult », isoformes adultes, au bout de 240 jours post éclosion. A l'inverse, le muscle gastrocnémien ne contient aucune MyHC adultes après 240 jours de croissance ; seules des MyHC néonatales et embryonnaires sont retrouvées.

Cette diversité d'expression de chaînes lourdes de myosine selon les muscles et les espèces considérés, mise en place lors du développement des poussins, permet d'orienter les caractéristiques morpho-fonctionnelles des muscles en fonction des contraintes auxquelles sont soumis les animaux. Cette plasticité cellulaire, observée lors des phases de prolifération et de différenciation du muscle, doit certainement jouer un rôle primordial chez les espèces polaires afin de répondre aux différentes contraintes énergétiques (locomotion, thermogenèse, apport alimentaire souvent limité).

4/ Régulation des caractéristiques morpho-fonctionnelles du muscle lors de la croissance au froid

L'environnement froid représente une contrainte pour le développement musculaire qui induit la maturation précoce de certaines fibres dans certains muscles. C'est ainsi que de tous récents travaux (Erbrech *et al.* 2011) montrent, contrairement à ce que les auteurs attendaient, qu'une isoforme de MyHC mature apparaît précocement (dans les premiers jours de vie) dans le muscle pectoral du manchot Royal, alors que la maturation des MyHC a lieu progressivement dans les muscles de la patte, calquée sur l'acquisition de la locomotion pédestre du poussin. Résultat étonnant si l'on considère que le manchot Royal ne se servira de son muscle pectoral, de manière active, qu'un an plus tard lorsqu'il partira en mer. Les auteurs attribuent donc cette maturation anticipée des fibres du muscle pectoral aux besoins précoces de thermogenèse, précédemment décrits par Duchamp et collaborateurs (Duchamp *et al.* 2002), en concluant que cette maturation différentielle répond à la fois aux contraintes imposées par la locomotion et par l'environnement.

Les caractéristiques contractiles des fibres sont en partie influencées par l'expression des isoformes de chaîne lourde de myosine. Cependant, ceci doit aussi s'accompagner d'une modification coordonnée des caractéristiques métaboliques, passant par des différences d'activités de certaines enzymes.

L'acclimatation au froid (4°C) du caneton (*Cairina moschata*) pendant 5 semaines induit une augmentation du métabolisme oxydatif dans les muscles gastrocnémiens rouge et blanc. Ceci est soutenu par un changement dans le typage des fibres (augmentation des fibres lentes oxydatives dans le muscle gastrocnémien rouge des canetons acclimatés au froid) et une augmentation de la vascularisation des muscles (Duchamp *et al.* 1992). L'augmentation du découplage mitochondrial durant cette phase suggère que l'augmentation des capacités oxydatives du muscle est principalement utilisée pour favoriser la production de chaleur, *via* des processus de NST, sans modification de la synthèse d'ATP (Duchamp *et al.* 1992).

Une étude plus récente a montré que l'exposition du poussin (*Gallus gallus*) au froid durant 10 jours induit aussi une modification du typage des fibres du muscle pectoral qui passe d'un métabolisme de type glycolytique vers un métabolisme de type oxydatif (Ueda *et al.* 2005). Cette modification est sous le contrôle d'un facteur de transcription, PGC1 α , capable d'augmenter le métabolisme oxydatif des fibres, en augmentant la biogenèse mitochondriale et en convertissant ainsi les fibres de type rapide en fibres de type lent (Lin *et al.* 2002 ; Ueda *et al.* 2005). Ceci s'accompagne par ailleurs d'une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans le découplage mitochondrial, comme l'UCP ou l'ANT, toujours sous le contrôle de PGC1 α (Ueda *et al.* 2005 ; Joubert 2009) lui-même sous le contrôle de l'hormone thyroïdienne T3 (Rey *et al.* 2010b) dont la concentration plasmatique est augmentée au froid chez l'oiseau (Collin *et al.* 2003a). Des travaux du laboratoire ont également montré que l'augmentation de l'expression des protéines découplantes (UCP aviaire en particulier) lors de l'acclimatation au froid pouvait être corrélée à une augmentation de la capacité de NST des canetons (Teulier *et al.* 2010).

L'AMPK (AMP-activated protein kinase), considérée comme la principale enzyme capable de détecter et réguler l'énergie cellulaire, joue un rôle important dans le développement de l'oiseau, en régulant la répartition de l'énergie cellulaire entre les besoins dus à la croissance et à la thermogénèse (Walter *et al.* 2010). En effet, après l'éclosion, l'expression et l'activité de cette enzyme augmente, de façon concomitante avec la production de chaleur, et l'augmentation de la capacité oxydative des mitochondries des muscles squelettiques (Walter *et al.* 2010). Cette enzyme, dont la phosphorylation est sous contrôle de l'hormone thyroïdienne T3, accroît l'oxydation des substrats énergétiques (acides gras, glucose) et stimule l'expression de PGC1 α et de NRF1, facteur intervenant dans la biogenèse mitochondriale (Hardie *et al.* 2003 ; Walter *et al.* 2010). Cette enzyme clé semble donc contrôler de manière coordonnée, *via* PGC1 α , à la fois le métabolisme cellulaire et le typage des fibres.

La croissance et la maturation musculaire résulte d'une adéquation entre l'expression des isoformes de chaînes lourdes de myosine (effecteur de la contraction) et la modulation du métabolisme cellulaire (producteur d'énergie). Les hormones (T3), les facteurs de transcription (PGC1 α) et les « senseurs » de l'énergie cellulaire (AMPK) jouent alors un rôle primordial dans la différenciation morpho-fonctionnelle des fibres musculaires et la mise en place des processus thermogènes.

Le manchot Adélie apparait comme un modèle particulièrement intéressant car il doit développer, en quelques semaines, l'ensemble des mécanismes indispensables au maintien de son endothermie tout en assurant une croissance rapide pour réussir son départ en mer avant l'hiver

austral. Quelle stratégie d'allocation d'énergie va-t-il adopter pour assurer le coût énergétique de ces deux fonctions qui apparaissent prioritaires pour sa survie?

Cette problématique s'ajoute aux problématiques évoquées précédemment et a fait l'objet d'une grosse partie de notre travail à la fois sur le terrain en Terre Adélie et au laboratoire.

L'ensemble de nos travaux vise donc la compréhension des mécanismes d'acclimatation aux différentes contraintes que représentent : 1/ le choc thermique du passage en mer et les plongées en apnée pour le manchot Royal et 2/ une croissance rapide dans des conditions environnementales très hostiles pour le manchot Adélie. La phénologie de ces oiseaux implique une plasticité de leur métabolisme que nous avons voulu étudier par des approches de physiologie intégrative mais aussi par des approches moléculaires innovantes dont nous voudrions rappeler les principes fondamentaux.

Chapitre 5 : Les approches de biologie moléculaire

Le développement actuel des approches de biologie moléculaire a ouvert un champ d'investigation considérable en physiologie et écophysiologie. En effet, elles possèdent de multiples avantages :

- elles sont facilement transposables aux espèces non conventionnelles ;
- elles utilisent peu de matériel biologique ;
- elles peuvent permettre d'étudier l'expression de nombreux gènes différents à partir d'un même échantillon.

Au cours de cette thèse, nous avons principalement utilisé 2 techniques, basées sur des principes différents : l'amplification génique par PCR quantitative et l'hybridation génique sur puce à ADN.

1/ Méthode basée sur l'amplification, qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction)

a/ Principe général

La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par 2 amorces. Cette amplification permet d'augmenter suffisamment le nombre de copies de ce fragment d'ADN afin de le rendre détectable. Ainsi, la quantification de l'ADN complémentaire (ADNc) amplifié après un nombre de cycles prédéfini nous renseigne sur la quantité présente au départ, et donc sur le niveau d'expression initial de l'ARN messager correspondant ; ceci en supposant que l'efficacité de la réaction soit constante : c'est le principe de la **PCR semi-quantitative**. Cependant, cette quantification ne peut se faire que sur la phase exponentielle de la courbe, seule phase représentative du nombre de copies initiales (**Figure 22**).

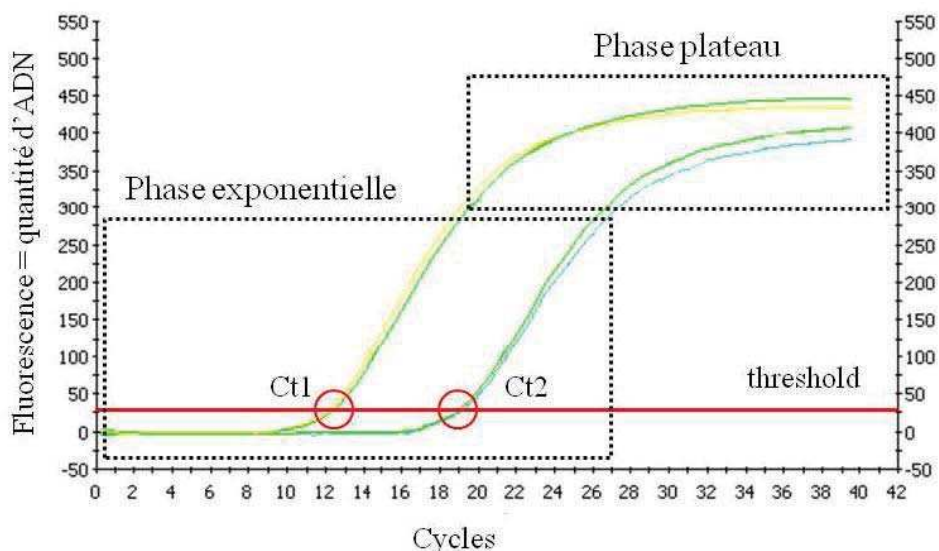


Figure 22 : Courbes d'amplifications obtenues lors d'une PCR quantitative sur 2 échantillons dosés en duplicat. Deux phases sont observées lors de l'amplification d'un brin d'ADN, une phase exponentielle durant laquelle les amplicons se dupliquent à chaque cycle, et une phase plateau où la limite maximale de détection de l'appareil est atteinte. Après détermination du *threshold* (seuil à partir duquel le niveau de fluorescence de l'échantillon est considéré comme différent du bruit de fond), des *Ct* sont attribués pour chacune des courbes (intersection entre la courbe et la ligne de *threshold*). Dans notre exemple, le premier échantillon (*Ct1*) possède une valeur inférieure au le second, ce qui permet de déduire que l'échantillon 1 possède plus de copies d'ADN au départ que l'échantillon 2.

Actuellement, la **PCR quantitative** permet de contrôler la réaction de PCR en temps réel, au fur et à mesure de son déroulement. L'amplification doit être couplée à l'incorporation d'une molécule fluorescente (SYBR Green), ainsi, la quantité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de produit PCR généré à chaque cycle.

b/ Utilisation des intercalants

Le colorant SYBR Green, moins toxique, plus spécifique et plus sensible que le Bromure d'Ethidium, se fixe spécifiquement sur l'ADN double brin, induisant une augmentation de la fluorescence de la molécule (émission 530 nm). Ainsi, plus le fragment d'ADN (amplicon) est amplifié, plus le signal fluorescent est intense. Cependant, cette méthode de détection n'est pas spécifique. En effet, toute molécule double brin est quantifiée, y compris l'amplification non spécifique ou la formation de dimères d'amorces. Afin de vérifier la spécificité de la réaction, une courbe de fusion est réalisée en augmentant progressivement la température du milieu. L'augmentation

de température favorise la dissociation des brins. A une température donnée (température de fusion), le fragment double brin devient simple brin (en fonction de sa taille, son pourcentage de GC) ce qui provoque une baisse brutale de la fluorescence.

c/ PCR quantitative : méthode de quantification

La quantification de la PCR n'est pas basée sur la quantité de produit PCR obtenue en fin de réaction mais sur le moment auquel le signal fluorescent émerge du bruit de fond. En effet, un seuil (threshold) est défini, pour lequel le niveau de fluorescence est suffisamment bas pour que les courbes d'amplifications soient dans la phase exponentielle et suffisamment haut pour être au dessus du bruit de fond. Une courbe d'amplification est obtenue pour chaque échantillon. L'intersection de cette courbe avec le seuil défini le Ct (Cycle threshold), autrement dit le cycle à partir duquel la courbe « sort » du bruit de fond. Ainsi, pour un échantillon, plus le Ct est faible et plus la quantité de séquence cible de départ (ADNc) est importante (**Figure 22**). L'utilisation d'une gamme étalon comprenant des quantités connues d'ADNc permet alors de relier le Ct à la concentration initiale d'ADNc dans l'échantillon, proportionnelle au niveau d'expression de l'ARNm correspondant.

Cependant, il est indispensable de rapporter la concentration d'ADNc du gène d'intérêt à celle d'un gène s'exprimant de manière stable dans les différentes conditions expérimentales pour s'assurer que la variation observée sur l'expression du gène d'intérêt n'est pas due à la manipulation (dégradation des ARN, différence d'efficacité de la reverse transcription, erreur de dosage ou de pipetage) mais bien à une réelle différence d'expression.

Cette technique de qPCR permet d'estimer le niveau d'expression d'un ARNm pour différentes conditions expérimentales. De plus, cette technique peut facilement être mise en œuvre sur des modèles non conventionnels comme les manchots, en utilisant des données de séquençage d'espèces proches (poulet par exemple) afin de dessiner des amorces spécifiques d'un gène. Le séquençage des produits d'amplification est une étape indispensable pour vérifier la spécificité du produit amplifié et de mesurer son pourcentage de similarité avec le gène sur lequel a été dessiné les amorces. Cette méthodologie ne permet cependant d'explorer qu'un nombre limité de gènes préalablement séquencés, au moins chez une espèce proche.

2/ Méthode basée sur l'hybridation, la puce à ADN

La notion de « puce à ADN » peut désigner différentes techniques avec des domaines d'applications très différents (analyse du transcriptome, étude du polymorphisme, identification d'espèces, études phylogénétiques ...). Dans cette thèse, nous utiliserons ce terme uniquement dans le cadre de l'analyse du transcriptome.

a/ Principe général

Le principe de la puce à ADN est simple. Il s'agit de fixer sur une petite surface des fragments d'ADN spécifiques d'un transcrit donné (sonde). Ce dispositif est mis en contact avec les acides nucléiques à analyser, préalablement couplés à un marqueur fluorescent ou radioactif (cibles). L'hybridation entre les cibles et les sondes, proportionnelle à la quantité de cibles présentes, est alors quantifiée grâce aux signaux radioactifs ou fluorescents (Reymond 2004 ; Keime 2006).

Ce principe est identique pour toutes les puces, même s'il existe des différences entre la nature des supports, les caractéristiques des sondes et les marqueurs utilisés. Dans la suite de notre propos, nous ne décrivons que les caractéristiques des puces Affymetrix[®], utilisées au cours de cette thèse.

b/ Les puces Affymetrix[®]

Une particularité des puces à ADN développées par la société Affymetrix[®] réside dans leur fabrication. Contrairement aux autres puces à ADN où les sondes sont déposées par un robot sur la plaque de verre et fixées via des interactions électrostatiques ou covalentes, celles développées par Affymetrix[®] utilisent un procédé de synthèse des sondes *in situ*, par photolithographie (**Figure 22**). Cette technique procède par dépôts successifs des 4 nucléotides sur un support de verre. Cette surface est recouverte d'un polymère qui possède des groupements aminés protégés par un groupement photolabile. Ainsi, la photodéprotection (lyse par la lumière) de certains groupements (selon le masque choisi) permet de les exposer spécifiquement à certains nucléotides, assurant la formation de séquences précises d'oligonucléotides. Cette technique présente l'avantage de former un nombre important d'oligonucléotides sur une surface réduite (Lipshutz *et al.* 1999).

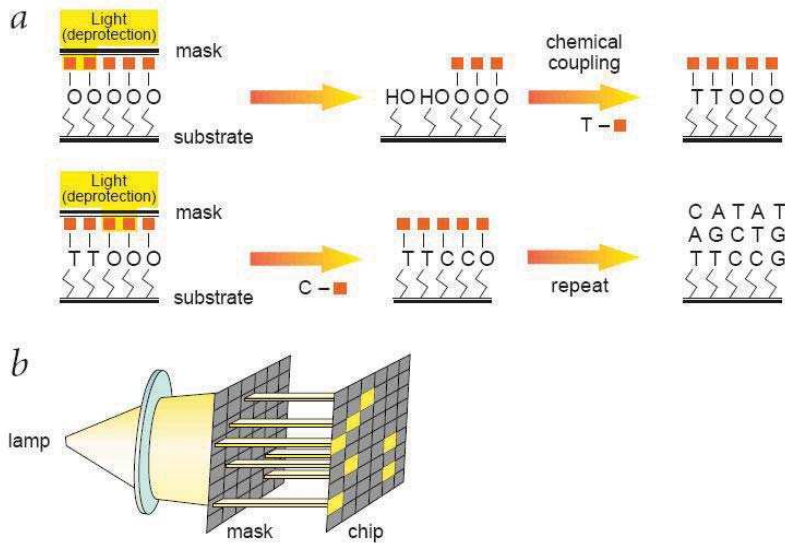


Figure 23 : Principe de la synthèse des sondes *in situ* par photolithographie (D'après Lipshutz *et al.* 1999 ; Keime 2006) *a* - Schéma décrivant le procédé utilisé pour la synthèse *in situ* des sondes. Le support en verre est recouvert d'un polymère possédant des groupements aminés protégés par un groupement photolabile. Selon un schéma pré établi, certains groupements sont lysés (grâce à un masque). Un désoxynucléotide est ajouté et va pouvoir se fixer sur les groupements non protégés. Cette opération est renouvelée et permet d'obtenir des sondes avec les séquences désirées. *b* - représentation schématique de la lampe, du masque et de la puce.

Une deuxième particularité de ces puces à ADN est la présence pour une même cible de différentes sondes (entre 11 et 20) d'environ 25pb chacune. Ces sondes sont choisies pour leur spécificité afin de limiter tout risque d'hybridation aspécifique (Keime 2006).

Une dernière particularité est l'association à chaque sonde spécifique du transcrite (PM : Perfect Match) d'une sonde appelée MisMatch (MM) dont la séquence est identique exceptée une mutation en position centrale. Ceci permet de quantifier, pour chaque sonde PM, l'hybridation aspécifique correspondante. L'ensemble PM – MM est appelé *Probe Pair* (ou paire de sondes), et l'ensemble des *Probes Pairs* reconnaissant une cible est appelé *Probe Set*.

c/ De l'échantillon à l'analyse par puce à ADN Affymetrix®

Après extraction des ARN totaux de l'échantillon d'intérêt, ceux-ci subissent une transcription inverse en présence d'amorce polyT, permettant d'obtenir les ADNc doubles brins correspondant aux ARNm. A cette phase succède une transcription *in vitro* avec des ribonucléotides biotinylés permettant d'obtenir des ARN complémentaires (ARNc). Ces ARNc sont hybridés sur la puce à ADN et

l'hybridation est révélée par le complexe streptavidine-phycoerythrine. Les données brutes sont obtenues par lecture avec un laser confocal (**Figure 24**). De plus, lors des étapes d'extraction et d'hybridation, des ARN contrôles sont ajoutés en différentes concentrations afin de s'assurer de la validité de la puce et que les niveaux d'intensités de fluorescence mesurés sur la puce reflètent bien les niveaux d'abondance des ARNm.

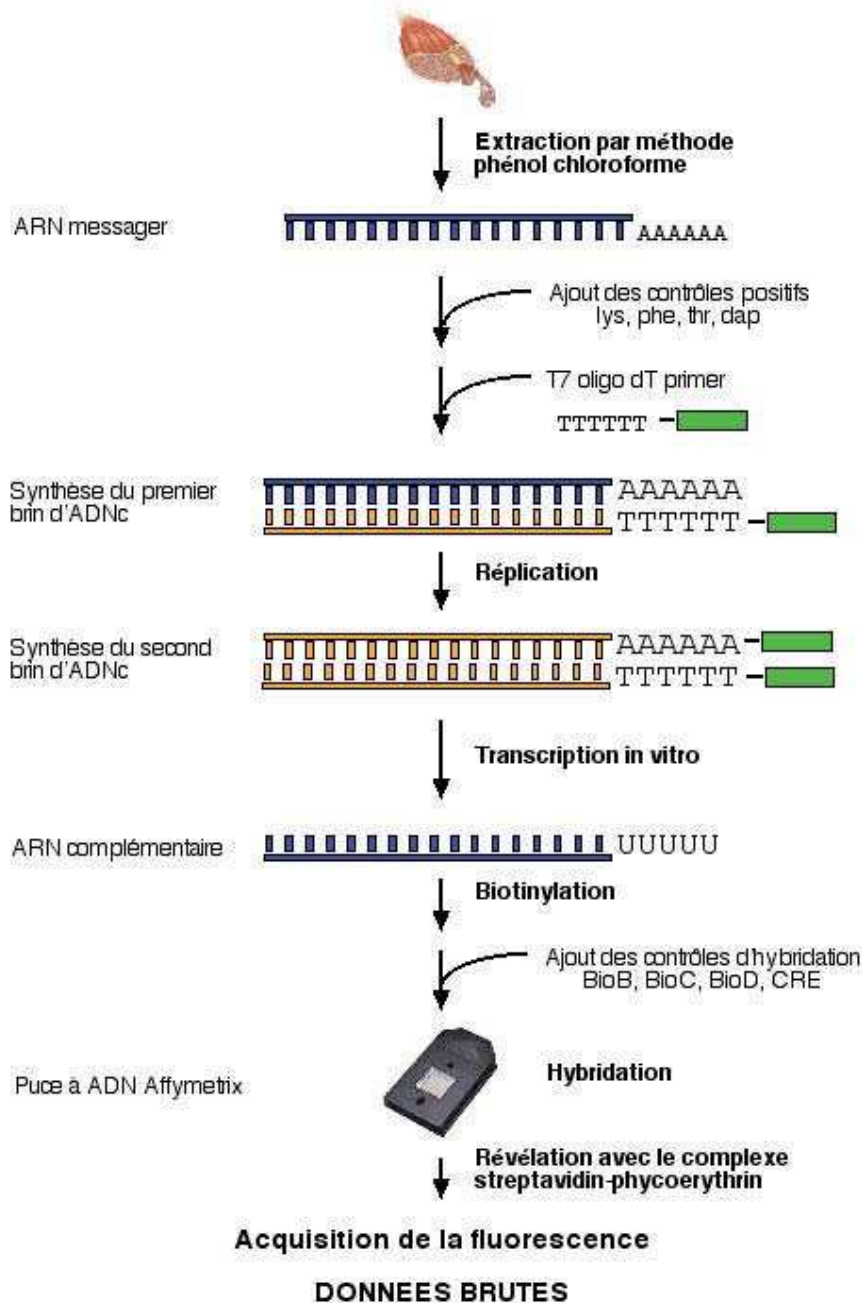


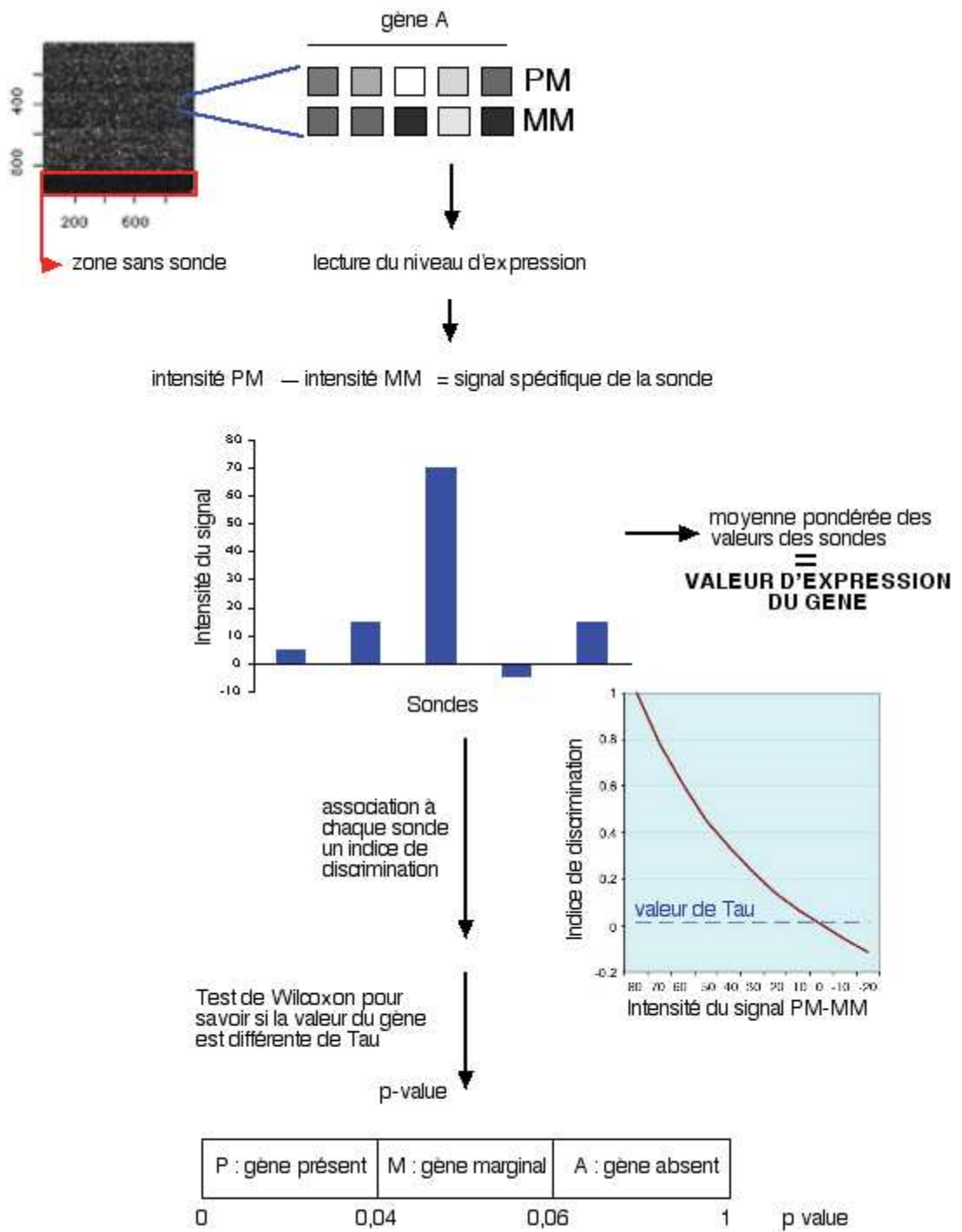
Figure 24 : Protocole édité par la société Affymetrix® décrivant les différentes étapes depuis l'extraction des ARN totaux jusqu'à l'hybridation des ARNc sur la puce à ADN et l'obtention des données brutes.

Les données brutes ne peuvent pas être utilisées en l'état. Affymetrix® a donc développé un algorithme d'analyse GCOS (GeneChip Operating Software) prenant en compte, pour chaque gène, les différentes paires de sondes (*Probes Pairs*) composant le *Probe Set*. Cet algorithme établit le niveau d'expression de chaque sonde PM en lui enlevant la valeur de la sonde MM correspondante. Le niveau d'expression du gène est alors estimé à partir d'une moyenne pondérée des niveaux d'expression des sondes PM corrigées.

De plus, cet algorithme détermine la présence du gène, à savoir si son niveau d'expression est statistiquement différent de zéro. Pour cela, pour chaque paire de sondes, l'algorithme calcule un indice de discrimination, directement relié à la différence entre PM et MM. Plus l'écart d'intensité de fluorescence entre les sondes est important, plus l'indice est important et plus la spécificité de l'hybridation est importante. Ensuite, un test de Wilcoxon est appliqué sur les valeurs d'indices de discrimination obtenus pour chaque paire de sondes, pour savoir si ceux-ci sont supérieurs à Tau, l'indice de discrimination défini par l'algorithme GCOS. Selon la valeur de probabilité obtenue, les gènes sont considérés comme présents (P), marginaux (M) ou absents (A) (**Figure 25**).

Il est néanmoins impossible de comparer les valeurs de fluorescences obtenues pour chaque puce. En effet, la fluorescence est détectée par amplification électronique, empêchant la réalisation d'une mesure absolue de fluorescence (Keime 2006). Une étape de normalisation est nécessaire afin d'obtenir une distribution identique des intensités de fluorescence des sondes pour les rendre comparables entre elles. L'algorithme GCOS utilise une méthode de normalisation globale qui permet de centrer les distributions par rapport à leur médiane.

Il reste alors à déterminer statistiquement les gènes différentiellement exprimés entre les différents groupes expérimentaux. Notre étude n'a fait appel qu'à des comparaisons entre 2 groupes. Pour cela, des tests dérivés du test de Student sont appliqués. Un test couramment utilisé est le test de Smyth (Smyth 2004), basé sur des statistiques bayésiennes. Il présente l'avantage de discriminer les gènes différentiellement exprimés dans le cas d'expérience sur puce à ADN tout en minimisant le nombre de faux positifs. Cependant, la multiplication du nombre de tests (1 par gène) oblige à contrôler le nombre de faux positifs. Une correction doit alors être apportée au test de Smyth, comme la correction de Benjamini et Hochberg (Benjamini & Hochberg 1995).



POUR CHAQUE GENE DE CHAQUE PUCES, DETERMINATION PRESENCE/ABSENCE

Figure 25 : Schéma représentant le fonctionnement de l'algorithme GCOS classiquement utilisé par la société Affymetrix pour l'analyse de ses puces à ADN.

d/ Cas particulier de l'hybridation hétérologue

Ces analyses décrites précédemment sont valables uniquement dans le cas d'une hybridation homologe où les sondes de la puce sont spécifiques des gènes de l'espèce étudiée. Aucune puce à ADN n'est disponible pour étudier les variations d'expression des gènes chez le manchot. Nous avons donc utilisé une alternative : l'hybridation hétérologue des gènes « manchot » sur des puces à ADN commerciales.

Cette utilisation particulière des puces pose certains problèmes :

- **La divergence de séquences entre les sondes (sur la puce) et les cibles (ARNc)** altère la qualité de l'hybridation (Gilad *et al.* 2005 ; Bar-Or *et al.* 2007). En effet, il existe une corrélation inverse entre le taux de mutations (entre sondes et cibles) et le signal d'hybridation. Plus les mutations sont nombreuses et moins le signal d'hybridation est important (Ji *et al.* 2004).

- Conséquence directe du point précédent, il devient alors **impossible d'utiliser l'information de la sonde MisMatch** présente sur la puce Affymetrix®. L'efficacité de la sonde MisMatch étant basée sur la spécificité de reconnaissance entre la sonde Perfect Match et l'ARNc, elle est impossible à garantir dans ce cas. Il est alors impératif d'utiliser une méthode d'analyse alternative, souvent basée sur une filtration du signal (Bar-Or *et al.* 2007 et références). Il est à noter que l'utilisation de la sonde MisMatch reste problématique, même lors d'hybridation homologe, car celle-ci est, dans 30% des cas, plus intense que la sonde Perfect Match correspondante (Irizarry *et al.* 2003).

- **L'intensité du signal de fluorescence** généralement **réduit** dans le cas d'hybridations hétérologues sur puces à ADN, est probablement à relier à la divergence des séquences (Hittel & Storey 2001 ; Ji *et al.* 2004 ; Renn *et al.* 2004 ; Gilad *et al.* 2005 ; Bar-Or *et al.* 2006 ; Bar-Or *et al.* 2007 ;). Cette diminution induit alors une réduction du nombre de gènes différentiellement exprimés, si ces derniers sont identifiés avec des tests statistiques classiques (Renn *et al.* 2004 ; Gilad *et al.* 2005 ; Bar-Or *et al.* 2007).

- **Le risque d'hybridation croisée**, induisant une reconnaissance du mauvais transcrit sur une sonde, pourrait être augmenté et altérer les résultats (Bar-Or *et al.* 2006 ; Bar-Or *et al.* 2007). Cependant, même dans le cas d'hybridation homologe, l'hybridation croisée des paralogues (2 gènes homologues issus d'une duplication) ne peut pas être contrôlée.

• **La reproductibilité des résultats** pourrait être altérée dans ce type d'hybridation. La majorité des études montre cependant qu'une telle utilisation des puces permet d'obtenir une bonne reproductibilité des données (Bar-Or *et al.* 2007 et références).

Une utilisation des puces à ADN dans le cadre d'une hybridation hétérologue est pourtant possible et quelques auteurs ont apporté différentes recommandations, concernant à la fois le choix de la puce et son analyse.

- L'utilisation de puces à ADN dont les sondes ont une **divergence de séquence minimum** vis à vis des cibles (Bar-Or *et al.* 2007 ; Eddy & Storey 2008). Cependant, le manque d'information de séquençage sur l'espèce étudiée nous empêche souvent de pouvoir estimer la divergence entre les séquences. Ainsi, l'utilisation de la distance phylogénétique peut donner une information sur cette divergence de séquence, la performance de l'hybridation hétérologue étant accrue quand la distance phylogénétique est moindre (Renn *et al.* 2004). Les puces à ADN conçues pour le poulet seraient les plus appropriées pour l'étude du transcriptome de manchot ; la divergence de séquence étant estimée à 100 millions d'années (Van Tuinen & Hedges 2001).

- L'utilisation de puces à ADN avec des **sondes de longue taille** permet de faciliter l'hybridation hétérologue (Bar-Or *et al.* 2007). Mais ces puces présentent un inconvénient majeur, elles ne possèdent qu'une seule sonde par ARNc. L'inconvénient des **puces à ADN à sondes courtes** (comme celles développées par Affymetrix®) est compensé par la présence de plusieurs sondes par ARNc, qui augmentent les possibilités de reconnaissance de la séquence cible.

- L'analyse des puces **utilisant l'information de chaque paire de sondes indépendamment**, permet d'augmenter le nombre de transcrits détectés et d'approcher le nombre obtenu lors d'une hybridation homologue (Grigoryev *et al.* 2005).

- Cette analyse peut aussi se faire en **identifiant préalablement les sondes qui reconnaissent les parties des gènes qui sont conservées entre l'espèce de référence** (reconnue normalement par la puce) **et l'espèce étudiée**. Ceci peut se faire par comparaison entre les séquences (Bar-Or *et al.* 2006 ; Bar-Or *et al.* 2007) ou par hybridation d'ADN génomique sur la puce à ADN (Hammond *et al.* 2005). La difficulté réside dans l'obtention des données de séquences ou dans la définition d'un seuil de fluorescence à partir duquel l'hybridation d'ADN génomique peut être considérée comme suffisante.

Quelque soient la/les méthode/s choisie/es pour améliorer la qualité des résultats obtenus par hybridation hétérologue, une étape de validation de ces résultats est indispensable. Classiquement, la variation d'expression de certains gènes identifiés par hybridation hétérologue est validée par PCR quantitative.

La puce à ADN semble donc une approche efficace pour explorer l'expression de nombreux gènes, et mettre en évidence l'activation de différentes voies cellulaires. Dans notre travail, cette technologie nous a permis d'explorer les variations d'expression de familles de gènes impliqués dans les différents mécanismes d'acclimations mis en place par le manchot pour survivre aux contraintes du milieu antarctique. L'utilisation obligatoire de puces à ADN hétérologues conçues pour le poulet a nécessité des ajustements expérimentaux et des modifications de la méthode d'analyse afin d'en tirer le maximum d'informations.

Objectifs

Les manchots apparaissent donc comme des modèles naturels d'acclimatation aux contraintes liées à leur phénologie, à laquelle se rajoutent toutes les contraintes physiques et thermiques de leur environnement, air/eau. La protection qui entoure la faune sauvage et leur éloignement expliquent le peu d'études physiologiques qui leur sont consacrées. Des travaux ont clairement établi les stratégies comportementales, les adaptations physiologiques de lutte contre le froid qu'ont développé ces oiseaux pour vivre et se reproduire dans le milieu polaire. En revanche, peu d'études se sont intéressées à la plasticité métabolique nécessaire au maintien de leur budget énergétique constamment en équilibre. Comment le manchot gère-t-il 1/ les coûts énergétiques additionnels pour assurer sa croissance et en même temps maintenir son homéothermie ; 2/ le stress thermique que représente son passage du milieu terrestre au milieu marin et l'activité physique intense des voyages alimentaires et 3/ le stress oxydant qu'il subit lors des plongées répétées alors que cet animal est longévif ?

L'objectif principal de cette thèse a été de décrypter les mécanismes moléculaires responsables des ajustements métaboliques nécessaires à la réussite des périodes clés de la vie du manchot Royal ou du manchot Adélie. Puis, dans une démarche intégrative nous avons corrélé nos données à des résultats obtenus sur l'animal entier (calorimétrie indirecte) ou par des études biochimiques du muscle pectoral, très sollicité pour la thermogenèse, la locomotion, et site important de production de ROS chez ces oiseaux marins.

Nous avons choisi l'utilisation d'une technique d'analyse transcriptomique à large échelle pour explorer l'ensemble des réponses développées lors de l'acclimatation du manchot Royal au milieu marin. L'absence de puces à ADN spécifiquement dédiées au manchot nous a obligé à utiliser cette technique dans le cadre d'une hybridation hétérologue, nécessitant alors **le développement et la validation d'un nouvel algorithme d'analyse, maxRS**. Il nous a permis de déterminer l'activation ou l'inhibition de réseaux de gènes impliqués dans les grandes voies métaboliques.

1/ **Lors de l'acclimatation du manchot Royal au milieu marin**, nous avons cherché à déterminer comment le manchot est capable de soutenir la forte dépense énergétique générée par son passage dans les eaux froides de la zone sub-antarctique de l'océan indien ; l'hypothèse étant que cette acclimatation passe par une utilisation accrue des substrats lipidiques et glucidiques. En effet, les besoins de thermogenèse et d'activité physique intense semblent en faveur d'une utilisation des lipides (Vaillancourt *et al.* 2005) mais l'activité de plongée de longue durée en apnée, observée chez les manchots adultes, nécessite aussi la présence des voies de glycolyse anaérobie efficaces (Ponganis *et al.* 1997). Par ailleurs, quels sont les mécanismes physiologiques développés par le manchot Royal

juvénile pour assurer sa longévité alors qu'il évolue dans un environnement pro-oxydant ? La limitation de la production de ROS est certainement favorisée pour limiter les contraintes liées à la présence de molécules biologiques endommagées et diminuer le coût énergétique que représenterait leur réparation ou leur dégradation.

Nous nous sommes donc focalisés sur :

- **La mobilisation et l'utilisation des différents substrats énergétiques.** Les voies de la glycolyse, de la β -oxydation et du cycle de Krebs ont particulièrement retenu notre attention, ainsi que l'expression de certains gènes impliqués dans la régulation de ces voies.

- **L'élimination des ROS et la dégradation/réparation des dégâts associés.** Nous avons étudié les familles de gènes permettant l'expression des enzymes anti-oxydantes, des HSP permettant de protéger les molécules biologiques, des sous-unités du protéasome favorisant la dégradation des protéines endommagées, des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN et des protéines. Afin de compléter ces données acquises par des techniques de biologie moléculaire, nous avons mis en œuvre des expérimentations supplémentaires pour évaluer la production de ROS mitochondriale *in vitro*, mesurer les activités anti-oxydantes et estimer la susceptibilité d'oxydation de certaines molécules biologiques. Ceci nous a permis de replacer nos données dans le cadre des théories radicalaires du vieillissement.

2/ **Lors de la croissance du poussin manchot Adélie**, nous avons cherché à déterminer comment l'oiseau est capable d'assurer sa croissance extrêmement rapide (2 mois) dans un environnement thermiquement très défavorable. Assurer la mise en place des mécanismes thermogènes fortement dissipateurs d'énergie, en même temps que sa croissance, représente pour le poussin un défi énergétique qui passe par une stratégie d'activation moléculaire séquentielle que nous avons cherché à décrypter dans le muscle pectoral. Cette approche moléculaire a été complétée par des données plus intégrées, associant la quantification de l'abondance de certaines protéines marqueurs, des études histochimiques et une approche sur l'animal entier par calorimétrie indirecte.

Ces différents travaux montrent la pertinence du modèle manchot pour étudier les véritables compromis énergétiques, la plasticité métabolique ainsi que les mécanismes de régulation qui permettent une allocation d'énergie ciblée sur la fonction physiologique, permettant de répondre aux contraintes imposées à la fois par l'environnement et par la propre biologie de l'animal.

Travail expérimental

1 – Développement d’une méthode d’analyse pour l’utilisation des puces à ADN dans le cadre d’une hybridation hétérologue

Les résultats présentés dans cette partie seront développés dans la publication suivante :

Publication n°1 : Transcriptome analysis in non-model species: a new method for the analysis of heterologous hybridization on microarrays

Cyril Déglétagne*, Céline Keime*, Benjamin Rey, Marc de Dinechin, Fabien Forcheron, Paul Chuchana, Pierre Jouventin, Christian Gautier and Claude Duchamp

* Contributed equally

Publiée dans BMC Genomics

Publication n°1 : Transcriptome analysis in non-model species: a new method for the analysis of heterologous hybridization on microarrays

Analyse du transcriptome d'espèces particulières : une nouvelle méthode d'analyse des données issues d'une hybridation hétérologue sur puce à ADN.

Au cours de ce travail, nous avons voulu mettre en évidence les modifications du transcriptome résultant de l'acclimatation du manchot Royal juvénile au milieu marin. Le premier travail de cette thèse a consisté à développer puis à valider un algorithme nous permettant d'analyser efficacement des résultats issus de l'hybridation d'ARN de manchot Royal sur des puces commerciales (Affymetrix®) de poulet.

Si l'utilisation des puces à ADN a connu un essor impressionnant depuis ces dix dernières années, cette technique reste cantonnée à un nombre restreint d'espèces animales. L'utilisation de cette technique dans des conditions d'hybridation hétérologue pose de nombreux problèmes majoritairement dus aux différences de séquence entre les 2 espèces. Ceci implique une diminution globale de l'intensité de fluorescence, témoin de la qualité d'hybridation des séquences. Celle-ci va altérer les résultats obtenus, tant du point de vue quantitatif (diminution du nombre de gènes détectés comme différentiellement exprimés) que qualitatif (reconnaissance partielle des gènes).

Lors de ce travail, nous avons utilisé la spécificité des puces Affymetrix possédant 11 sondes capables d'identifier chaque gène. L'algorithme MaxRS ainsi réalisé permet d'isoler la sonde semblant avoir la meilleure hybridation pour le gène considéré, et ainsi, selon notre hypothèse, une moindre divergence avec la séquence de manchot correspondante. Les variations d'expression des gènes avant et après le premier passage en mer dans le muscle pectoral de manchot Royal immature ont été caractérisées puis validées par PCR quantitative. Ce travail nous a permis à la fois de créer un algorithme efficace pour l'utilisation des puces à ADN en condition d'hybridation hétérologue mais aussi d'accéder aux variations d'expression de centaines de gènes induits lors de l'acclimatation au milieu marin du manchot Royal.

Transcriptome analysis in non-model species: a new method for the analysis of heterologous hybridization on microarrays

Cyril Dégletagne^{1*}, Céline Keime^{2*}, Benjamin Rey³, Marc de Dinechin^{4,5}, Fabien Forcheron¹, Paul Chuchana^{6,7}, Pierre Jouventin⁴, Christian Gautier² and Claude Duchamp¹

* Contributed equally

1 Université de Lyon, F-69000, Lyon ; Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, UMR 5123 CNRS - Université Lyon 1, 43 Bvd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France

2 Pôle Rhône Alpes de Bioinformatique, Université Lyon 1, Bâtiment Gregor Mendel, 16 rue Raphaël Dubois, 69622 Villeurbanne cedex, France

3 Université de Lyon, F-69000, Lyon ; Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR 5558 CNRS - Université Lyon 1, 43 Bvd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France

4 UMR 5175 Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive - CNRS, 1919 route de Mende 34293 Montpellier CEDEX 5, France

5 UMR 2724 Génétique et Évolution des Maladies Infectieuses - CNRS-IRD, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France

6 CIRAD UMR 17 [UMR 177 IRD-CIRAD], TA A-17/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier CEDEX 5, France

7 U844, 80 avenue Augustin Fliche F-34295 Montpellier, France

Abstract

Background : Recent developments in high-throughput methods of analyzing transcriptomic profiles are promising for many areas of biology, including ecophysiology. However, although commercial microarrays are available for most common laboratory models, transcriptome analysis in non-traditional model species still remains a challenge. Indeed, the signal resulting from heterologous hybridization is low and difficult to interpret because of the weak complementarity between probe and target sequences, especially when no microarray dedicated to a genetically close species is available.

Results : We show here that transcriptome analysis in a species genetically distant from laboratory models is made possible by using MAXRS, a new method of analyzing heterologous hybridization on microarrays. This method takes advantage of the design of several commercial microarrays, with different probes targeting the same transcript. To illustrate and test this method, we analyzed the transcriptome of king penguin pectoralis muscle hybridized to Affymetrix chicken microarrays, two organisms separated by an evolutionary distance of approximately 100 million years. The differential gene expression observed between different physiological situations computed by MAXRS was confirmed by real-time PCR on 10 genes out of 11 tested.

Conclusions : MAXRS appears to be an appropriate method for gene expression analysis under heterologous hybridization conditions.

Background

During the last decade, the use of DNA microarrays has become a key tool in molecular biology. This technology is commonly used for physiological and medical studies to generate snapshots of gene expression patterns in tissues of organisms exposed to different environmental conditions, allowing us to infer regulatory pathways involved in cellular responses to these conditions. The increased prevalence of microarray technology has benefited from the emergence of easily available commercial arrays. However, commercial microarrays target a limited number of species. Moreover, for many non-traditional model organisms, the insufficient amount of sequence data prevents the development of dedicated microarrays. Therefore, a few studies have investigated the use of heterologous array hybridization, [i.e. hybridization on arrays designed for a particular species (hereafter called the reference species) to explore modifications of gene expression patterns of another species (hereafter called the studied species)] and highlighted the difficulties inherent to this approach.

Heterologous hybridization is usually considered a non-standard utilization of microarrays (Bar-Or *et al.* 2007). Indeed, it raises a number of difficulties, essentially due to the sequence divergence between the reference and the studied species (Buckley 2007). A major consequence of heterologous hybridization is a global reduction of hybridization fluorescence signal (Bar-Or *et al.* 2007 and references therein). This reduction artificially decreases the number of differentially expressed genes detected by standard statistical tests, leading to a misrepresentation of the variation in transcriptomic profiles (Bar-Or *et al.* 2007 and references therein). Another issue of heterologous hybridization is cross-hybridization (Bar-Or *et al.* 2006). Indeed, microarrays are designed so that each probe is specific to one transcript sequence in the dedicated species. However, this specificity is not guaranteed when transcripts from another species are hybridized onto the array. On the other hand, the use of heterologous hybridization does not amplify the problem of differentiating paralog expression levels compared to the use of the dedicated platform species.

For all these reasons, the use of heterologous hybridization should be preceded by a careful choice of the type of microarray to use and followed by an appropriate analysis of the results.

To choose the most appropriate microarray to use, one has to select the model organism with the lowest sequence divergence from the studied species (Eddy & Storey 2008). Due to the lack of sufficient sequence data for all studied species, expression profiling results are the most robust when using microarrays dedicated to the reference species with the smallest phylogenetic distance from the studied species (Renn *et al.* 2004).

Once the reference species is chosen, one has to choose the best type of probe to use: either short oligonucleotide probes, such as those on Affymetrix GeneChips[®], or longer probes, such as long

oligomers or even full-length cDNAs. Microarrays with long probes might be less sensitive to sequence mismatches and thus facilitate heterologous hybridization (von Schalburg *et al.* 2005 ; Bar-Or *et al.* 2006 ; Bar-Or *et al.* 2007 ; Buckley 2007). However, most arrays with long probes contain only one probe per transcript. It can be advantageous to use arrays with several short probes targeting the same transcript: the sequence of some probes may be more similar to the orthologous sequence in the species of interest than others. Therefore, one can consider only those the probes that recognize conserved areas of genes between reference and studied species (Khaitovich *et al.* 2004 ; Hammond *et al.* 2005 ; Bar-Or *et al.* 2006). These specific probes can be determined from sequence comparison (Khaitovich *et al.* 2004 ; Bar-Or *et al.* 2006) or experimentally after hybridizing genomic DNA to the microarray (Hammond *et al.* 2005). However, the lack of sufficient sequence data in many species prevents the determination by sequence comparison, and the hybridization of genomic DNA raises the problem of setting the threshold of fluorescence to accept or reject the information provided by a probe (Hammond *et al.* 2005).

In the present study, we were interested in gene expression changes in the pectoralis muscle of juvenile king penguins at a key step of their development, during the transition from terrestrial to marine life. Strictly terrestrial during their first year after hatching, king penguin chicks must then depart to sea to become self-sufficient, and pectoralis muscle is largely involved in penguin adaptation to the marine environment (Talbot *et al.* 2004). We choose the chicken as our reference species, as this is the closest model species for which microarrays are available. Chicken and king penguin are separated by approximately 100 millions years of phylogenetic divergence (Van Tuinen & Hedges 2001). We decided to use Affymetrix GeneChip[®] Chicken Genome Arrays because they present on average 11 different probe pairs per probe set (i.e., a set of perfect-match and mismatch probes targeting one given transcript), which should increase the probability that at least one probe will hybridize with the heterologous transcript. We then developed a new method (MAXRS, for maximum rank sum) to analyze heterologous hybridization transcriptomic profiles. This method takes advantage of the design of Affymetrix microarrays with different probes targeting the same transcript. Statistical analyses were then conducted to identify differentially expressed genes in the pectoralis muscle between never-immersed and sea-acclimated penguins. Finally, we confirmed by quantitative PCR the expression profiles of 10 up- or down-regulated genes exhibiting a wide range of fold changes, out of 11 tested. MAXRS therefore appears to be an appropriate method of gene expression analysis under heterologous hybridization conditions and provides new perspectives in the application of microarray technology to ecological physiology studies.

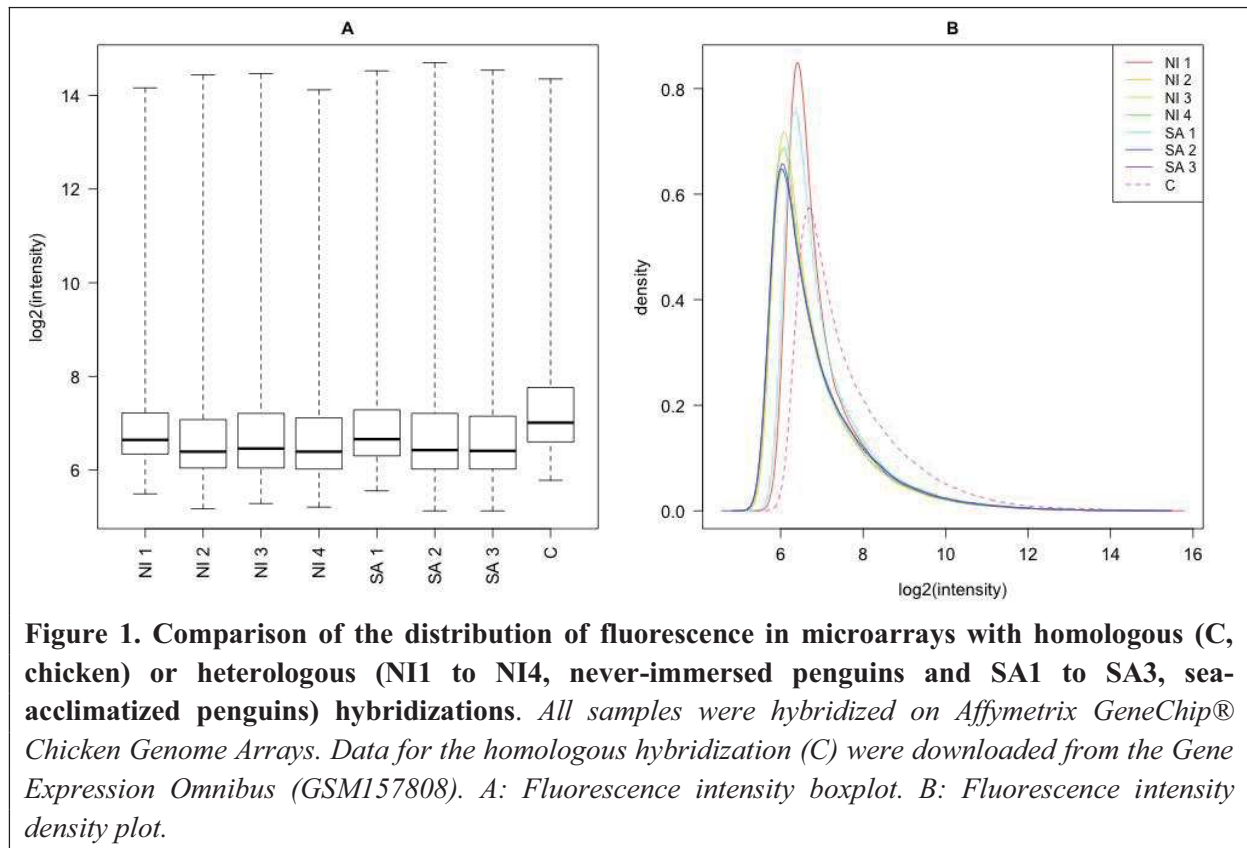
Results and Discussion

Heterologous hybridization

Two sets of juvenile king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) were captured at different degrees of acclimation to marine life. In the first group, four penguins were captured just before they underwent their first immersion in cold sea water (thereafter called NI for never-immersed), while the second group was composed of three penguins that had completely accomplished their acclimation to marine life (thereafter called SA for sea-acclimated). For each of these penguins, an Affymetrix GeneChip® Chicken Genome Array was hybridized with RNA from a pectoralis muscle biopsy.

Global characterization of the fluorescence signal

Figure 1 compares the distribution of signal intensities in our arrays with those on the same type of array hybridized with chicken cRNA. This latest dataset corresponds to public gene expression data downloaded from the Gene Expression Omnibus (GSM157808). The same figure also appears with other public chicken microarray datasets: the fluorescence signal on our arrays hybridized with penguin RNA is relatively low compared with arrays hybridized with chicken RNA, as expected. Thus, the mean fluorescence intensity is lower in heterologous than in homologous hybridization, as previously documented in Bar-Or *et al.* 2006, Bar-Or *et al.* 2007 and Renn *et al.* 2004 for other species.



This probably results from the sequence divergence between chicken and penguins, that diverged approximately 100 Myr ago (Van Tuinen & Hedges 2001). Very few penguin sequences have already been published, but the comparison of these sequences with the orthologous chicken sequences gave us a first estimation of the sequence divergence between these two species: we found between 89.4% and 91.7% identity between these sequences (see **Additional file 1**).

Additional file 1. Penguin and chicken orthologous sequences. GenBank accession numbers of penguin sequences together with the accession numbers of their orthologous chicken sequences, the corresponding Hovergen family identification number and the percent identity between each pair of sequences.

After these general considerations, we will describe the method we designed to analyze our heterologous hybridization data (we will hereafter only consider these data in our analysis).

Characterization of the probes with fluorescence intensity above background

To determine which probe signal was sufficient to be exploited as a measure of gene expression, we considered the intensities of the spots located in the region of the array without any probe as a measure of the background intensity distribution. Only 40% of the spots corresponding to perfect match probes had fluorescence intensity above the 95th percentile of the background intensity distribution (hereafter called the background level). As the global fluorescence signal intensity was low, we did not take into account the mismatch probes in our analysis. Therefore, we further call a probe set the collection of perfect-match probes targeting one given transcript, and the perfect-match probes will hereafter be referred to as probes. Additionally, we considered only the probes with a fluorescence intensity above the background level in at least one of the microarrays analyzed (this corresponded to 171,384 probes belonging to 36,897 probe sets).

We took advantage of the design of Affymetrix arrays, with, on average, 11 probes per probe set and compared the fluorescence intensity of all probes belonging to the same probe set. For most of the probe sets, at least one probe had a relatively high signal: we found that 96% of the probe sets had at least one corresponding probe with a signal above the background level (corresponding to 36,897 out of the 38,536 probe sets of the array). Moreover, if we ranked probes belonging to a given probe set according to their fluorescence intensity, these rankings were similar among slides for the vast majority (94%) of the probe sets (Friedman p-value < 0.05). For a given probe set, the same probe had the greatest fluorescence intensity in the majority of arrays (**Figure 2**). We denote $p = 1..P$ the different probes belonging to a given probe set, $m = 1..M$ the microarrays analyzed and

$RS_{tp} = \sum_{m=1}^M r_{mtp}$ the rank sum of a probe p from a probe set t in all microarrays analyzed. This figure

represents the distribution of $\frac{\max_{p=1..P} RS_{tp}}{P_t}$ for all probe sets. If, for a given probe set, the same probe has the highest fluorescence intensity in all seven microarrays considered, we expect that

$\frac{\max_{p=1..P} RS_{tp}}{P_t} = 7$. This figure therefore indicates that heterologous hybridizations are highly reproducible, even if the microarray is dedicated to a phylogenetically distant species. These observations led us to develop the MAXRS method.

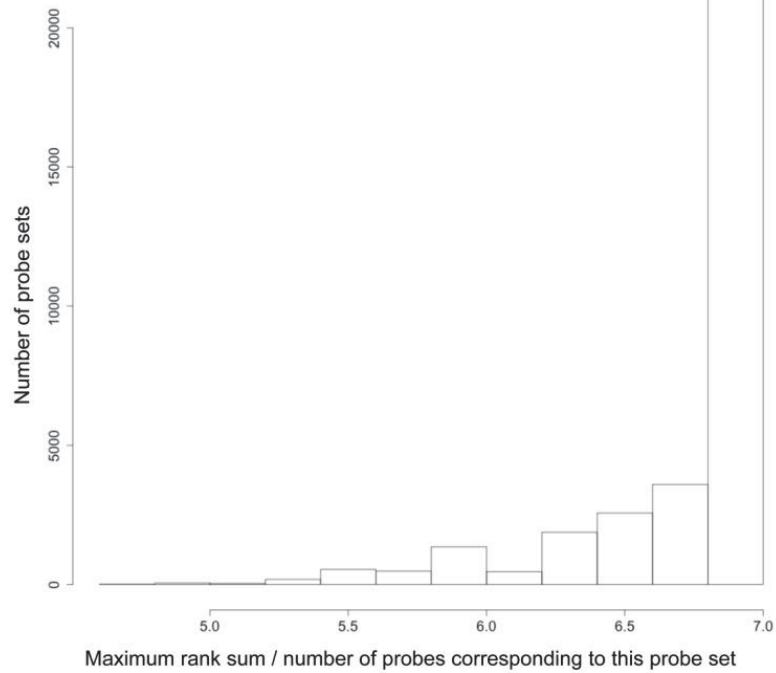


Figure 2. For a given probe set, the same probe had the largest fluorescence intensity in the majority of arrays. This figure represents the distribution of the maximum rank sum of the probes in each probe set divided by the number of probes corresponding to this probe set. If, for a given probe set, the same probe had the highest fluorescence intensity in all 7 microarrays considered here, we expected that this maximum rank sum divided by the number of probes would equal 7.

The maximum rank sum (MAXRS) method

This method is based on the observation that for the majority of the probe sets, the same probe had the highest fluorescence intensity in almost all arrays. We therefore hypothesized that among the different probes belonging to a probe set, the one with the greatest intensity should target the most conserved region between chicken and penguin mRNA. This probe should be the most appropriate to study the expression level of the penguin gene. Therefore, the MAXRS method consists in determining the probe with the highest fluorescence intensity in most microarrays. More precisely:

1. For each microarray $m = 1..M$ and for each probe set $t = 1..T$, we sort the fluorescence intensity values on microarray m of all probes $p = 1..P_t$ belonging to the probe set t in increasing order. We denote by r_{mtp} these ranks.

2. For each probe set $t = 1..T$ and for each probe $p = 1..P_t$ belonging to the probe set t , we

$$RS_{tp} = \sum_{m=1}^M r_{mtp}$$

calculate the rank sum of this probe in all microarrays:

3. For each probe set $t = 1..T$, we keep the probe p with the highest $RStp$. If several probes have the same $RStp$ and this is the highest one, we keep the probe with the highest mean fluorescence intensity on all microarrays. The intensity of the selected probe on all microarrays is therefore used as an estimator of the expression of the gene represented by the probe set t .

We then normalized the data to make them comparable across microarrays and searched for differentially expressed genes by using the empirical Bayes moderated t-statistics proposed by Smyth (2004). We then used the method proposed by Benjamini and Hochberg (1995) to ensure a false discovery rate of 10%. This led us to identify 240 significantly up-regulated and 154 down-regulated genes in pectoralis muscle of penguin juveniles after their acclimation to marine life (**Figure 3**).

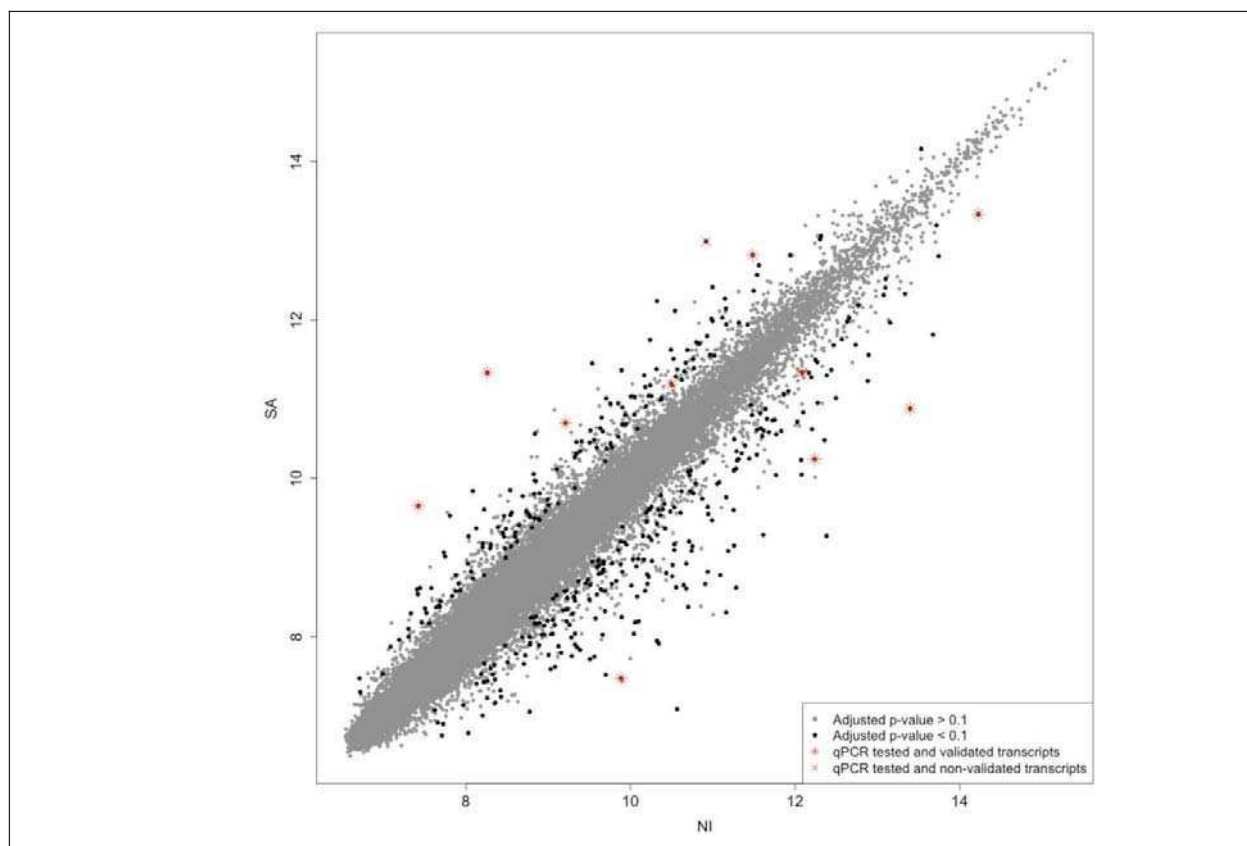


Figure 3. Scatter plot comparing gene expression between penguins before (NI) and after sea acclimation (SA). Each point represents the mean expression level of a gene in NI and SA conditions. Black dots represent differentially expressed genes between both situations. Red symbols represent the differentially expressed genes tested by qPCR: red stars correspond to the validated genes and red crosses to non-validated ones.

We finally compared the results of the MAXRS method with results obtained by the Affymetrix software GCOS (GeneChip Operating Software). For this purpose, we applied the statistical test described above to the data obtained by GCOS. This resulted in the identification of 40 significantly up-regulated and 21 down-regulated genes.

Validation of the differentially expressed genes

We first quantified by quantitative PCR (qPCR) the relative expression levels of significantly differentially expressed genes from the MAXRS method, exhibiting various gene expression levels and fold changes (see **Figure 3** ; the fold change of the selected genes varied from 1.6 to 8.4). For 10 out of 11 tested genes, qPCR confirmed the microarray results concerning the direction of gene expression variation, even for weak gene expression changes (**Figure 4**). As we do not know the penguin sequence of these mRNA, the qPCR primers were designed against chicken mRNA sequences. However, we confirmed those variations using penguin-specific primers we designed for six mRNA sequences that we sequenced (see **Additional file 2**). For the validated genes, the fold change assessed by qPCR was not always the same as assessed by the microarrays, and the change was more often higher with qPCR than with microarrays, as previously described for homologous hybridization (Irizarry *et al.* 2005 ; Shi *et al.* 2006b).

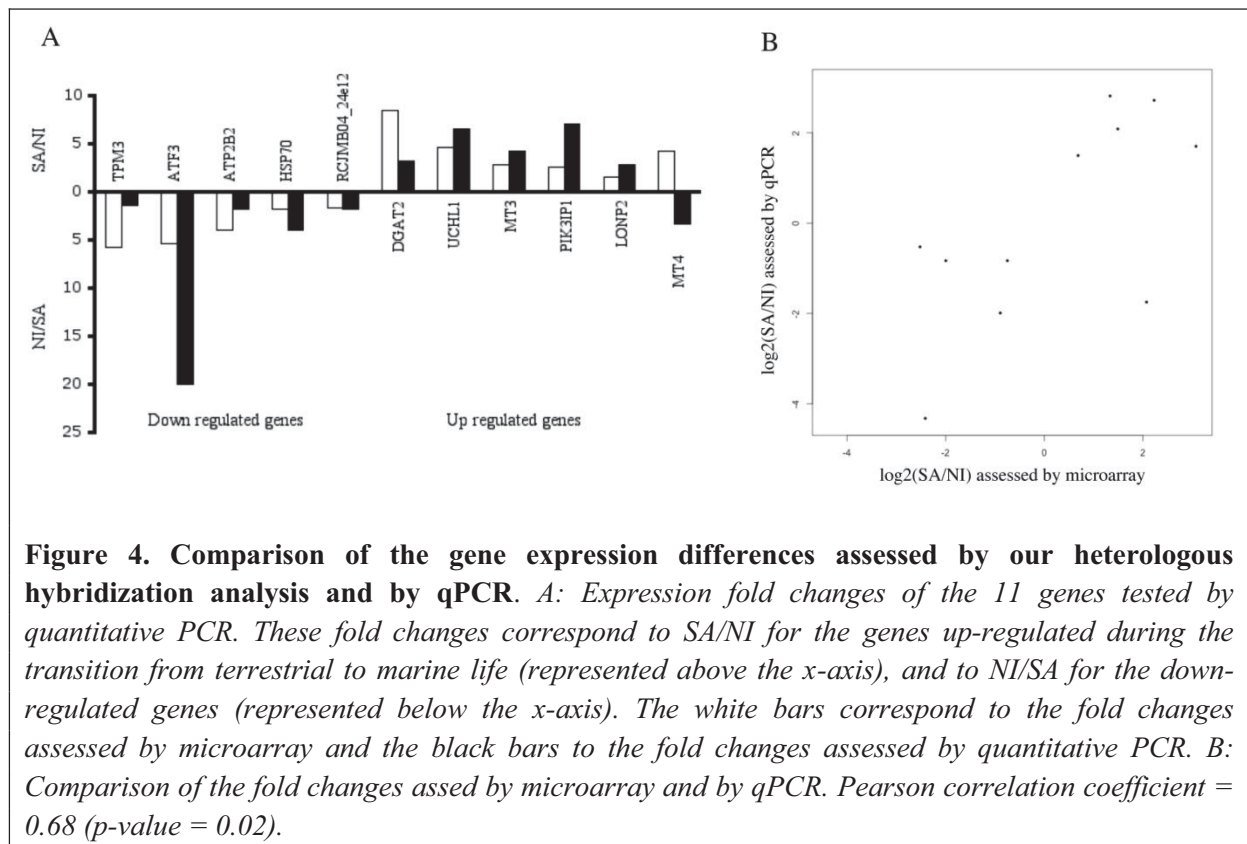


Figure 4. Comparison of the gene expression differences assessed by our heterologous hybridization analysis and by qPCR. *A: Expression fold changes of the 11 genes tested by quantitative PCR. These fold changes correspond to SA/NI for the genes up-regulated during the transition from terrestrial to marine life (represented above the x-axis), and to NI/SA for the down-regulated genes (represented below the x-axis). The white bars correspond to the fold changes assessed by microarray and the black bars to the fold changes assessed by quantitative PCR. B: Comparison of the fold changes assessed by microarray and by qPCR. Pearson correlation coefficient = 0.68 (p-value = 0.02).*

Additional file 2. Comparison of the gene expression differences between qPCR using primers designed against chicken and against penguin transcript sequences. *Expression fold changes of the six genes tested by quantitative PCR using primers designed against chicken (black bars) vs. penguin sequences (gray bars). These fold changes correspond to SA/NI for the genes up-regulated during the transition from terrestrial to marine life (represented above the x-axis) and to NI/SA for the down-regulated genes (represented below the x-axis).*

We then quantified by qPCR the relative expression levels of several significantly differentially expressed genes from the GCOS Affymetrix method. The direction of gene expression variation was confirmed for four out of six tested genes (see **Additional file 3**). Considering this rate of validation and the small number of differentially expressed genes from GCOS, our method seems to be more sensitive and more specific than GCOS. Actually, the GCOS algorithm used the 11 probe pairs (perfect-match and mismatch probes) of each probe set to evaluate the expression of each gene. Considering cross-hybridization and the effect of sequence divergence, the use of GCOS is clearly not suitable for heterologous hybridization analyses.

Additional file 3. Comparison of the gene expression differences assessed by GCOS analysis and by qPCR. *Expression fold changes of the six differentially expressed genes determined with GCOS and with qPCR. These fold changes correspond to SA/NI for the genes up-regulated during the transition from terrestrial to marine life (represented above the x-axis) and to NI/SA for the down-regulated genes (represented below the x-axis). The white bars correspond to the fold changes assessed by microarray and analyzed with GCOS, and the black bars correspond to the fold changes assessed by quantitative PCR.*

The differentially expressed genes from MAXRS allowed us to highlight the onset of biologically meaningful physiological pathways. Indeed, using the Gene Ontology annotations of differentially expressed genes, we highlighted differentially expressed genes implicated in energy metabolism or involved in cellular defenses against reactive oxygen species and associated injuries (Dégletagne *et al.* 2009). The use of this tool could therefore offer a new perspective to elucidate the remarkable adaptation of penguins to their environment.

The MAXRS method enabled us to extract biological information even though the global fluorescence intensity signal on our microarrays was low. Candidate genes were highlighted, and the direction of expression variation of 90% of these genes was confirmed by qPCR. This shows that gene expression analysis in species genetically distant from model organisms is possible with heterologous hybridization and an appropriate analysis method. As there are very few transcript sequences available in the penguin, we could not quantify the extent to which our results were affected by cross-

hybridization. For this reason, we consider heterologous hybridization as a first step of gene expression analysis, a step that allows us to highlight candidate genes that must be validated by another, complementary method. However, the high rate of validation of our results by qPCR is promising and shows that, even if cross-hybridization should affect our results, this effect should be slight. This method could be useful to analyze microarray results for species highly diverged from the reference species and for those without any sequence data, such as models used in ecophysiology. Finally, we think that this approach is still relevant despite the recent development of next-generation sequencing technologies and RNA-Seq. Indeed, without any reference genome, the RNA-Seq data must be *de novo* assembled, and this is a difficult challenge, as the level of coverage varies greatly between transcripts with different expression levels (Pepke *et al.* 2009).

Conclusions

We present MAXRS, a new method to analyze heterologous hybridization on microarrays. This method enabled us to analyze the transcriptome of king penguin by using microarrays dedicated to the chicken. Despite the large phylogenetic distance between these two bird species, we identified differentially expressed genes in the pectoralis muscle of king penguin during the transition from terrestrial to marine life, and we confirmed 90% of the tested gene variations by quantitative PCR. These results are promising for the use of microarray technology in species genetically distant from laboratory models. It will be valuable to transfer this technology to biological fields dealing with non-traditional model organisms, like ecological physiology.

Methods

Assessment of sequence divergence between penguin and chicken

For this purpose, we used all *Aptenodytes patagonicus* mRNA sequences available in GenBank. For each of these sequences, we identified the most similar gene family in the Hovergen homologous gene families database (Duret *et al.* 1999). We then replaced the penguin sequence in the phylogenetic tree of the family, which allowed us to identify the putatively orthologous chicken sequence, if available. This analysis was performed with HoSeqI (Arigon *et al.* 2006). We then aligned the penguin and chicken sequences by using the water EMBOSS tool (Emboss). The GenBank accession number of penguin sequences, the accession number of their orthologous chicken sequences,

the corresponding Hovergen family identification number and the percent identity between each pair of sequences are available in **Additional file 1**.

Animals

Penguin muscle samples were collected at the Crozet archipelago (French Southern Territories) during the austral summer (December 2005 to March 2006), following the ethical recommendations granted by the Ethics Committee of the French Polar Research Institute (IPEV) and by the French Ministry of Environment.

Two sets of juvenile king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) were captured according to their degree of acclimation to marine life. In the first group, four penguins were captured just before they underwent their first immersion to cold sea water (called NI for never-immersed), while the second group was composed of three penguins that had completely accomplished their acclimation to marine life (called SA for sea-acclimated). Penguins were anesthetized by isoflurane inhalation, and approximately 100 mg of pectoralis muscle was surgically excised, frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until molecular analysis. At the end of the experiment, birds were monitored for a few days and then released at the site of their capture.

Microarray analysis

Total RNA was extracted using the TriReagent procedure (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) following the manufacturer's instructions. The quality of extracted RNA was assessed using a Bioanalyzer 2100 (Agilent technologies, Inc, Palo Alto, CA, USA). RNA integrity numbers of all samples were greater than 8.

Labeling and hybridization were performed following the Affymetrix protocol (Affymetrix) using the ProfileXpert platform (Lyon, France) on Affymetrix GeneChip® Chicken Genome Arrays.

Heterologous hybridization analysis

The MAXRS method we developed for the analysis of heterologous hybridization profiles is described in the Results section.

After using the MAXRS method, results among microarrays were normalized using the quantile method (Bolstad *et al.* 2003), and the test for differential expression between the two conditions was performed with the empirical Bayes moderated t-statistics implemented in the Bioconductor package limma (Smyth 2004). The resulting p-values were then adjusted for multiple testing by using the Benjamini and Hochberg method (Benjamini & Hochberg 1995) implemented in the Bioconductor package multtest. All analyses were done using the R statistical software.

The raw and processed microarray data are available in the Gene Expression Omnibus (Omnibus). For each probe set, the mean intensity value of each probe with an intensity above background and its rank are available in **Additional file 4**.

Additional file 4. Mean intensity value and rank of each probe with an intensity above background. *This file provides, for each Affymetrix probe above background, the mean intensity value and rank.*

Validation of microarray data analysis using real-time PCR

Quantitative PCR was performed using the same RNA samples to test the accuracy of our analysis. For each sample, 1 µg of total RNA was converted into double-stranded cDNA using 200 U of RT-MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 100 ng of random primers, 1 mM deoxyribonucleotides and 40 U RNase inhibitor, according to the manufacturer's instructions. Then, real-time PCR was performed in a MyiQ thermal cycler (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) using IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). We designed primers specific to the chicken sequence recognized by the microarray for 15 genes (see **Additional file 5**) using the information available on the NetAffx website (Site internet Affymetrix) and Primer3 software (Rozen & Skaletsky 2000). To confirm our results with penguin-specific primers, we sequenced the PCR products, designed primers specific to the penguin sequences (see **Additional file 5**) and performed qPCR using these new primers.

Additional file 5. Primer sequences used for qPCR. *This file provides, for each tested gene, the corresponding Affymetrix probe set ID, the primer sequences used for qPCR and the fold changes and p-values from the microarray and qPCR.*

We used the following qPCR conditions: 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation for 10 s at 95°C and annealing/extension for 45 s at 60°C, according to the manufacturer's instructions. All samples were run in duplicate along with dilutions of known amounts of target sequence to quantify the initial cDNA copy number (Concentration = Efficiency Δ Ct). The results are expressed as the ratio of the target gene over 18 S rRNA concentration (ng/ μ g) [which was verified to exhibit non-significant variation between the two groups of cDNAs using REST 2009 software ($0.29 < p < 0.70$)] (Pfaffl *et al.* 2002).

Authors' contributions

CDE and BR carried out all the experiments of this study. CK designed and implemented the MAXRS method. FF helped establish the qPCR quantification. CG, MD and PC provided helpful comments regarding this study and the manuscript. PJ provided facilities and technical support for the field experiments. CDE, CK and BR wrote the manuscript, and CG, CDU and MD corrected it. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was funded by a grant from the French Polar Institute (IPEV, program 131, C. Duchamp and program 354, P. Jouventin) with financial support provided by DDE-CNRS (Zone Atelier Antarctique). The authors thank Prof. J. Lachuer (ProfilExpert, Lyon) for technical assistance on microarray hybridization and Prof. G. Bricca (ERI22, Lyon) for the utilization of quantitative PCR equipment. The manuscript has been edited for proper English language at American Journal Experts.

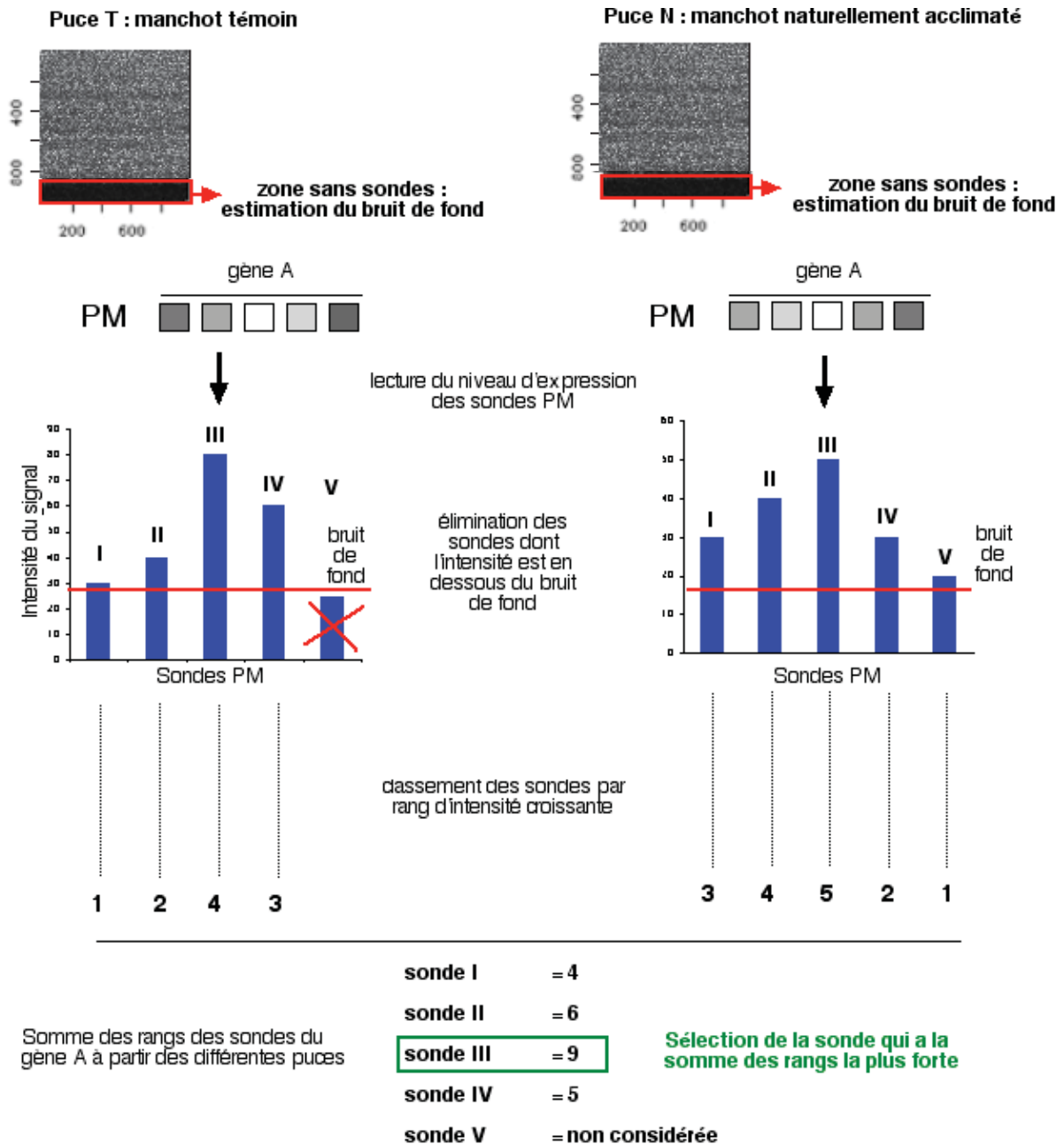
Principaux résultats présentés dans la publication 1

Au sein d'un Probe Set (ciblant un gène spécifique), nous observons que l'intensité maximale de fluorescence est majoritairement mesurée sur une sonde spécifique

Après hybridation des ARNc de manchots sur la puce à ADN de poulet, nous avons vérifié si les variations d'intensité de fluorescence entre les sondes reconnaissant un même gène étaient aléatoires ou non. Pour chaque gène, nous avons classé les sondes par ordre croissant de fluorescence et vérifié si cet ordre était retrouvé chez les différentes puces réalisées. Nous avons alors établi que, pour 94% des sondes, le classement des sondes n'est pas aléatoire (Test de Friedman, $p < 0,05$). Nous avons aussi établi qu'au sein d'un *Probe Set*, c'est toujours la même sonde qui possède la fluorescence maximale (**Figure 2**). Il est légitime de supposer que les variations de fluorescence entre les sondes au sein d'un même *Probe Set* peuvent s'expliquer par une différence d'hybridation de celles-ci avec l'ARNc, probablement due à une différence d'homologie de séquence.

Création de l'algorithme d'analyse maxRS

Dans le but de se rapprocher au maximum des conditions classiques d'utilisation des puces à ADN, notre algorithme *maxRS* détecte la sonde qui possède constamment, au sein de chaque *Probe Set*, la fluorescence maximale (et donc la somme des rangs maximale), indice d'une moindre divergence entre les séquences de poulet et de manchot. La valeur de fluorescence de cette sonde est utilisée comme index du niveau d'expression du gène considéré, et permet de déterminer statistiquement si son expression est modifiée entre différentes situations physiologiques (**Figure 26**).



POUR LE GENE A, ON UTILISE LA VALEUR D'INTENSITE DE LA SONDE III SUR TOUTES LES PUCES

Figure 26 : Schéma explicatif de l'algorithme maxRS

Validation par PCR quantitative des résultats obtenus grâce à l'algorithme maxRS

Nous avons confronté les résultats obtenus pour 11 gènes différentiellement exprimés selon notre analyse par puces à ADN à ceux mesurés par une autre méthode, plus fiable, utilisée pour

estimer les variations d'expression de gènes, la PCR quantitative. Pour 10 de ces gènes, nous avons obtenus des profils d'expression similaires avec les deux approches.

Résultats complémentaires

Divergence de séquence vs intensité de fluorescence mesurée

L'hybridation des ARNc sur les sondes dépend de différents paramètres, semblables à ceux pris en compte lors du choix d'amorces pour la réalisation d'une PCR : la complémentarité entre sondes et cibles, la zone ciblée qui doit être spécifique, la température d'hybridation, le pourcentage de G et C, l'absence de 3 bases consécutives identiques, les structures secondaires des sondes ou des ARNc, la position de la/les mutation(s) si elle(s) existe(nt) (Reymond 2004). Si la majorité de ces paramètres sont déjà contrôlés lors de la création des puces afin d'optimiser l'hybridation en homologue, la présence de mutations semble expliquer les problèmes d'hybridations en conditions hétérologues, se traduisant par une diminution de la fluorescence, comme l'illustre l'exemple ci-dessous (**Figure 27**). Le nombre seul de mutations ne permet pas de prédire l'intensité de fluorescence car la qualité de l'hybridation dépend aussi de la place des mutations et des types de bases impliquées.

```
Manchot :      5' -ACATTGACAAACAGAATGAAGTGAAGTTCACACTGTTGTCCTCAACCCGACA-3'
                ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sonde poulet 2:      GAAGTGAAGTTCACACTGTTGTC
```

Fluorescence moyenne de la sonde 2 = 503

```
Manchot :      5' -ACATTGACAAACAGAATGAAGTGAAGTTCACACTGTTGTCCTCAACCCGACA-3'
                ||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sonde poulet 3:      CAGGATGAAGTGAAGTTCACACTG
```

Fluorescence moyenne de la sonde 3 = 278

Figure 27 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction de l'homologie de séquence entre la sonde et la cible. Nous avons relevé pour le gène *UCHL1*, reconnu par le Probe Set Affymetrix *Gga.9618.1.S1_at*, l'intensité de fluorescence de différentes sondes s'hybridant aux abords d'une même zone de l'ARNm. Nous observons que la fluorescence moyenne des sondes est influencée entre autre par la présence de mutation sur la séquence cible (ici, la sonde 3, qui possède une mutation en position 4, a une fluorescence moyenne inférieure à la sonde 2, qui s'hybride parfaitement avec la séquence cible).

Les conditions d'hybridations hétérologues n'augmentent pas l'hybridation croisée

Dans le cadre de cette utilisation particulière des puces à ADN, une interrogation concernant l'annotation des gènes subsiste. En effet, l'efficacité de cette approche est basée sur le postulat que la divergence de séquence entre les gènes est supérieure à la divergence entre séquences homologues des deux espèces. Si ce postulat est faux, l'altération de la spécificité des sondes pour les séquences nucléotidiques de manchot pourrait induire une augmentation de l'hybridation croisée. Aucune des expérimentations utilisant cette technique d'hybridation hétérologue n'a mis en évidence un accroissement de l'hybridation croisée (Bar-Or *et al.* 2006 ; Bar-Or *et al.* 2007), comme en attestent les séquençages réalisés dans le cadre de l'article 1 (**Table 3**). Nous pouvons être relativement sereins concernant l'annotation des gènes différenciellement exprimés.

<i>Référence Affymetrix</i>	<i>Nom du gène</i>	<i>Référence GenBank poulet</i>	<i>% d'homologie avec le manchot</i>
Gga.1759.1.S1_at	PIK3IP1 ou HGFL gene	XM_415257	90%
GgaAffx.3001.1.S1_at	ATP2B2	XM_001231767	97%
Gga.17638.1.S1_at	ATF3	XM_419429	94%
Gga.4555.1.S1_a_at	HSPA8	NM_205003	92%
Gga.1383.1.S1_at	ENO1	NM_205120	97%
GgaAffx.22808.1.S1_at	DGAT2	XM_419374	96%
Gga.9618.1.S1_at	UCHL1	NM_001080212	95%
GgaAffx.9262.1.S1_at	MT3	NM_001097538	97%
Gga.12947.1.S1_s_at	LONP2	NM_001199220	96%
Gga.4210.1.S1_at	MT4	NM_205275	93%

Table 3 : Pour chacun des gènes amplifiés par qPCR et séquencés, l'alignement des séquences manchots sur les bases de données de nucléotides (BLAST) a toujours identifié leurs homologues « poulet » comme séquence la plus proche. Pour le gène TPM3, l'absence de résultat est dû à un problème lors du séquençage.

L'utilisation des résultats des puces à ADN sans correction de Benjamini et Hochberg est valable

Classiquement, l'utilisation des puces à ADN requiert une correction de Benjamini et Hochberg (1995), après le test de Smyth (2004), afin de diminuer le nombre de faux positifs. Dans

notre cas d'hybridation hétérologue, l'application de ce test statistique réduit drastiquement (facteur 10) le nombre de gènes sélectionnés comme différentiellement exprimés. Cette réduction s'ajoute à celle due à l'hybridation hétérologue. Nous avons voulu voir si les résultats obtenus par puces à ADN (sans l'application de la correction) étaient valables en les comparant aux résultats issus d'une approche par PCR quantitative (**Table 4**). Nous avons choisi des gènes dont la valeur de p était proche de 5% et qui n'étaient pas sélectionnés par la correction. Pour la majorité des gènes (10 sur 11), les résultats des puces à ADN sont confirmés, à savoir que le sens de variation d'expression de ces gènes mesuré par la méthode de puce à ADN entre nos 2 situations biologiques est retrouvé par la technique de PCR quantitative.

Symbole	Affymetrix Probe Set ID	<i>PCR quantitative</i>		<i>Puce à ADN</i>	
		Variation (SA/NI)	P value (test de Man Whitney)	Variation (SA/NI)	P value (test de Smyth)
CSP	GgaAffx.25406.2.S1_s_at	82%	p<0,05	24%	0,047
HIF1AN	Gga.7739.1.S1_at	228%	p<0,05	38%	0,02
SLC27A1	GgaAffx.8475.2.S1_s_at	48%	p<0,05	56%	0,01
SLC2A3	Gga.871.1.S1_at	-95%	p<0,05	-21%	0,04
GHR	Gga.4329.1.S1_at	-81%	0,07	-33%	0,047
JNK	GgaAffx.3808.1.S1_at	198%	p<0,05	30%	0,04
FAT3	Gga.1950.1.S1_at	269%	p<0,05	-22%	0,02
OSR	Gga.1135.1.S1_at	268%	0,22	40%	0,01
T3RB	Gga.699.1.S1_at	990%	p<0,05	56%	0,01
GPI	GgaAffx.20134.1.S1_s_at	-47%	0,27	-31%	0,01
enolase	GgaAffx.12833.1.S1_s_at	-44%	p<0,05	-43%	0,00

Table 4 : Mesure de la variation d'expression de 11 gènes grâce aux technologies de puces à ADN et PCR quantitative entre les manchots NI et SA. Les PCR quantitatives ont été réalisées avec les mêmes ARN que ceux utilisés pour les puces à ADN, représentant un faible effectif (n=4 pour les NI et n=3 pour les SA). Ceci explique certaines valeurs de p obtenus par PCR quantitative.

2 – Réponses physiologiques développées par le manchot Royal immature lors de son passage du milieu terrestre au milieu marin.

Les résultats présentés dans cette partie seront développés dans les publications suivantes :

Publication n°2 : Selective upregulation of lipid metabolism in skeletal muscle of foraging juvenile king penguins, an integrative study

Loïc Teulier*, Cyril Dégletagne*, Benjamin Rey, Jérémy Tornos, Céline Keime, Marc de Dinechin, Mireille Raccurt, Jean-Louis Rouanet, Damien Roussel and Claude Duchamp

* Contributed equally

Acceptée pour publication dans Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences

Publication n°3 : Physiological response of king penguins to oxidative challenge of living at sea

Benjamin Rey, Cyril Dégletagne, Damien Roussel, Jacques Bodennec, Jean-Louis Rouanet, Jeremy Tornos, Loïc Teulier, Mireille Raccurt, and Claude Duchamp

En préparation

Publication n°2 : Selective upregulation of lipid metabolism in skeletal muscle of foraging juvenile king penguins, an integrative study

Augmentation sélective du métabolisme lipidique dans le muscle squelettique de manchots Royaux juvéniles acclimatés au milieu marin, une étude intégrative.

L'acclimatation au milieu marin induit-elle une modification profonde du métabolisme énergétique chez le manchot Royal juvénile?

Partant des résultats issus des puces à ADN réalisés sur les manchots Royaux juvéniles avant et après leur premier passage à la vie marine, nous avons voulu étudier l'impact de ce changement sur le métabolisme de l'animal.

Cette transition entre 2 environnements (terrestre vs marin), aux contraintes complètement différentes, est connue pour accroître considérablement le métabolisme, du fait du coût important de la thermogénèse (Barré & Roussel 1986) et de l'activité locomotrice due aux voyages alimentaires de plusieurs centaines de kilomètres (Handrich *et al.* 1997 ; Charrassin & Bost 2001). Par analogie avec les oiseaux migrateurs, nous pouvons supposer que l'exposition au froid et le développement d'une activité musculaire intense et endurante sera principalement soutenue par l'oxydation des substrats lipidiques (Bénistant *et al.* 1998 ; Guglielmo *et al.* 2002 ; Vaillancourt *et al.* 2005 ; Weber 2009). Cependant, le comportement alimentaire du manchot l'oblige à réaliser des plongées longues et répétées en apnée, favorisant la production de lactate, produit final de la glycolyse anaérobie (Ponganis *et al.* 1997).

Au cours de ce travail, nous avons cherché à déterminer la stratégie métabolique utilisée par cet oiseau pour surmonter les contraintes énergétiques antagonistes générées par sa vie en milieu marin. Pour cela, nous avons utilisé une approche intégrative, incluant des données d'expression génique par puce à ADN et PCR quantitative, que nous avons complétée grâce à des approches biochimiques (activités enzymatiques, respirations mitochondriales) et sur l'animal entier (thermochimie respiratoire). L'approche à large échelle que représentent les puces à ADN nous a permis de rechercher certaines voies cellulaires impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique de cet oiseau.

Selective upregulation of lipid metabolism in skeletal muscle of foraging juvenile king penguins, an integrative study

By

Loïc Teulier^{1*}, Cyril Dégletagne^{1*}, Benjamin Rey², Jérémy Tornos¹, Céline Keime³, Marc de Dinechin⁴, Mireille Raccurt¹, Jean-Louis Rouanet¹, Damien Roussel¹ and Claude Duchamp¹

* equal contribution to the work

(1) Université de Lyon, Lyon, F69003, France ; Université Lyon 1, Villeurbanne, F69622, France ; ENTPE, Vaulx en Velin, F69518, France ; CNRS, UMR5023 Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Villeurbanne, F-69622, France.

(2) Université de Lyon, Lyon, F69003, France ; Université Lyon 1, Villeurbanne, F69622, France ; CNRS, UMR 5558 Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, Villeurbanne F-69622, France

(3) Institute of Genetics, Molecular and Cellular Biology, 1, rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch Cedex, France

(4) UMR 5175 Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive – CNRS, 1919 Route de Mende, F-34293 Montpellier CEDEX 5, France.

Major Classification: Biological Sciences - **Minor Classification:** Physiology

Running head: Fuel selection in foraging king penguin juveniles

Key words: in vivo, mitochondria, energy substrates, transcriptomic analysis

Corresponding Author : Pr C. Duchamp, Université de Lyon, CNRS, UMR5023 Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, 43 bld 11 novembre 1918, Villeurbanne, F-69622, France. Tel : 00 33 4 7244 8138 - fax : 00 33 4 7243 1172 - email : claudeduchamp@univ-lyon1.fr

Abstract

The passage from shore to marine life of juvenile penguins represents a major energetic challenge to fuel intense and prolonged demands for thermoregulation and locomotion. Some functional changes developed at this crucial step were investigated by comparing pre-fledging king penguin with sea-acclimatized (SA) juveniles (*Aptenodytes patagonicus*). Transcriptomic analysis of pectoralis muscle biopsies revealed that most genes encoding proteins involved in lipid transport or catabolism were up-regulated while genes involved in carbohydrate metabolism were mostly down-regulated in SA birds. Determination of muscle enzymatic activities showed no changes in enzymes involved in glycolytic pathway but an increased 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, an enzyme of the β -oxidation pathway. The respiratory rates of isolated muscle mitochondria were much higher with a substrate arising from lipid metabolism (palmitoyl-L-carnitine) in SA juveniles than in terrestrial controls while no difference emerged with a substrate arising from carbohydrate metabolism (pyruvate). In vivo, perfusion of a lipid emulsion induced a four-fold larger thermogenic effect in SA than in control juveniles. Present integrative study shows that fuel selection towards lipid oxidation characterize penguin acclimatization to marine life. Such acclimatization may involve thyroid hormones through their nuclear beta receptor and nuclear coactivators.

Introduction

Survival of endotherms in cold water is limited by the tremendous energetic challenge imposed by heat losses in water, a fluid carrying heat away from the body 25 times faster than air of the same temperature. While human survival is estimated within the range of minutes of immersion into cold water at temperature a few degrees above zero (Ducharme & Lounsbury 2007), some endothermic species, such as adult king penguins (*Aptenodytes patagonicus*), spend most of their living time foraging in cold circumpolar oceans (Charrassin & Bost 2001 ; Pütz 2002). Such capacity to withstand a prolonged energetic challenge depends on penguin ability to reduce heat losses and sustain high levels of heat production for long periods. However the mechanisms enabling the development of such metabolic capacity when penguin juveniles depart to sea are unknown.

As marine birds, king penguins breed in huge colonies located on sub-antarctic islands. At the end of their extended post-hatching development period lasting 12-14 months (Cherel *et al.* 2004), terrestrial chicks molt to lose their thick down and acquire tight waterproof feathers. Molting represents a key step before immature penguins face the intensive and prolonged energetic demand imposed by the passage from shore to marine life to reach nutritional emancipation (Corbel *et al.* 2008). At sea, the increased internal insulation allowed by a powerful peripheral vasoconstriction and the low oxygen consumption associated with a reduction in body temperature during diving bouts would reduce the daily metabolic cost of thermoregulation (Dumonteil *et al.* 1994 ; Handrich *et al.* 1997 ; Williams *et al.* 2011). Yet, daily field metabolic rates of penguins are on average 3 to 4 times the basal metabolic rate (Kooyman *et al.* 1982 ; Nagy *et al.* 2001), and immersions into moderately cold water (10°C) induce a 2-3 fold increase in energy expenditure (Stahel & Nicol 1988 ; Barré & Roussel 1986 ; Dumonteil *et al.* 1994). In line, adaptive thermal responses were described in several penguin species after repeated immersions into cold water with a progressive increase in thermogenic capacity after acclimatization to marine life (Barré & Roussel 1986 ; Dumonteil *et al.* 1994). However no studies investigated the metabolic basis of such acclimatization to marine life that fuels the sustained energy expenditure imposed by prolonged immersion into cold sea water.

Cold is not the only energetic challenge encountered by penguins. King penguins are known to forage as far as the polar front or the ice edge area, 300-1600 km away from their colony, according to seasonal changes in local prey availability (Bost *et al.* 1997 ; Charrassin & Bost 2001). Such tremendous and sustained exercise may further enhance the cooling power of water by increasing convective heat losses. In birds, prolonged and energetically very demanding exercise occurring during flight migration is mainly fueled by lipid oxidation (Vaillancourt *et al.* 2005 ; McFarlan *et al.* 2009 ; Weber 2009 ; Guglielmo 2010) despite the high intensity of this type of exercise. Rapid lipid processing therefore appears as a crucial component of the avian migrant phenotype with high lipid fluxes made possible by accelerated lipid transport and upgraded metabolic machinery for lipolysis

and lipid oxidation in active skeletal muscles (Weber 2009). In addition to endurance swimming penguins must also dive to catch their prey and these birds are among the most accomplished of divers (Handrich *et al.* 1997 ; Ponganis & Kooyman 2000). Anaerobic metabolism may thus be required when oxygen availability is reduced by prolonged apnea. It is yet not known whether the exceptional capacities exhibited by foraging penguins to sustain intensive and enduring exercise in a harsh cold environment with frequent deep dives relies on coordinated increases in lipid oxidative catabolism and carbohydrate catabolism.

The aim of this study was therefore to determine whether the transition from shore to marine life of king penguin juveniles was associated with metabolic adjustments of lipid and carbohydrate metabolism in skeletal muscle, directly involved in endurance exercise and cold-induced thermogenesis. Multidisciplinary approaches were used from transcriptomic analysis, enzymatic activities, mitochondrial bioenergetics and whole body calorimetry.

Results

Microarray data: analysis of genes involved in energy metabolism.

Relative changes in differentially expressed genes involved in energy metabolism and metabolic pathways are presented in **Table 1**. By comparison with never-immersed (NI) immature penguins, genes encoding proteins involved in glucose transport, glycolysis or glycogenesis were significantly down regulated in sea-acclimatized (SA) birds (from -21 to -60%). The analysis of genes encoding proteins involved in lipid metabolism was performed considering the sequential steps of cellular uptake, transport and metabolism. Although the gene encoding lipoprotein lipase was slightly down-regulated in SA birds (-15% *vs* NI), both membrane (SLC27A1, +56%), cytosolic (FABP, +21%) and mitochondrial (CPT2, +25%) lipid transporter-encoding genes were up-regulated by comparison with NI birds. In mitochondria, lipids are metabolized by enzymes of the β -oxidation pathway and the majority of genes encoding these enzymes were up-regulated in SA by comparison with NI birds. Enzymes involved in fatty acid peroxysomal oxidation were also up-regulated such as the acyl-CoA thioester hydroase (+38%) as was the gene encoding the carnitine-O-octanoyl-transferase (+66%) that catalyses the entry into peroxysomes or that encoding acyl-CoA thioesterase 2 that removes shorter free fatty acids and liberates CoA. Associated with oxidative metabolism, the gene encoding pyruvate dehydrogenase catalyses the transformation of pyruvate, the product of glycolysis, into acetyl-CoA, the main substrate of the citric acid cycle was found to be up-regulated (+25%). Interestingly, the gene encoding pyruvate dehydrogenase kinase, a negative regulator of pyruvate dehydrogenase was down-regulated (-31%). The few differentially expressed genes encoding enzymes of the citric acid cycle did not vary consistently as in SA penguins isocitrate and malate

dehydrogenase were slightly downregulated (-23 and -19%, respectively) while succinate dehydrogenase and succinate CoA ligase were upregulated (+23 and +30%, respectively) by comparison with NI birds. Altogether, present analysis of microarray data revealed that acclimatization to marine life of king penguin immatures was associated with a global increase in the relative expression of genes involved in lipid metabolism. Known regulatory factors involved in metabolic adjustment such as peroxisome proliferator-activated receptors and PPAR-coactivator PGC-1 were not differentially expressed between penguin groups. However, genes encoding the β -T3 receptor (+55%) (not the α isoform) and a number of nuclear coactivators including cAMP-Response-Element-Binding (CREB) regulated transcription coactivator 1 (+47%), nuclear receptor coactivator MED1 (+28%) and steroid receptor coactivator (NcoA6, +102%) were up-regulated in SA juveniles suggesting a regulatory role in the observed transcriptomic changes. The specific increase in the relative abundance of T3R β mRNA was confirmed by Q-PCR that showed a nearly 10-fold increase in the relative abundance of the transcript (**Supplemental data 1**).

<i>Name</i>	<i>Affymetrix Probe Set ID</i>	<i>Log2 (SA/NI)</i>	<i>Residual variance</i>	<i>SA/NI</i>	<i>Pvalue</i>
Glycolysis					
enolase 1, (alpha)	GgaAffx.12833.1.S1_s_at	-0.80	0.03	-43%	0.0002
glucose phosphate isomerase	GgaAffx.20134.1.S1_s_at	-0.53	0.05	-31%	0.0097
phosphofructokinase	GgaAffx.4338.1.S1_s_at	-1.34	0.42	-60%	0.0199
phosphoglycerate kinase 1	Gga.4503.1.S1_a_at	-1.07	0.09	-52%	0.0006
phosphoglycerate mutase 1	Gga.6033.1.S1_s_at	0.36	0.03	+28%	0.0257
Glycogenesis					
glycosyltransferase 8 domain containing 2	Gga.11247.1.S1_at	-0.54	0.05	-31%	0.0117
glycosyltransferase 8 domain containing 3	GgaAffx.12201.1.S1_at	-0.35	0.02	-21%	0.0130
phosphoglucomutase 2-like 1	GgaAffx.11386.1.S1_s_at	-0.59	0.05	-33%	0.0078
phosphoglucomutase 5	GgaAffx.9522.1.S1_at	-0.43	0.03	-25%	0.0082
Glucose transport					
solute carrier family 2 (glucose transporter)	Gga.871.1.S1_at	-0.34	0.03	-21%	0.0399
β-oxidation					
acetyl-CoA acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-CoA thiolase)	GgaAffx.11719.1.S1_s_at	0.36	0.04	+29%	0.0394
acetyl-CoA acyltransferase 1	Gga.17023.1.A1_at	0.37	0.05	+30%	0.0230
acyl-CoA dehydrogenase, short chain	Gga.16136.1.S1_at	0.54	0.05	+45%	0.0092
enoyl CoA hydratase domain containing 2	Gga.9702.2.S1_a_at	0.60	0.03	+52%	0.0011
hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Gga.3036.1.S1_at	-0.47	0.02	-27%	0.0028

Other enzymes involved in lipid metabolism

acyl-CoA thioesterase 2	Gga.11254.1.S1_at	0.31	0.02	+24%	0.0264
diacylglycerol lipase, beta	Gga.5540.1.S1_at	0.52	0.07	+43%	0.0286
lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase	GgaAffx.11785.1.S1_s_at	0.42	0.03	+33%	0.0117
peroxisomal acyl-CoA thioester hydrolase 2a	Gga.12913.2.S1_a_at	0.47	0.06	+38%	0.0378
thioesterase B	Gga.8312.1.S1_at	0.87	0.14	+83%	0.0114

Lipid transport

Carnitine-acetyltransferase	GgaAffx.2762.2.S1_at	0.64	0.09	+56%	0.0178
Carnitine-O-octanoyltransferase	Gga.9995.1.S1_at	0.73	0.12	+66%	0.0192
Carnitine-palmitoyltransferase II	Gga.16218.1.S1_s_at	0.32	0.03	+25%	0.0351
fatty acid binding protein 3	Gga.12266.1.S1_at	-1.12	0.28	-54%	0.0184
fatty acid binding protein 4	Gga.4939.1.S1_s_at	0.27	0.03	+21%	0.0265
lipoprotein lipase	GgaAffx.21769.1.S1_s_at	-0.25	0.02	-16%	0.0433
solute carrier family 27 (fatty acid transporter)	GgaAffx.8475.2.S1_s_at	0.64	0.06	+56%	0.0101

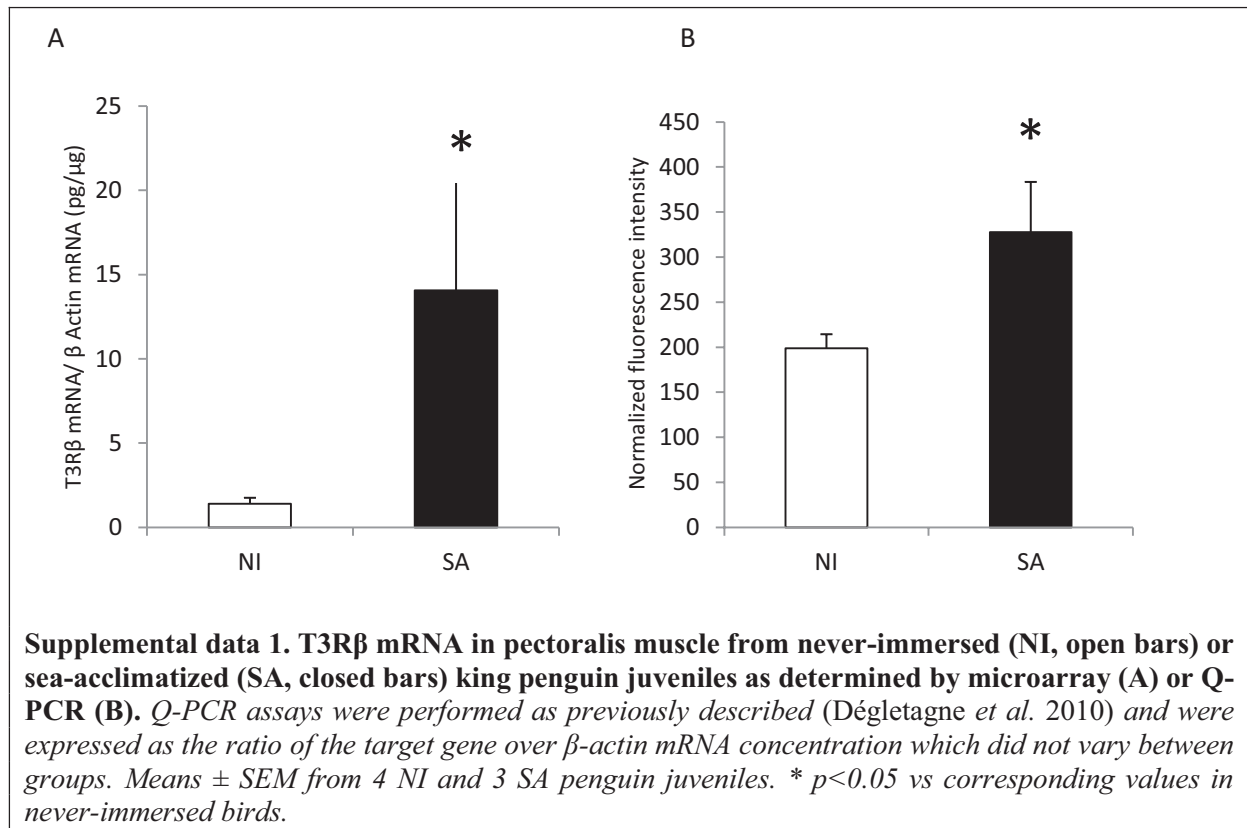
Citric Acid Cycle

isocitrate dehydrogenase 3	Gga.5623.2.S1_s_at	-0.38	0.05	-23%	0.0437
malate dehydrogenase 1	Gga.1141.1.S1_at	-0.76	0.05	-40%	0.0012
malate dehydrogenase 2	Gga.4839.1.S1_a_at	-0.31	0.02	-19%	0.0302
malic enzyme 3	Gga.6003.1.S1_a_at	0.91	0.04	+88%	0.0001
pyruvate dehydrogenase complex	Gga.15677.1.S1_at	0.32	0.02	+25%	0.0196
pyruvate dehydrogenase kinase 1	GgaAffx.8426.1.S1_s_at	-0.53	0.13	-31%	0.0233
succinate dehydrogenase complex	Gga.1161.1.S1_at	0.30	0.02	+23%	0.0307
succinate-CoA ligase, GDP-forming	Gga.2557.1.S1_at	0.38	0.03	+30%	0.0170

Regulatory factors

CREB regulated transcription coactivator 1	GgaAffx.25810.2.S1_s_at	0.55	0.04	+46%	0.0060
nuclear receptor coactivator (MED1)	GgaAffx.24919.1.S1_at	0.35	0.03	+28%	0.0364
steroid receptor coactivator (NCOA6)	GgaAffx.783.1.S1_at	1.01	0.08	+102%	0.0007
thyroid hormone receptor beta	Gga.699.1.S1_at	0.64	0.08	+56%	0.0081

Table 1. Microarray data analyzed by the MaxRS algorithm and focused on the genes encoding proteins involved in glycolytic and β -oxidation pathways and energy metabolism. *Transcriptomic analysis was performed from pectoral muscle biopsies collected on never-immersed or sea-acclimatized king penguin juveniles. All values of gene expression variations are expressed in percentage relative to NI birds. Genes in bold characters were also tested by Q-PCR. Results are shown in Supplemental data 1 and 2.*



Symbol	Affymetrix Probe Set ID	Q-PCR		microarray	
		Variation (SA/NI)	P value	Variation (SA/NI)	P value
CSP	GgaAffx.25406.2.S1_s_at	82%	p<0.05	24%	p<0.05
HIF1AN	Gga.7739.1.S1_at	228%	p<0.05	38%	p<0.05
SLC27A1	GgaAffx.8475.2.S1_s_at	48%	p<0.05	56%	p<0.05
SLC2A3	Gga.871.1.S1_at	-95%	p<0.05	-21%	p<0.05
GHR	Gga.4329.1.S1_at	-81%	p=0.07	-33%	p<0.05
JNK	GgaAffx.3808.1.S1_at	198%	P<0.05	30%	p<0.05
FAT3	Gga.1950.1.S1_at	-72%	P<0.05	-22%	p<0.05
T3RB	Gga.699.1.S1_at	990%	P<0.05	56%	p<0.05
GPI	GgaAffx.20134.1.S1_s_at	-47%	P=0.27	-31%	p<0.05
enolase	GgaAffx.12833.1.S1_s_at	-44%	p<0.05	-43%	p<0.05

Supplemental file 2. Comparison of the gene expression differences assessed by our heterologous hybridization analysis (microarray) and by Q-PCR. *Expression fold changes of the 10 differentially expressed genes tested correspond to SA/NI. For the 10 tested genes, Q-PCR confirmed the microarray results concerning the direction of gene expression variation, even for weak gene expression changes. Genes in bold characters are from Table 1.*

Enzyme activities.

We measured the activities of 4 enzymes involved in either carbohydrate or lipid metabolism. The activities of hexokinase (5.8 ± 0.5 vs. 6.1 ± 0.9) and lactate dehydrogenase (1598 ± 99 vs. 1718 ± 222), both involved in the glycolytic pathway, were similar in NI and SA birds. The activities of 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (20.7 ± 2.1 vs. 15.4 ± 0.8 , $t = 2.25$, $p < 0.05$), an enzyme of the β -oxidation pathway and citrate synthase (235 ± 28 vs. 175 ± 12 , $t = 1.94$, $p = 0.08$), an enzyme of the citric acid cycle, were overall 34% higher in SA than in NI birds, although citrate synthase activities did not reach statistical significance.

Mitochondrial respiration rates.

Figure 1 reports mitochondrial respiration using either carbohydrate- or lipid-derived substrates. When energized with pyruvate, a standard carbohydrate substrate that provides electrons to complex I of the respiratory chain, mitochondria of both penguin groups showed similar respiratory activities. When providing electrons to the same complex but with a donor resulting from lipid metabolism (palmitoyl-L-carnitine), mitochondria from SA penguins exhibited much higher respiration rates in non-phosphorylating (state 4, +60%, $t = 2.87$, $p < 0.05$), phosphorylating (State 3, +143%, $t = 3.04$, $p < 0.05$) and maximal uncoupled states (FCCP, +197%, $t = 4.34$, $p < 0.05$) as compared with mitochondria from NI birds. Results were similar with succinate, providing electrons directly to complex II of the respiratory chain, with phosphorylating (State 3, +75%, $t = 2.85$, $p < 0.05$) and maximal uncoupled respiration rates (FCCP state, +68%, $t = 2.82$, $p < 0.05$) being higher in mitochondria from SA than from NI birds. On account of the large increase in mitochondrial cytochrome oxidase activity in SA penguins (54.9 ± 6.0 vs. 34.3 ± 2.5 natom oxygen per min per mg muscle in SA and NI juveniles, respectively, $p < 0.05$), the amount of mitochondrial protein per unit weight of skeletal muscle and thus the whole muscle ability to oxidize substrates were likely to be increased after acclimatization to marine life.

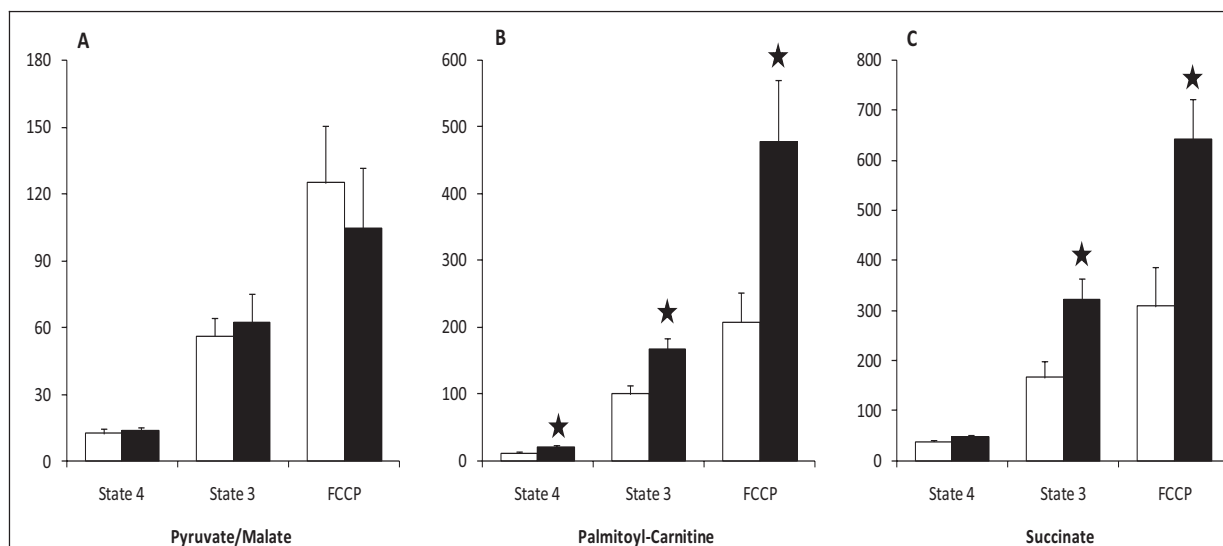


Figure 1. Respiration rates of mitochondria isolated from pectoralis muscle of never-immersed (open bars) or sea-acclimatized (closed bars) king penguin juveniles. Oxygen uptake was determined with a Clark oxygen electrode (Rank Brother LTD) placed into a glass chamber thermostated at 38°C. State 4 was initiated with either: A) 5 mM pyruvate and 2.5 mM malate, B) 50 μ M palmitoyl-L-carnitine and 2.5 mM malate, C) 5 mM succinate in the presence of 5 μ M rotenone. Phosphorylating respiration (state 3) was initiated with 500 μ M ADP. Non-phosphorylating respiration (state 4) was obtained by addition of 1 μ g/mL oligomycin and fully uncoupled respiration was obtained with 2 μ M FCCP. Means \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. never-immersed birds.

In vivo lipid oxidation

Molecular and biochemical data prompted us to investigate the capacity to oxidize lipid substrates at the whole organism level. To test the hypothesis of an increased capacity to oxidize lipids in vivo, we measured the thermogenic effect of lipid infusion in NI and SA king penguin juveniles. This was achieved by indirect calorimetry (**Figure 2A**), a non invasive technique that enables the determination of changes in metabolic rate (MR) in individual birds over time. We first verified that saline infusion was without effect on MR ($t_{NI} = 1.81$ and $t_{SA} = -1.38$, $p > 0.05$). After the end of the saline infusion, resting MR remained constant for more than one hour and was similar between NI and SA juveniles (25.4 ± 0.2 vs. 26.2 ± 0.3 W, respectively) as was the respiratory quotient (0.70 ± 0.06 and 0.70 ± 0.02 , respectively). Infusion of lipid emulsion (8.4 kJ/min) led to a rise in MR in both NI and SA juveniles. In NI juveniles, lipid infusion transiently increased MR that peaked at 28.9 ± 1.3 W (+13% above resting MR, $t = 4.1$, $p < 0.05$) 10 min after the start of the infusion and then returned to basal level 45 min after infusion. In SA juveniles, MR peaked at 31.7 ± 3.1 W (+21% above resting MR, $t = 5.8$, $p < 0.05$) and remained significantly elevated 2h30 after infusion (28.7 ± 2.8 W, +9% above resting MR, $t = 2.5$, $p < 0.05$). The total lipid-induced thermogenic effect was more than 4 times higher in SA than in NI penguins ($z = -2.7$, $p < 0.05$, **Figure 2B**). **Figure 3** shows that lipid infusion led to an expected surge in plasma concentration of triglycerides (**Figure 3A**) with a concomitant rise in plasma non-esterified fatty acids (**Figure 3B**), indicating that infused triglycerides were hydrolyzed

into their molecular constituents, i.e. fatty acids and glycerol. After an initial rise, the plasma concentration of metabolites decreased and returned to basal level on completion of protocol. Despite a trend for a more rapid return to basal levels in SA birds, the kinetic patterns were not significantly different between groups indicating that lipids were similarly cleared by NI or SA juveniles but the fate of these substrates was different between groups. Indeed, taking into account that respiratory quotient remained near 0.7 throughout the infusion, indicating a constant reliance on lipid catabolism in both SA and NI birds, the differential effects of lipid infusion upon energy expenditure (**Figure 2**) show that SA oxidized a larger amount of the infused lipids than NI birds.

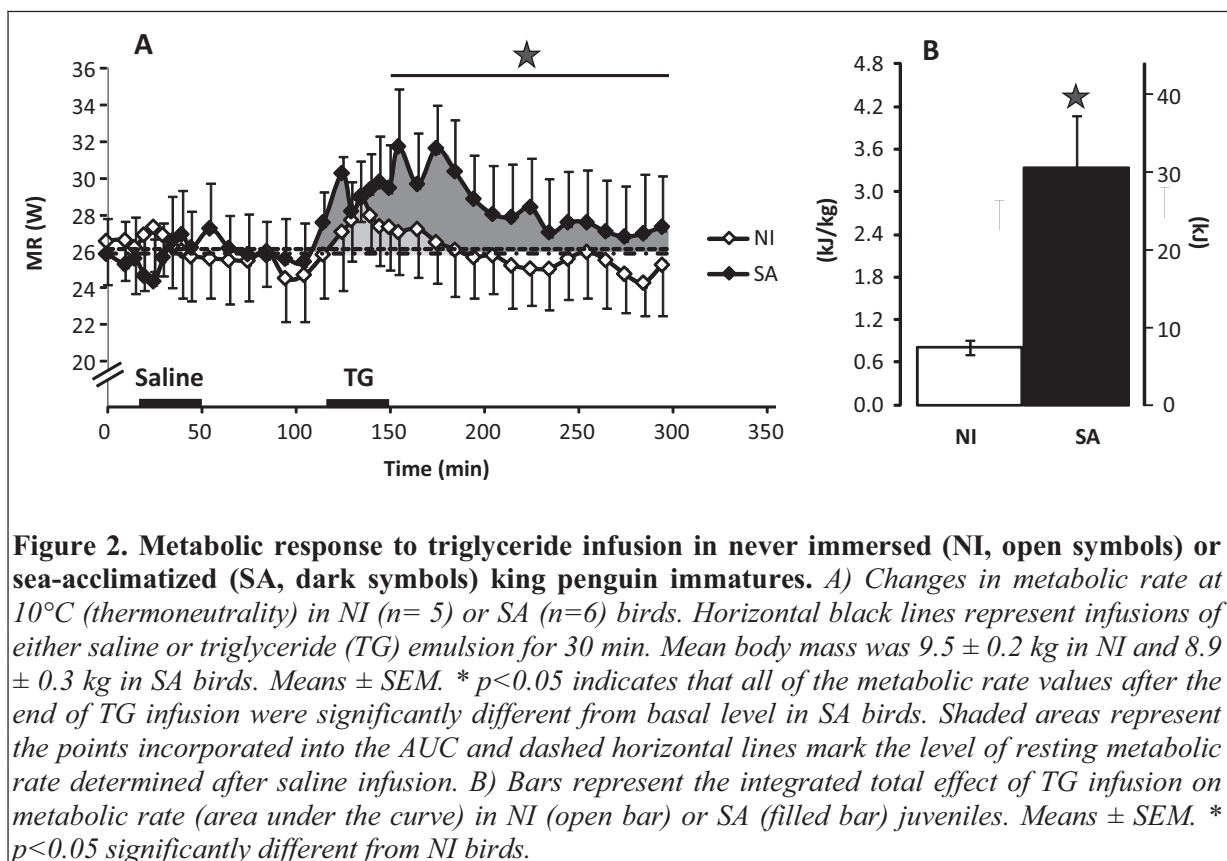


Figure 2. Metabolic response to triglyceride infusion in never immersed (NI, open symbols) or sea-acclimatized (SA, dark symbols) king penguin immatures. *A) Changes in metabolic rate at 10°C (thermoneutrality) in NI (n= 5) or SA (n=6) birds. Horizontal black lines represent infusions of either saline or triglyceride (TG) emulsion for 30 min. Mean body mass was 9.5 ± 0.2 kg in NI and 8.9 ± 0.3 kg in SA birds. Means ± SEM. * p<0.05 indicates that all of the metabolic rate values after the end of TG infusion were significantly different from basal level in SA birds. Shaded areas represent the points incorporated into the AUC and dashed horizontal lines mark the level of resting metabolic rate determined after saline infusion. B) Bars represent the integrated total effect of TG infusion on metabolic rate (area under the curve) in NI (open bar) or SA (filled bar) juveniles. Means ± SEM. * p<0.05 significantly different from NI birds.*

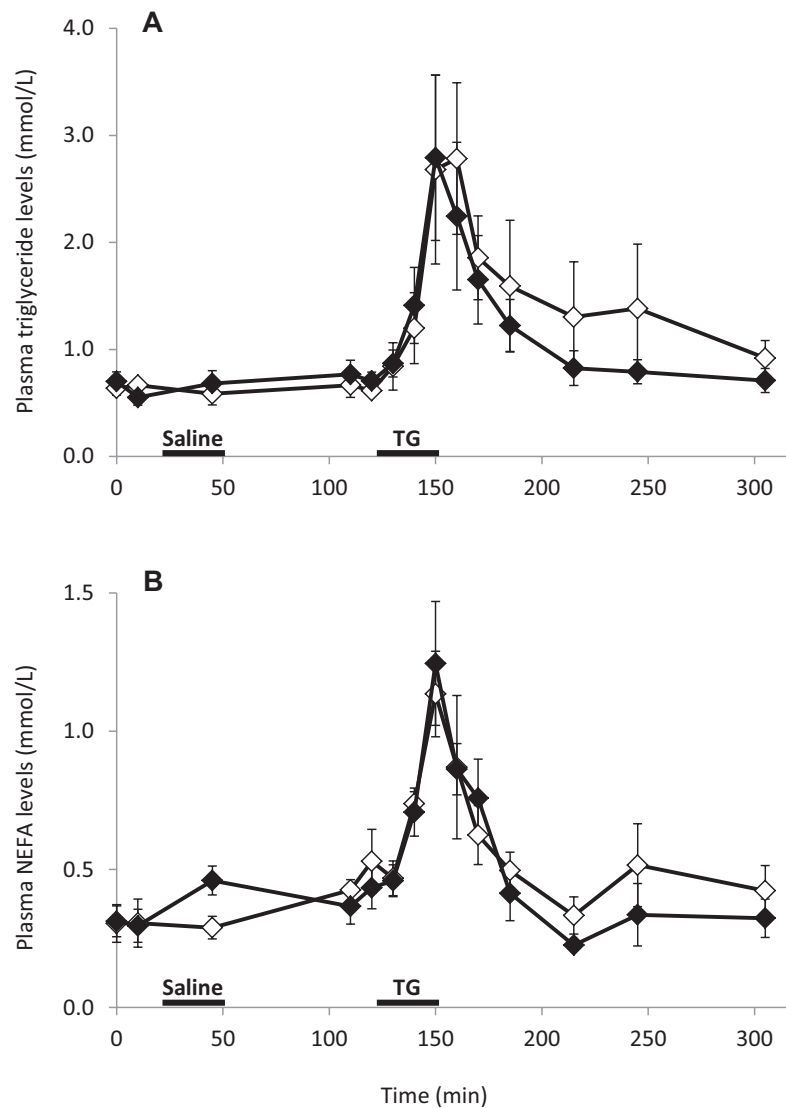


Figure 3. Changes in plasma lipid levels in never immersed (NI, open symbols, n=5) or sea-acclimatized (SA, filled symbols, n=6) king penguin juveniles. (A) Plasma triglyceride (TG) levels. (B) Plasma non-esterified fatty acid (NEFA) levels. Black lines represent infusions of either saline solution or triglyceride (TG) emulsion for 30 min. Blood aliquots were taken at different time point (0, 10, 45, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 185, 215, 245, 305 min). Values are means \pm SEM.

Discussion

To our knowledge this is the first study based on an integrative approach using transcriptomic, biochemical and physiological analysis to investigate changes in energy metabolism at a key step of penguin life. Results showed that the transition from shore to marine life leads to a selective increase in the capacity to oxidize lipids as a fuel for energy metabolism. Such global shift towards lipid oxidation may involve thyroid hormones interacting with their nuclear beta receptors and a number of nuclear coactivators.

Analysis of transcriptomic data in penguins was made possible by the use of MaxRS a new method for the analysis of heterologous hybridization on Affymetrix GeneChip® chicken genome Arrays despite the large phylogenetic distance between these two birds (Dégletagne *et al.* 2010). The differential expression of a large panel of genes detected by this approach was confirmed by quantitative PCR using penguin-specific primers (Dégletagne *et al.* 2010 and **supplemental data**). With the present large scale analysis, we highlighted a global increase in the relative expression of genes involved in lipid metabolism while there was a global slight decrease in most genes encoding proteins involved in carbohydrate metabolism. This coordinated change in gene expression suggests a selective shift in metabolic pathways favoring the use of lipids as fuel to sustain energy expenditure. It may be ascribed to the effects of acclimatization to marine life as both groups of juveniles were exposed to similar thermal conditions and had the same nutritional status at the time of biopsy. Variations in transcripts were consistent with changes in enzymatic activity, leading to a relative increased capacity for mitochondrial β -oxidation versus glycolysis. This supports the hypothesis that most changes in transcripts may lead to changes in functional activity here leading to an increased activity of lipid oxidation in skeletal muscles of sea-acclimatized juveniles. This hypothesis was also supported by the higher capacity of isolated muscle mitochondria to oxidize substrates derived from fatty acids in sea-acclimatized juveniles than in controls. Such change was not observed when a substrate derived from glycolysis (pyruvate) was used. These observations are consistent with a better utilization of lipid substrates after experiencing marine life in relation with an increased activity of the β -oxidation pathway and an enhanced substrate import into mitochondria, as detected with the microarray and enzymatic methods. The activation of mitochondrial respiration by lipid substrates may represent a major step towards natural sea-acclimatization in king penguin juveniles and could be related with an increased need in ATP production essential for counterbalancing the energetic depletion generated by intense physical activity and thermogenesis during foraging.

The fact that king penguin juveniles complete their development at sea raises the question whether the shift in metabolism could be due to developmental rather than environmentally induced changes. Although we cannot reach definitive conclusion with the present data, it remains that NI king penguin juveniles had a similar body weight to SA birds and neither group has reached sexual maturity, ruling out major developmental differences between groups. Further, NI birds had overcome a long-term molting fast before to be included in the present study (Corbel *et al.* 2008), implying that they had already developed good capacities to oxidize lipids as lipids are the main energetic substrates in fasting penguins (Groscolas 1988 ; Cherel *et al.* 1994). Since lipids are also the main substrates to fuel increased regulatory thermogenesis (Talbot *et al.* 2004) and endurance metabolism in birds (McFarlan *et al.* 2009 ; Weber 2009 ; Guglielmo 2010), the two experimental groups would then differ by differences in energetic demands imposed by their respective physiological situation, i.e. low energy expenditure in NI while resting ashore versus increased energy expenditure in SA while

swimming in cold sea water. Therefore, it is reasonable to assume that most of the metabolic shift reported herein is likely to be induced by marine life components, such as cold and/or endurance exercise. In this respect, several studies have suggested similar enzyme alterations in the pectoral muscles of migrating birds to allow enhanced use of fatty acids in the absence of cold exposure (McFarlan *et al.* 2009 ; Weber 2009 ; Guglielmo 2010). Acclimatization to marine life therefore parallels the metabolic adjustment to endurance exercise encountered during flight migration and that are mainly fueled by lipid oxidation (McFarlan *et al.* 2009 ; Weber 2009 ; Guglielmo 2010), in association with cold stress which would further reinforce this metabolic adjustment (Vaillancourt *et al.* 2005).

The increased capacity to oxidize lipid substrates after experiencing marine life was confirmed at the whole animal level by an increased thermogenic effect of lipid infusion into birds kept at thermoneutrality. Present data suggest that SA juveniles oxidize a larger part of infused substrates in keeping with the higher oxidative potential exhibited at the molecular, enzymatic and mitochondrial levels. This lipid-induced extra metabolic rate in resting juveniles cannot be solely ascribed to skeletal muscle and other tissues such as liver probably mediate part of this lipid-dependent rise in bird energy expenditure. However, by virtue of its large contribution to body mass and its high oxidative capacity, skeletal muscle can take up large amount of fatty acids and supply considerable metabolic heat from their oxidation. If such heat dissipation is conceivable when birds are immersed into cold water, present infusion experiments were performed in resting birds at thermoneutrality and therefore the extra-heat production stimulated by lipid infusion is not related to regulatory thermogenic or muscle activity needs. It follows that the increased lipid availability artificially induced by infusion may have stimulated thermogenic processes that were more developed in SA than in NI juveniles. Increased thermogenic effects mediated by fatty-acids through an uncoupling of oxidative phosphorylation processes have already been described *in vitro* in skeletal muscle mitochondria from SA king penguin juveniles (Talbot *et al.* 2004) or from cold-acclimated ducklings (Barré *et al.* 1986). Interestingly, an upregulation of a skeletal muscle uncoupling protein (UCP) was reported in SA juvenile penguins (Talbot *et al.* 2004). Although their physiological functions are still unclear, mammalian muscle UCPs have been associated with increased fatty acid oxidation through still undefined molecular mechanism (Bézaire *et al.* 2007). Present results suggest a link between muscle UCP and thermogenic oxidation of fatty acids in SA juveniles (Talbot *et al.* 2004 ; Rey *et al.* 2008).

Present data suggest potential mechanisms triggering the adaptive increase in lipid oxidation exhibited by penguin juveniles on the basis of the specific up-regulation of the gene encoding nuclear β -T3 receptors. Most effects of T3 are mediated by interactions with nuclear T3R, which are ligand-dependent transcriptional factors regulated by a number of environmental, nutritional and endocrine factors in a tissue- and isoform-specific manner suggesting isoform-specific effects in gene regulation (Cheng *et al.* 2010). Interestingly, a high expression of the T3R β 1 isoform was also observed in liver

of a rat strain exhibiting resistance to obesity, elevated energy expenditure, high spontaneous locomotor activity and a preference for fat oxidation (Taleux *et al.* 2009). This suggests specific roles of the T3R β isoform in activating genes related to energy metabolism. A stimulation of these nuclear T3R β in juvenile penguins at sea is conceivable as increased levels of plasma T3 and T3/T4 ratio have been reported in SA king penguin juveniles as compared with terrestrial juveniles (Cherel *et al.* 2004). This is also consistent with the high expression of malic enzyme (**Table 1**) and avian UCP (Talbot *et al.* 2004) in pectoralis muscle of SA juveniles as these genes are known to be controlled by T3 (Dozin *et al.* 1986 ; Collin *et al.* 2003b ; Rey *et al.* 2010a). Present data also suggest the implication of nuclear coactivators such as CREB regulated transcription coactivator 1, nuclear receptor coactivator MED1 and steroid receptor coactivator (NcoA6) that were simultaneously up-regulated in SA juveniles. Experiments in transgenic mice have indeed indicated that these nuclear coreceptors might be involved in muscle energy metabolism (Chen *et al.* 2010 ; Duteil *et al.* 2010). Interestingly MED1 was recently shown to dynamically interact with nuclear T3R in the activation of brown-fat specific thermogenic UCP1 (Chen *et al.* 2009) further underlying its role in metabolic adjustments.

Alternatively, activation of T3R β expression in the pectoralis muscle of the SA immature penguins might also be related with the physiological constraint of diving. Indeed, adult penguins are breath-hold divers that undergo critical depletion of muscle oxygen during dives (Williams *et al.* 2011), a condition we would expect to activate hypoxia-inducible factor 1 (HIF1). Recently, it has been suggested that T3R β /retinoid X receptor alpha heterodimer could activate HIF-1 α (Otto & Fandrey 2008), linking T3 with HIF1 induced expression of genes involved in angiogenesis, erythropoiesis, and glucose homeostasis (Bracken *et al.* 2003 ; Ma *et al.* 2004). The upregulation of T3 response in sea-acclimatized king penguin juveniles could have therefore confer skeletal muscle with hypoxia tolerance through augmented accumulation of HIF by allowing the maintenance of the most of the activity of glycolytic enzymes while lipid catabolism was enhanced. However, it remains that direct HIF target genes (Bracken *et al.* 2003) associated with glycolysis, such as phosphoglycerate kinase 1, phosphofructokinase and pyruvate dehydrogenase kinase, were found down-regulated in sea-acclimatized penguins. It would be of upmost interest to investigate whether HIF abundance is altered after sea experience and whether the dives of juvenile king penguins are kept within the aerobic limit while the adults may be pushing the physiological limits of aerobic diving.

In conclusion the present integrative study has shown for the first time that fuel selection towards lipid oxidation is a key characteristic of penguin acclimatization to the constraints of sub-antarctic marine life. It is suggested that such acclimatization may involve thyroid hormones through their interactions with nuclear beta receptor and nuclear coactivators. Present data not only improve our fundamental knowledge on comparative biology but have important implications in foraging and migration ecology.

Materials and Methods

Animals.

Field experiments were conducted on the Crozet archipelago (Possession Island, 46°25' S, 51°45' E) at the French Alfred Faure Station during two austral summer campaigns (2007-2008 and 2008-2009). According to the Agreed Measures for the Preservation of Antarctic and Sub-Antarctic Fauna, the project received the agreements of the French Committee for Antarctic Research (Programme 131). Pre-fledging juvenile king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) of both sexes (13-16 month) were captured on the nearby breeding colony of Baie du Marin before they had completed molting which is a pre-requisite for departing to sea (Barré & Roussel 1986 ; Corbel *et al.* 2008). Captured birds finished their molt in an outside enclosure near the laboratory and constituted the never immersed group (NI). A second group of juvenile birds (25-28 month) of both sexes was caught soon after their arrival at the beach after a foraging trip ensuring that they had fully accomplished their acclimatization to marine life. They constituted the sea-acclimatized group (SA). All birds were kept in an outside enclosure, weighed every day, fed twice daily on Atlantic mackerel (*Scomber vernalis* up to 1 kg/day) for 3 days and then fasted for 48 hours before experiments. This protocol tended to minimize confounding effects of potential differences in nutritional status. On completion of the study, all penguins were fed for one week until full recovery and then released at the site of their capture.

Experimental design.

The first austral summer was devoted to biochemical and molecular analysis *in vitro*. A total of twelve birds were captured, six pre-fledging (NI) and six sea-acclimatized juveniles (SA). Superficial pectoralis muscle was surgically biopsied under general isoflurane anesthesia as described previously (Rey *et al.* 2008). A small sample (~200 mg) was immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until assayed for enzymatic and transcriptomic analysis ; the remainder of the biopsy (3-4 g) was freshly used for mitochondrial extraction and bioenergetics analysis. The second austral summer was devoted to study the effect of lipid infusion upon energy expenditure *in vivo*. A total of twenty birds were captured, ten pre-fledging (NI) and ten sea-acclimatized juveniles (SA). No tissue sampling was performed during this second campaign.

Transcriptomic analysis.

Total RNA was purified from pectoralis muscle biopsies using TriReagent procedure (Invitrogen, France) and the quality of extracted RNA was assessed using a bioanalyzer 2100 (Agilent

technologies, Inc, Palo Alto, CA, USA). Labeling and hybridization were performed with the Affymetrix protocol (<http://www.affymetrix.com>) by the ProfileXpert platform (Lyon, France) on Affymetrix GeneChip® Chicken Genome Array. Microarray data are available in Gene Expression Omnibus (GSE17725). Analysis of the data set was performed using MaxRS method (Dégletagne *et al.* 2010).

Enzymatic activities.

Hexokinase (HK, EC 2.7.1.1), lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD, EC 1.1.1.35) were fluorimetrically determined (n = 6 per group) on muscle homogenates (Lowry & Passonneau 1972). Citrate synthase (C.S., EC 4.1.3.7) was measured using 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid. Enzyme activities were expressed in U per g of protein. All assays were run in duplicates.

Mitochondrial respiration.

The bioenergetics of mitochondria was investigated *in vitro* in 6 SA and 6 NI birds as already described for penguins (Rey *et al.* 2008 ; Rey *et al.* 2010a). Briefly, mitochondria were isolated by a standard extraction protocol, involving potter homogenization, partial protease digestion, and differential centrifugations. Mitochondria were pelleted at 8,700 g and mitochondrial proteins were determined by a Biuret method. Cytochrome c oxidase was determined polarographically at 38°C on tissue homogenates as described previously (Rey *et al.* 2008).

In vivo lipid oxidation.

The metabolic effect of a triglyceride (TG) infusion was determined *in vivo* at 10°C within the thermoneutral zone for these birds (Froget *et al.* 2002). Eleven birds were included in this protocol (5 NI and 6 SA). The day before experiment, birds were equipped with intravenous catheters as described previously (Barré & Rouanet 1983). After stabilization within the thermostatic chamber for a night, metabolic rate was continuously recorded by indirect calorimetry as already described in penguins (Barré & Roussel 1986 ; Dumonteil *et al.* 1994 ; Rey *et al.* 2008 ; Froget *et al.* 2002) following infusions at 1 mL/min of saline (0.9% NaCl) then Intralipid® 20% emulsion (Fresenius Kabi AB, Sweden). Each infusion time was 30 min long. Blood aliquots (700 µL) taken at different time points, were centrifuged at 3,500 g for 5 min at 4°C and the resulting plasma samples stored at -80°C until analysis of plasma TG and non-esterified fatty acid concentrations using commercially available kits

from Biomérieux or Wako chemicals, respectively. Because the Intralipid® emulsion also contains high levels of glycerol (2.3 g/100 mL), control infusion experiments were also conducted with a glycerol solution in nine birds (5 NI and 4 SA) that showed no significant thermogenic effect of the glycerol perfusion. In order to estimate the total effect of triglycerides upon metabolic rate, area under the curve (AUC) was calculated for each bird using trapezoidal integration minus the individual RMR.

Statistical analysis.

Data were expressed as means \pm SEM. In transcriptomic analysis, after normalization of microarray data with the quantile method (Bolstad *et al.* 2003), differentially expressed genes between NI and SA penguin juveniles were highlighted using the empirical Bayes moderated t-statistics implemented in the Bioconductor package limma (Smyth 2004). Mitochondrial enzymatic activities and respiration rates were tested with one-way analysis of variance followed by Student's t-tests (Statview 4.5 software). Effects of groups, saline infusion and TG infusion on metabolic rate and kinetics of plasma TG and NEFA levels were investigated using general linear mixed models. Individual were included as random factor. Time was considered as factor in kinetic statistical analysis. AUC values were tested with a non-parametric Wilcoxon rank sum test. These statistical analyses were performed using R with linear mixed effects function in the "nlme" library for linear mixed models. Factor significance was tested using Wald z tests (Bolker *et al.* 2009). Variance homogeneity, residuals normality and residuals independence have been checked. Significant differences were considered at $p < 0.05$.

Acknowledgments.

This work was supported by grants from the French Polar Institute (Institut Paul Emile Victor, Program 131). C Dégletagne and L Teulier were in receipt of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Principaux résultats présentés dans la publication 2

Effets de l'acclimatation au milieu marin sur l'expression des gènes du métabolisme

Grâce à notre approche par puce à ADN, nous avons comparé l'expression des gènes impliqués dans le transport et l'utilisation des différents substrats énergétiques, lipides et glucides. Il en résulte une régulation inverse de l'expression de ces gènes impliqués dans ces différentes voies cellulaires, en faveur d'une augmentation du métabolisme lipidique et d'une diminution du métabolisme glucidique dans le muscle pectoral de manchots Royaux immatures acclimatés au milieu marin.

Mesures des capacités d'utilisations des substrats énergétiques dans le muscle pectoral

Les mesures d'activités réalisées sur les enzymes impliquées dans la β -oxydation (HOAD) et le cycle de Krebs (Citrates Synthase) sont accrues (+34% , $p < 0,05$) après acclimatation du manchot au milieu marin (groupe SA). Ces mesures sont renforcées par l'augmentation de la respiration des mitochondries musculaires du groupe SA par rapport au groupe NI en présence de palmitoyl-carnitine, substrat d'origine lipidique. Ceci traduit un meilleur transport et utilisation de ces substrats lipidiques, favorisant probablement la production d'ATP chez ces oiseaux. A l'inverse, l'activité des enzymes impliquées dans la glycolyse (Hexokinase, Lactate déshydrogénase) ne varie pas. De même, les respirations mitochondriales mesurées en présence de substrats glucidiques (pyruvate malate) ne montrent aucune variation entre les groupes NI et SA.

Augmentation des capacités in vivo d'utilisation des lipides après acclimatation au milieu marin

La perfusion de lipides induit une plus forte augmentation du métabolisme qui perdure dans le temps chez les oiseaux SA (+21% au dessus du métabolisme de repos, $p < 0,05$) par rapport aux NI (+11% au dessus du métabolisme de repos, $p < 0,05$), malgré des capacités à cataboliser ces métabolites lipidiques à vitesse équivalente. Ceci suggère que les oiseaux acclimatés à la vie marine possèdent de meilleures capacités d'oxydation des substrats lipidiques.

Indices d'un contrôle des modifications métaboliques par la T3

L'augmentation de l'expression de l'isoforme β du récepteur à l'hormone thyroïdienne (T3R β) (+990% ; $p < 0,05$), vérifiée par qPCR et puces à ADN, ainsi que l'augmentation d'expression de l'enzyme malique (contrôlée par la T3) suggère un rôle prépondérant de cette hormone dans l'orientation du métabolisme énergétique de l'animal au cours de son acclimatation au milieu marin. Ces données ont été recoupées avec d'autres données de la littérature indiquant 1/ la variation de concentration plasmatique de cette hormone au cours du cycle de vie du manchot Royal (Cherel *et al.* 2004) et 2/ l'effet de cette hormone sur le métabolisme énergétique chez le rat (Taleux *et al.* 2009).

Publication n°3 : Physiological response of king penguins to oxidative challenge of living at sea

Réponses physiologiques développées par le manchot Royal pour surmonter le défi oxydatif représenté par sa vie en milieu marin.

Le comportement de pêche du manchot Royal l'oblige à réaliser des plongées en apnée répétées au cours desquelles l'utilisation et la gestion de ses réserves en oxygènes sont cruciales. De ces capacités dépend la durée de leur plongée, facteur déterminant pour permettre aux manchots d'accéder à leurs ressources alimentaires, indispensables pour leur survie. Afin d'augmenter la durée de leur plongée au-delà des capacités théoriques de plongée en aérobie, ces oiseaux ont développé différents mécanismes physiologiques parmi lesquels sont retrouvés : une diminution de leur rythme cardiaque (3-5 battements par minutes pour le manchot empereur) (Meir *et al.* 2008), une diminution de leur PO₂ pulmonaire jusqu'à des valeurs proches de 15 mmHg (Stockard *et al.* 2005), une déplétion quasi-totale de leurs réserves d'oxygène sanguine (Ponganis *et al.* 2007), une consommation totale des réserves d'oxygène du muscle pectoral (Williams *et al.* 2011), une diminution de la température de certains tissus au cours de la plongée via des mécanismes de vasoconstriction périphérique (Handrich *et al.* 1997 ; Williams *et al.* 2011), une activation de la voie de la glycolyse anaérobie (Ponganis *et al.* 1997).

Quand ils refont surface, ces oiseaux vont reconstituer leurs réserves en oxygène, en partie grâce à une forte affinité de leur hémoglobine (Meir & Ponganis 2009). Ces épisodes de plongée vont donc soumettre cet oiseau à des épisodes d'apnée/hyperventilation, d'hypoxémie transitoire, de bradycardie/tachycardie, d'hypoxie/réoxygénation, d'ischémie reperfusion. Toutes ces situations sont connues pour favoriser la production de radicaux libres de l'oxygène (ROS) (Hermes-Lima & Zenteno-Savín 2002), pouvant endommager les différentes molécules biologiques : lipides, protéines et acides nucléiques. Au regard des théories radicalaires du vieillissement, nous supposons alors que le manchot, oiseau longévif, va devoir développer des mécanismes efficaces de luttes contre ces espèces réactives de l'oxygène, indispensable pour sa survie.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à déterminer les mécanismes physiologiques développés par le manchot Royal pour surmonter cette contrainte pro-oxydative induite par sa vie en milieu marin. Pour cela nous avons comparé des oiseaux avant et après leur premier passage en mer et déterminé dans le muscle pectoral, muscle de la nage soumis à des variations de disponibilité en oxygène, les mécanismes impliqués dans la régulation du taux de ROS cellulaire. Par une approche intégrative, nous nous sommes intéressés aux différentes voies cellulaires/enzymes impliquées dans la production et la dégradation des ROS, la réparation ou dégradation des dégâts liés aux ROS et la protection contre les attaques radicalaires.

Physiological response of king penguins to oxidative challenge of living at sea

by

Benjamin Rey^{1,2*}, Cyril Dégletagne¹, Damien Roussel¹, Jacques Bodennec³, Jean-Louis Rouanet¹,
Jeremy Tornos¹, Loïc Teulier¹, Mireille Raccurt¹ and Claude Duchamp¹

⁽¹⁾ Université de Lyon, F-69000, Lyon ; Université Lyon 1 ; CNRS – UMR 5023 Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

⁽²⁾ Université de Lyon, F-69000, Lyon ; Université Lyon 1 ; CNRS – UMR 5558 Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

⁽³⁾ Université de Lyon, F-69000, Lyon ; Université Lyon 1 ; CNRS – UMR 5558 Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

Running title: Anti-oxidant strategy of diving king penguins

Key words: redox homeostasis, oxidative stress, penguin, lipid composition, [...]

* Corresponding author.

E-mail address: benjamin.rey@univ-lyon1.fr

Abstract

Repeated deep dives are believed to be highly pro-oxidative events for air-breathers foragers, such as penguins. Therefore, at the fledging time, the transition from a strictly terrestrial to a marine lifestyle, may trigger a complex array of metabolic and anti-oxidant responses to prevent chronic oxidative stress in juveniles penguin's tissues. To date, the precise anti-oxidant mechanisms that underlie the evolutionary success of such a long living bird foraging in pro-oxidative environment are not well elucidated.

In the present study, we used a multiple approaches combining gene expression profiling analysis (microarray), *in vitro* measures of mitochondrial oxidant generation, determination of mitochondrial membrane susceptibility to oxidant and enzymatic activity of main anti-oxidant enzymes, to depict the whole-cell response of juvenile king penguins that had either successfully acclimatized or not yet migrated to marine environment. As compared with never immersed (NI) birds, penguin juveniles returning from a foraging trip (Sea Acclimatized: SA) display reduced mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation in their pectoral muscle, as well as a down-regulation of the major gene encoding non-mitochondrial oxidant generating molecules (NADPH oxidase, aldehyde oxidase, peroxidase, dual oxidase). Pectoral muscles of SA clearly exhibit higher mRNA expression of the main anti-oxidant enzyme (Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase, Glutathione-S-Transferase, Peroxiredoxin, Thioredoxin, Metallothionein). Such transcriptional variations between groups were confirmed by higher activity of Superoxide Dismutase (+160%), Glutathione peroxidase (+32%) and Catalase (+44%) in pectoral muscle of SA penguins. Contrary to our expectations, mitochondrial membranes fatty acid of SA exhibit higher degree of unsaturation resulting in a higher lipid susceptibility to ROS, as compared to NI membranes. Pathway analysis of microarray data also reveals that genes involved in oxidized DNA (polymerase, replication factor, excision repair cross-complementing protein) and proteins repairs mechanism (methionine sulfoxide reductase) as well as degradation process (Proteasome, Ubiquitin) are considerably up-regulated in SA penguins.

Such multifaceted plasticity affecting the pectoral muscle of SA penguins may be crucial to uphold red-ox homeostasis and cell integrity in active tissues subjected to high pro-oxidative pressure associated with marine life-style. By preventing tissues from ischemia- and hypoxemia-recovery related oxidative injuries, coordinated anti-oxidant defences may have be a key step in the evolution of diving performance of marine birds.

Introduction

Although oxygen is essential to sustain aerobic life, it is one of the most toxic elements in the cell due to its metabolism byproducts ; the Reactive Oxygen Species (ROS). ROS are highly reactive molecules responsible for severe intra-cellular damages. More precisely, their oxidative effects on cellular components such as nucleic acids, lipids and proteins, are accountable for the “aging” process, and could ultimately be fatal to the organism in case of extreme accumulation of damaged molecules (Harman 1956). According to the free radical theory of aging, the higher the metabolic rate, the greater the ROS production and the shorter the life span (Beckman & Ames 1998 ; Finkel & Holbrook 2000). Although this theory was widely accepted and still stands in most situations (between different mammals), numerous inconsistencies have been found about the strict linkage between life span and metabolic rate (physical exercise, caloric restriction in rats, comparison birds vs mammals...) (Hollosozy *et al.* 1985 ; Lee 1995 ; Masoro 2006 ; Hulbert *et al.* 2007 ; Costantini *et al.* 2008).

Consequently, new studies have demonstrated that organisms could actually maintain safe level of oxidized molecules by: 1. Regulating ROS generation at their different site of production (Kowaltowski *et al.* 2009 ; Pamplona & Costantini 2011). 2. Stimulating an interactive network of anti-oxidant processes. 3. Modifying the intrinsic molecule susceptibility to ROS (Hulbert *et al.* 2007). 4. Protecting macromolecules with chaperone and/or other stabilizing proteins (Kalmar & Greensmith 2009). 5. Repairing damaged molecules, 6. Removing oxidized macromolecules (Davies 2000).

However, even in the light of these recent revisions of the theory, the life span of birds remains an enigma. Compared to mammals of equivalent body mass, birds exhibit higher metabolic rate, body temperature and glucose level. All these factors should drastically accelerate tissue damage and physiological senescence, but they live up to three times longer than mammals (Costantini *et al.* 2008). Several explanations have been raised to explain this paradox: lower mitochondrial ROS production in birds (St-Pierre *et al.* 2002), a greater cellular resistance to oxidative stress, lower mitochondrial and nuclear DNA oxidative damage or lower cell membrane unsaturation (Hulbert *et al.* 2007).

Birds have successfully colonized extreme environments and are continuously exposed to constraints known to favor ROS production. These behaviors should be associated to the development of efficient anti-oxidant mechanisms. To study the particulars of these mechanisms and explore how long-live endotherms cope in highly pro-oxidative environments, the King penguin is an ideal model.

This deep air-breathing marine vertebrate is strictly terrestrial during more than one year after hatching (~14 months). Juvenile King penguins must then deal with new environmental constraints imposed by a marine life-style to reach nutritional emancipation. Foraging in the cold sub-antarctic ocean generates an intensive and prolonged energetic demand to fuel thermogenic processes (Barré &

Roussel 1986 ; Dumonteil *et al.* 1994b) and to sustain high locomotors activity in a viscous milieu (Froget *et al.* 2004). Owing to their small body size, King penguins also demonstrate exceptional diving performances, both in term of depth (>300m) and endurance (frequent dives lasting up to 8 min combined with surface intervals mostly shorter than 2.5 min) (Culik *et al.* 1996 ; Handrich *et al.* 1997 ; Froget *et al.* 2004). These diving performances are far greater than predictions from physiological models, and occur throughout penguin's life as an mandatory component of their feeding behavior (Kooyman *et al.* 1992 ; Handrich *et al.* 1997).

Diving leads to profound cardiovascular adjustments in penguins, including bradycardia, reduced cardiac output and dramatic redistribution of regional blood flows leading to reduced muscle perfusion (Butler & Jones 1997). Prolonged apnea also leads to critical depletion of respiratory O₂ (Stockard *et al.* 2005), resulting in a massive reduction of blood PO₂ (down to 1-6mm Hg for the Emperor penguin) (Ponganis *et al.* 2007) and an accumulation of lactate (Ponganis *et al.* 1997). Therefore, during diving time,, swimming muscles experience both a marked hypoperfusion/ischemia (low blood flow) and an extreme hypoxemia (Butler & Jones 1997) while sustaining elevated metabolic activity to maintain high swim stroke frequency (Van Dam *et al.* 2002 ; Hanuise *et al.* 2010). During the short surface intervals, Emperor penguins (*Aptenodytes forsteri*) has shown particularly efficient gas extraction and diffusion ability to restore oxygen in active tissues (Williams *et al.* 2011). Thus, frequent repetition of apnea followed by short recovery period is associated with rapid intermittent changes in pO₂, pCO₂ and pH along all the respiratory system, from lung to mitochondrial environment.

ROS production is enhanced in muscles either exercising in hypoxic conditions or subject to intermittent hypoxia (reviewed in Clanton 2007), raising the potential for oxidative damages. More generally, re-introducing oxygen within tissues after a period of ischemia/hypoxia is known to induce severe oxidative injuries (Halliwell & Gutteridge 1999). Surprisingly, penguins have been shown to be particularly long living birds, when the free radical theories of ageing would have predicted that they exhibit elevated morbidity and accelerated senescence processes (especially in metabolically active tissue such as the pectoralis muscle). This has lead to the hypothesis that diving birds have developed powerful anti-oxidant strategies to cope with repetitive ischemia/reperfusion.

However, most of what is known about penguin resistance to oxidative stress comes from comparative studies. Corsolini *et al.* (2001) were the first to show that the plasma scavenging capacity against peroxy radicals of Adélie (*Pygoscelis adeliae*) and Emperor penguins is higher than for other non-diving polar birds (Corsolini *et al.* 2001). Recent study has demonstrated that superoxide radical production in muscle of adult Emperor penguin was not different from that of chicken and other non polar diving birds, but that the activity of anti-oxidant enzyme was considerably higher in both

penguins liver and pectoralis muscle (Zenteno-Savin *et al.* 2010). However, the global cell response from air-breathing vertebrates experiencing intermittent ischemic hypoxia and hypoxemia while exercising submerged is still not fully understood in the context of oxidative stress.

The period of first acclimation to marine life is particularly interesting to well characterize the physiological mechanisms employed by king penguin juveniles to survive in pro-oxidative environment. In the present study, we use a combination of non-targeted transcriptomic, biochemical, and functional approaches to explore more extensively the different aspects of anti-oxidant cell responses of juvenile King penguins before and after their first foraging trip at sea. By focusing on the pectoralis muscle, we can simultaneously describe the evolution of several key parameters: 1. The expression of genes involved in various anti-oxidant pathways using microarray. 2. The anti-oxidant enzymes activity. 3. The level of mitochondrial ROS production. and 4. The relative susceptibility of the mitochondrial membranes to oxidative stress.

Material and methods

Animals

Ethical approval for all procedures was granted by the ethics committee of the French Polar Research Institute (IPEV, programme 131) and of the French ministry of the environment.

Juveniles king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) of both sex were captured at the breeding colony of Baie du marin in the French Possession Island (Crozet Archipelago, 46°25' S, 51°45' E) before or after they had experimented foraging trip and accomplished their acclimation to marine life. Pre-fledging birds (10-11 month) were captured before they had completely moulted which is a prerequisite for departing to sea (Corbel *et al.* 2008). These birds were compared to juveniles penguins (12-14 month) recently arrived at the beach after a foraging trip at sea ensuring that they had fully accomplished their acclimation to marine life. To avoid possible confounding effect of nutritional status, all the birds were fed mackerel (*Scomber vernalis*), up to 0.5 kg per day for 3 d. Superficial pectoralis muscle was surgically biopsied under general isoflurane anesthesia as described previously (Rey *et al.* 2008). A small subsample (~200 mg) was kept at -80°C for further molecular and biochemical analysis, while the majority of the biopsy (3-4g) was used for mitochondrial extraction.

After surgery, all birds received an intramuscular injection of a long action antibiotic and a non-steroidal anti-inflammatory. They were monitored and fed for one week before being released at the site of their capture.

Mitochondrial extraction

Mitochondria were isolated according to published protocols (Rey *et al.* 2008 ; Roussel *et al.* 1998 ; Talbot *et al.* 2004) by differential centrifugation with all steps at 4°C.

Muscle biopsy was cut up finely with sharp scissors in ice-cold isolation medium (250 mM sucrose, 1mM EGTA, 20 mM tris-HCl, pH 7.4, at 4°C), homogenized with a Potter–Elvehjem homogenizer and centrifuged at 800×g for 10 minutes.

Supernatant containing subsarcolemmale mitochondria was collected, filtered through cheesecloth and centrifuged at 8,700×g for 10 minutes.

The pellet was suspended in isolation buffer and was treated with protease (1 mg/g muscle wet weight) for 5 min at 4°C. The muscle mixture was diluted 1:2, homogenized with a potter-Elvehjem homogenizer and centrifuged at 1,000×g for 10 min. The supernatant containing intermyofibrillar mitochondria was collected, filtered through cheesecloth and centrifuged at 8,700×g for 10 min.

Intermyofibrillar and subsarcolemmale mitochondria were pooled and washed twice by suspension in the isolation buffer and centrifuged at 8,700×g for 10 min.

Finally, the pellet was suspended in 250 µL of ice-cold isolation medium and mitochondrial protein content was determined using biuret method with bovine serum albumin as a standard.

Basal mitochondrial H₂O₂ production.

H₂O₂ production by isolated mitochondria was determined fluorometrically as described previously (Rey *et al.* 2010b ; Rey *et al.* 2011) by monitoring the linear increase in fluorescence of homovanilic acid (HVA) oxidation by H₂O₂ in the presence of horseradish peroxidase (HRP). Reaction conditions were 0.05 mg/mL of muscle mitochondrial protein, 6 U/mL HRP, 0.1 mM HVA and 5 mM succinate in an incubation buffer containing 120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 3 mM Hepes, 1 mM EGTA and 0.3% (w/v) BSA, pH 7.4). Mitochondrial H₂O₂ production was measured at 38°C and the fluorescence units converted into amount of H₂O₂ after addition of known concentrations of H₂O₂ to establish the standard concentration curve.

Mitochondrial phospholipid acyl composition.

We specifically look at composition of phospholipid located in the very place that most reactive oxygen species are produced: the intermyofibrillar mitochondrial membranes.

Materials.

All solvents were of analytical grade and were purchased from SDS (Peypin, France). Silica gel G60 TLC plates were from Merck (Darmstadt, Germany). Fatty acid methyl ester standards and Omegawax 250 gaz capillary column with an internal diameter of 0.25 mm and a film thickness of 0.25 μm were from Supelco (Saint Quentin Fallavier, France). Other chemicals were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Lipid analysis.

Mitochondrial lipids were extracted and purified according to Folch method (Folch *et al.* 1957). Briefly, the samples were homogenized in chloroform-methanol (2:1, v/v) for several hours at room temperature. The mixture was filtrated and the lipids were washed successively with 0.25% aqueous KCl solution and deionized water. The chloroform lower phase was dried down under nitrogen and lipids were suspended in benzene-methanol (1:1, v/v) that was stored at -30°C until analysis. The fatty acid composition of phospholipids was determined as follows:

The lipids were applied on a 10×10 TLC plate that was developed in diisopropyl ether, in order to separate neutral lipids from phospholipids that remain at the deposit. Phospholipids were scrapped in a screw capped Teflon tube for transesterification using acetyl chloride. Fatty acid methyl esters were analyzed by gaz chromatography using a Chrompack CP9000 apparatus (Chrompack, Les Ulis, France), equipped with a flame ionization detector. Separation was achieved on a 30 m Omegawax 250 capillary column. Nitrogen was used as carrier gas at a flow rate of 15 ml/min and at 60 kPa. Injector and detector temperatures were set at 250°C . Fatty acid methyl esters were separated as previously described (Vaisman *et al.* 2008) and were identified by using authentic standards.

Unsaturation index (UI) was calculated as the number of double bonds per 100 acyl chains. It was calculated according to Hulbert *et al.* (2007) as follows:

$$\text{UI} = \% \text{ monoenoics} + (2 \times \% \text{ dienoics}) + (3 \times \% \text{ trienoics}) + (4 \times \% \text{ tetraenoics}) + (5 \times \% \text{ pentahenoics}) + (6 \times \% \text{ hexaenoics}).$$

The peroxidation index (PI) was used as an indicator of the susceptibility and was calculated as $\text{PI} = (0.025 \times \% \text{ monoenoics}) + (1 \times \% \text{ dienoics}) + (2 \times \% \text{ trienoics}) + (4 \times \% \text{ tetraenoics}) + (6 \times \% \text{ pentahenoics}) + (8 \times \% \text{ hexaenoics})$ based on empirical measures of Holman (Holman 1954).

Measurement of muscle anti-oxidant enzyme activity (SOD, GPx and Catalase)

SOD and GPx activity were determined using frozen tissue as already described for pectoralis muscle of king penguins (Rey *et al.* 2008). Briefly, 20mg of pectoralis muscle were potter homogenized at 4°C, in buffer containing 100 mM KH₂PO₄, 1 mM DTT, and 2 mM EDTA (pH 7.4) and centrifuged at 3000 g for 5 min. Anti-oxidants enzymatic activities were assayed using the supernatant. Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by monitoring the rate of acetylated cytochrome *c* reduction by superoxide radicals generated by the xanthine-xanthine oxidase system (Flohe 1984). One activity unit of SOD was defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of acetylated cytochrome *c* reduction by 50%. The assay for total activity of glutathione peroxidase (GPx) coupled the reduction of cumene hydroperoxide to the oxidation of NADPH by glutathione reductase, and this coupled reaction was monitored at 340 nm (Tappel 1978). The activity of catalase (CAT) was determined by the method of Aebi (Aebi 1984). This technique used the first-order rate constant of the decomposition of H₂O₂ by homogenate CAT at 20°C. Catalase activity was defined as $k = (2.3/dt)(\log A_1/A_2)$, where *dt* is change in time, *A*₁ is initial absorbance, and *A*₂ is final absorbance. All enzyme activities are expressed in U/mg of proteins.

RNA extraction, microarray hybridization and data processing.

Total RNA was purified using TriReagent procedure (Invitrogen, France) and the quality of extracted RNA was assessed using a bioanalyzer 2100 (Agilent technologies, Inc, Palto Alto, CA, USA). Labeling and hybridization were performed following Affymetrix protocol (<http://www.affymetrix.com>) by the ProfileXpert platform (Lyon, France) on Affymetrix GeneChip® Chicken Genome Array. Microarray data are available in Gene Expression Omnibus (GSE17725). Analysis of the data set was performed using MAXRS method, an algorithm devoted to the analysis of heterologous hybridization on microarrays that has already been tested on penguins cDNA (Dégletagne *et al.* 2010).

Statistical analysis

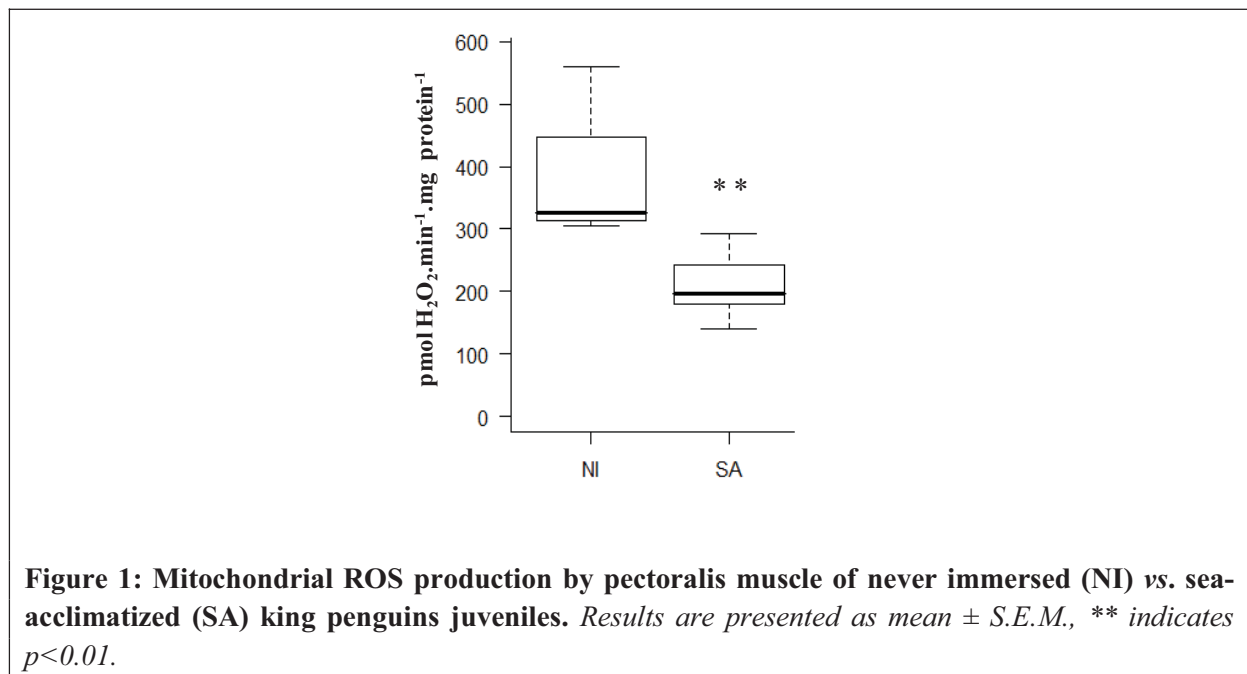
Data are expressed as means ± SEM. Differences were considered significant at P<0.05. Data among microarrays were normalized using the quantile method (Bolstad *et al.* 2003) and the test for differential expression between the two conditions was performed with the empirical Bayes moderated t-statistics implemented in the Bioconductor package limma (Smyth 2004). All analyses were done using the R statistical software (2009).

Results and discussion

Mitochondrial H₂O₂ production and expression of gene controlling oxidant generating complex

Considering the reduction of oxidant molecule generation as a first line of defenses for preventing from oxidative stress (Brand 2000), we first examine whether mitochondrial and non-mitochondrial oxidant generating systems are affected by acclimatization to marine life.

Mitochondria are believed to be the first source of ROS generation. **Figure 1** shows that basal hydrogen peroxyde production measured in mitochondria extracted from pectoralis muscle was reduced by nearly 50% in SA penguins as compared to pre-fledging juveniles (Respectively 380 ± 60 vs. 196 ± 23 pmol H₂O₂.min⁻¹.mg protein⁻¹ ; P<0.01).



Microarray expression data for ROS-generating enzyme are presented in the Cluster 1 of **Table 1**. Twelve differentially expressed genes over fourteen suggest an inhibition of the cell oxidant generating processes, after acclimatization to marine life. These includes the down regulation of key regulator/activator of superoxide and/or hydrogen peroxide production, such as NADPH oxidase (NOX1, -30%), aldehyde oxidase1 (AOX1, -49%), peroxidase homolog (PXDN, -20%) and Dual oxidase (Duox2, -22%) (Cheng *et al.* 2008). Angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4), a key redox player which stimulates the NADPH oxidase-dependant production of superoxide (Zhu *et al.* 2011), was also down-regulated in SA group (-36%). SA juveniles showed a down-regulation of gene involved in ROS production associated with oxidative burst and inflammatory process such as the Scavenger receptor SCARF1 gene (-55 to -73%). Gene encoding receptors of the highly inflammatory

and oxidative stress generating tumor necrosis factor (TNF- α) are also down-regulated in SA birds (TNFRSF11A, -26%, TNRSF18, -30%, TNRSF21, -55%). Finally, limitation ROS production associated with inflammatory in SA birds tissues is suggested by overexpression of the Sirtuins (SIRT1, 77% ; SIRT5, +82% ; SIRT6, +36%). In particular, SIRT1 and SIRT6 protect cells against cytokine toxicity by down regulating NF κ B pathways thus lowering the level of pro-inflammatory cytokine protecting cells against oxidative stress and pro-inflammatory diseases (reviewed in Donmez & Guarente 2010).

Anti-oxidant enzyme mRNA expression and activity in pectoralis muscle

Scavenging toxic free radicals and peroxides by anti-oxidant is believed to be one of the main red/ox regulation mechanism to prevent against oxidative stress (Pamplona & Costantini 2011). Transcriptional expression of genes encoding the main free radical scavenging enzymes is significantly up regulated in pectoralis muscle of SA as compared to NI. These include superoxide dismutase (SOD, +34%), glutathione peroxidase (GPX4, +92%), glutathione S-transferase 3 (MGST3, +52%), the peroxiredoxin 3 (PRDX3, +34%) and both metallothionein 3 and 2A (MT3, +180 confirmed at a higher level of integration by measuring *in vitro* activity on frozen tissue. **Table 2** shows that tissue activity of SOD, GPX and Catalase was considerably improved in pectoralis muscle of SA as compared to NI (+160%, +32% and +44%, respectively, see **Table 2**).

	Terrestrial juveniles	Sea acclimated juveniles	% variation
Muscle anti-oxidant enzymes activity:			
SOD (U.mg protein ⁻¹)	4.8 ± 0.4 (6)	12.5 ± 3.2 * (10)	+160%
GPX (nmol.mg protein ⁻¹)	5.8 ± 0.2 (6)	8.0 ± 0.5 * (10)	+32%
CAT (K.min.g protein ⁻¹)	15.8 ± 0.8 (6)	22.1 ± 2.8 * (5)	+44%

Table 2: Muscle main anti-oxidant enzyme activities in terrestrial pre fledging vs. sea-acclimatized juveniles king penguins. SOD: Superoxyde dismutase, GPX: Glutathion peroxydase, CAT: Catalase. Means are presented ± S.E.M., number of independent preparation is given in brackets, “*” indicates significant differences between groups ($p < 0.05$).

Acclimation to sea also leads to the upregulation of the cytoprotective anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic heme oxygenase protein1 (HMOX1, +165%). HMOX1 degrades intracellular free heme (a powerful pro-oxidant) to produce biliverdin which in turn is converted into bilirubin (a strong anti-oxidant) by the biliverdine reductase (BLVRA, +42%, see cluster 2). The stimulation of HMOX1 and BLVRA in SA birds may constitute an anti-oxidant defense mechanism, particularly against heme-mediated oxidative stress.

Mitochondrial membranes phospholipids acyl composition and susceptibility to ROS.

The imbalance between toxic free radicals generation and its breakdown by multiple anti-oxidant processes leads to oxidation of main constitutive molecules such as membrane lipids. However, the extent of oxidative damage to membranes, highly depends on its intrinsic susceptibility to ROS that is mainly a function of lipid composition and fatty acid saturation (Hulbert *et al.* 2007). By modifying the number of double bonds in their fatty acid, membranes can modify their intrinsic susceptibility to ROS i.e. a reduction in the number of double bonds resulting in a lower susceptibility to ROS. Therefore, we next examine expression of the enzymes involved in membrane reshuffling and established the acyl composition of mitochondrial membranes in order to establish the relative susceptibility to ROS by calculating the Unsaturation and the Peroxidation Index.

Microarray analysis revealed a significant increase of the stearoyl-CoA desaturase (SCD5) gene expression in pectoralis muscle of SA (See Cluster 3). SCDs, also called delta-9-desaturases, catalyze the formation of monosaturated fatty acid by creating carbon/carbon double bond in saturated stearoyl-CoA. By converting saturated fatty acid into omega-9-monounsaturated fatty acid, enhanced activity of the delta-9-desaturase may thus lead to higher susceptibility to ROS of the SA's mitochondrial membrane.

Figure 2 presented the acyl composition of mitochondrial phospholipids isolated in pectoral muscle of SA and NI penguins. As also shown in **Table 3**, relative content of unsaturated fatty acid was not affected by acclimatization to marine life. In accordance with the transcriptional induction of SCD5 gene, the relative proportion of delta-9-monounsaturated fatty acid (18:1w9, see **Figure 2**) was significantly increased in mitochondrial membrane of SA as compared to terrestrial controls. However, when taken together, relative amount of total monosaturated fatty acid remains unchanged between NI and SA birds. Phospholipids of SA mitochondria showed significant reduction of di- and tetra-unsaturated fatty acid (**Table 3**). This was mainly caused by a significant reduction in the relative abundance of 18:2w6, 20:2w6, 18:4w3 and 20:4w3 (**Figure 2**). By contrast, analysis of phospholipid fatty acids shows a large increase of penta-unsaturated 20:5w3 and hexa-unsaturated 22:6w3 in mitochondrial membrane of SA as compared to NI (**Figure 2, Table 3**). On the whole, SA

mitochondrial membranes are characterized by higher Unsaturation Index (UI) and higher Peroxidation Index (PI) as compared to NI (**Table 3**). Contrary to expectation, mitochondrial membrane of sea acclimatized birds appeared more susceptible to ROS than those of NI.

	Terrestrial juveniles	Sea acclimated juveniles	% variation
SFA	25.8 ± 2.1	26.6 ± 0.8	NS
MUFA	28.9 ± 2.4	33.6 ± 1.56	NS
DI	12.6 ± 2.1	6.2 ± 0.4 **	-51%
TETRA	14.7 ± 3.5	8.7 ± 0.6 *	-41%
PENTA	7.8 ± 1.5	14.3 ± 0.8 ***	+84%
HEXA	2.4 ± 0.5	6.1 ± 0.6 ***	+154%
Unsaturation Index	160.3 ± 9.4	189.3 ± 6.7 *	+18%
Peroxidation Index	130.4 ± 13.6	176.9 ± 9.6 *	+35%

Table 3: Acyl composition of mitochondrial skeletal phospholipid. Saturated (SFA), mono-unsaturated (MUFA) and poly-unsaturated (Di, Tetra, Penta and Hexa-saturated) fatty acyl chain content was measured in mitochondrial preparation using gas chromatography (GC). Susceptibility of mitochondrial membranes to oxidative damages to lipoxidation was assessed by calculating the Unsaturation Index and the Peroxidation Index (See Material and Methods section). Percentage are presented as mean ± S.E.M.. “*”, “**” and “***” indicates significant difference at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively.

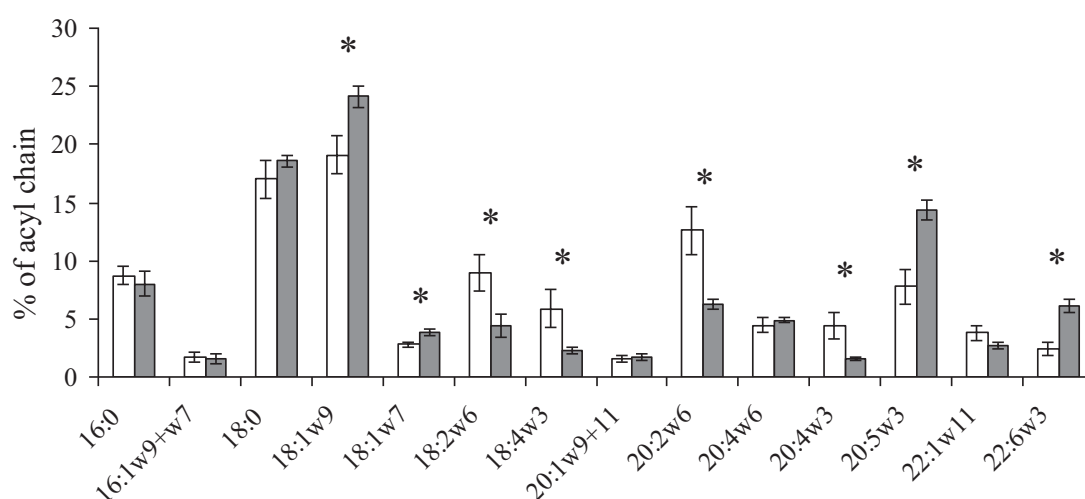


Figure 2: Acyl composition of skeletal muscle phospholipids from of terrestrial (open bar) vs. sea-acclimatized (filled bar) king penguins juveniles. Results are presented as mean ± S.E.M., * indicates $p < 0.05$.

Genes involved in cytoprotection: heat shock proteins (HSP)

HSP represent a large class of functionally related proteins with strong evolutionary conservation over taxa. These proteins play a crucial role in preventing from oxidative stress by either chaperoning other proteins, facilitating protein folding, activating degradation of abnormal proteins and inhibiting apoptosis (Kalmar & Greensmith 2009).

The primary level of heat shock gene regulation occurs via transcriptional activation of heat shock transcription factor (HSF). As presented in Cluster 4 (**Table 1**), HSF regulating factors (HSF3 and 4) are significantly up-regulated in SA penguins suggesting the activation of a stress response. It results that the genes encoding small 8 kilodalton proteins such as ubiquitin (see Cluster 6), but also the crystalline A and B (Cluster 4) and the HSP32 (or Heme Oxygenase 1, HMOX1, see Cluster 2) are up-regulated in SA.

However, contrary to expectations, transcriptional microarray data revealed that gene encoding high molecular weight heat shock proteins such as HSP70, HSP60 or HSP40 appeared to be down-regulated after acclimatization to marine life (Cluster 4).

Expression profiles of genes involved in damaged molecules repairs and degradation

Finally, the ultimate alternative to avoid oxidative stress is to limit the oxidized molecule accumulation by activating repairs mechanism and/or, when tolerance endpoint are exceeded, by stimulating degradation of terminally damaged macromolecules.

We next explore whether sea acclimatization affect pathway of gene expression that control repair and/or degradation processes of membranes, protein and nucleic acid.

i) Lipids repairs

Membrane lipids, and especially those of the mitochondrial membranes, are continuously exposed to oxidative challenges. First, repair mechanisms of peroxidized lipids are crucial because they limit autocatalytic chain reactions of peroxy radicals with other lipid molecules (peroxidation propagation). Secondly, by affecting fluidity and selective permeability of membranes, peroxidation of lipids affect integrity and functionality of key subcellular component such as mitochondria. Hydroperoxides are reduced to their corresponding hydroxyl fatty acid thanks to the activity of the glutathione peroxidase and the glutathione-transferase. As already describe above, gene expression of these two genes (and activity of GPX) is augmented in penguins after acclimatization to marine life (see **Table 1** Cluster 2, **Table 2**).

ii) DNA repairs (see Demple and Harrison 1994)

Protection against genomic instability has been considered as a crucial response to oxidative stress (Davies 2000). Oxidation may cause several type of damages to deoxynucleotides, including single- or double-strand breaks, sister chromatid exchange, DNA-DNA or DNA-protein cross link, DNA base-pairing mismatches and DNA nucleotide adduct (Davies 2000). To prevent from damaged DNA accumulation, cells display a battery of enzymes dedicated to DNA maintenance or repairs.

Microarray data analysis shows that differentially expressed genes involved in DNA maintenance and repair mechanisms are up-regulated in pectoralis muscle of penguins that have previously experienced a foraging trip at sea. These include: DNA binding proteins (LON, +60% (Smith CK, 1999), see Cluster 6), proteins implicated in detection of DNA damages (DDB1, +40% ; DDB2, +21% ; Rad23, +24% ; Rad51, +22-52%), in nucleotide excision (ERCC4, +45%) and/or in DNA strand break repair (RCF1, +89% ; XRCC4, +22% ; POLE, -26% ; Rad21, +37% ; PARP6, +22% ; PARP8, +24% ; PARP16, +35% ; (see Cluster 5-**Table1**) (Kültz 2005).

iii) Proteins repair or degradation

Excessive ROS generation may induce oxidative and structural (unfolding) damages on proteins that affect their functionality. Ultimately, accumulation of damaged proteins is detrimental to normal cell functioning. To prevent their cellular accumulation, oxidative damaged proteins can be repaired by enzymes ; structurally damaged proteins can be refolded by chaperone proteins ; but terminally damaged proteins have to be removed by proteolytic degradation and re-synthesised de novo (Kültz 2005). Microarray analysis shows that the Methionine Sulfoxide Reductase, being one of the major enzyme involved in the recognition and repair of oxidative protein damage, is up-regulated in SA penguins (MSRA, +57%, see Cluster 6). The main enzymes involved in the glutathione pathway - that also restore function of oxidized proteins (review in Kültz 2005) - are also up regulated in SA (GPX4, +92% ; MGST3, +52% ; see Cluster 2).

Micoarray analysis also showed that acclimation to marine life stimulates expression of gene encoding proteolytic enzymes such as the regulatory protease Lon Peptidase (LONP2, +60% ; LONRF1,+24%), the proteasome maturation factor (POMP, +25%) and the subunits of the ATP-hydrolyzing 26S proteasome complex (PSMC3, PSMC6, PSMD4, +28%, +62%, +26%, respectively, see Cluster 6). Except for the gene encoding proteasome activator subunit 3 (PSME3, -25%), great majority of the differentially expressed gene shows a transcriptomic activation of the proteasome subunit (Cluster 6).

Finally, all of the nine differentially expressed genes encoding ubiquitin or involved in

ubiquitin activation, are up-regulated in pectoralis muscle of SA. These small molecular weight heat shock proteins plays a critical role in protein turnover by being linked to proteins marked for degradation.

Symbol	Name	PPSets	log2 (SA/NI)	SA/NI	P value
Cluster 1 : Genes encoding non mitochondrial ROS generating proteins					
PXDN	peroxidasin homolog (Drosophila)	Gga.14999.1.S1_at	-1,201	-56	0,004
DUOXA1	dual oxidase maturation factor 1	GgaAffx.1645.3.S1_s_at	0,282	22	0,017
DUOX2	dual_oxidase_2	GgaAffx.1631.1.S1_s_at	-0,353	-22	0,029
NOX1	NADPH oxidase 1	GgaAffx.22036.3.S1_s_at	-0,300	-19	0,042
AOX1	aldehyde oxidase 1	GgaAffx.5165.3.S1_at	-0,489	-29	0,031
AOX2	aldehyde oxidase 2	GgaAffx.5165.4.S1_s_at	0,683	61	0,003
SCARF1	scavenger receptor class F, member 1	GgaAffx.215.1.S1_at	-0,549	-32	0,017
SCARF1	scavenger receptor class F, member 1	Gga.7260.2.S1_at	-0,735	-40	0,000
ANGPTL 4	angiopoietin-like 4	GgaAffx.395.1.S1_at	-0,307	-19	0,033
SIRT1	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1	GgaAffx.1802.1.S1_at	0,482	40	0,008
SIRT5	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 5	Gga.12456.1.S1_at	0,822	77	0,002
SIRT6	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 6	GgaAffx.23594.1.S1_at	0,360	28	0,042
TNFRSF1 1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFKB activator	GgaAffx.8155.1.S1_at	-0,425	-26	0,024
TNFRSF1 8	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	GgaAffx.11426.1.S1_at	-0,512	-30	0,007
TNFRSF2 1	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	Gga.4943.1.S1_at	-1,162	-55	0,012
Cluster 2 : Anti-oxidant enzymes					
SOD1	superoxide dismutase 1	Gga.3346.1.S1_a_at	0,420	34	0,025
GPX4	Glutathione Peroxidases	Gga.107.1.S1_at	0,942	92	0,000
MGST3	microsomal glutathione S-transferase 3	Gga.7258.1.S1_at	0,601	52	0,010
PRDX3	peroxiredoxin 3	Gga.4515.3.S1_a_at	0,419	34	0,015
TXNDC1 0	thioredoxin domain containing 10	Gga.17473.1.S1_s_at	-0,957	-49	0,000
MT3	metallothionein 3	GgaAffx.9262.1.S1_at	1,484	180	0,005
MT2A	metallothionein 2A	Gga.4210.1.S1_at	2,058	316	0,001
HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	Gga.2039.1.S1_at	1,405	165	0,027
HMOX2	heme oxygenase (decycling) 2	Gga.9310.1.S1_s_at	-0,574	-33	0,003
BLVRA	biliverdin reductase A	GgaAffx.23872.1.S1_at	0,507	42	0,039
Cluster 3 : Genes involved in lipids membranes composition					
MBOAT2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	GgaAffx.10502.2.S1_s_at	0,916	89	0,027
MBOAT2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	GgaAffx.12171.1.S1_s_at	0,797	74	0,028
SCD5	stearoyl-CoA desaturase 5	Gga.6052.3.S1_a_at	0,362	28	0,048
SCD5	stearoyl-CoA desaturase 5	Gga.1455.1.S1_at	0,747	68	0,032

Cluster 4 : Genes encoding heat choc and chaperone proteins

DNAJA4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	Gga.5900.3.S1_a_at	-0,508	-30	0,010
DNAJA4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	Gga.10697.1.S1_at	-0,525	-31	0,018
DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	GgaAffx.5976.1.S1_s_at	-0,875	-45	0,019
DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	GgaAffx.12760.1.S1_s_at	-1,503	-65	0,000
DNAJC6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6	GgaAffx.23432.1.S1_s_at	-0,478	-28	0,004
HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	Gga.4555.1.S1_a_at	-0,707	-39	0,003
HSPA14	heat shock 70kDa protein 14	Gga.19503.1.S1_at	-0,609	-34	0,002
HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	Gga.1809.1.S1_at	-0,450	-27	0,008
HSPB7	heat shock 27kDa protein family, member 7	Gga.11398.1.S1_at	0,948	93	0,000
HSPD1	heat shock 60kDa protein 1	GgaAffx.11965.1.S1_s_at	-0,541	-31	0,004
HSPD1	heat shock 60kDa protein 1	Gga.9897.1.S1_at	-0,752	-41	0,000
HSPE1	heat shock 10kDa protein 1	Gga.4873.1.S1_a_at	-0,547	-32	0,002
HSF4	heat shock transcription factor 4	GgaAffx.2032.2.S1_s_at	0,448	36	0,022
HSP70	heat shock protein 70	Gga.4942.1.S1_at	-0,878	-46	0,000
HSP67B2	similar to Heat shock protein 67B2	Gga.16163.1.S1_s_at	1,380	160	0,000
HSF3	similar to heat shock factor 3	Gga.5116.3.S1_a_at	0,331	26	0,023
CRYAA	crystallin, alpha A	GgaAffx.10353.1.S1_at	0,394	31	0,027
CRYAB	crystallin, alpha B	Gga.1999.1.S1_a_at	0,966	95	0,021

Cluster 5 : Genes involved in DNA repara processes

PARP6	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 6	Gga.1599.1.S1_s_at	0,287	22	0,045
PARP8	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8	GgaAffx.24537.1.S1_s_at	0,307	24	0,040
PARP16	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 16	Gga.8044.1.S1_at	0,431	35	0,037
TOP1	topoisomerase (DNA) I	Gga.3987.1.S1_s_at	0,310	24	0,011
XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	Gga.12290.1.S1_at	-0,553	-32	0,003
XRCC4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	GgaAffx.24733.1.S1_s_at	0,281	22	0,025
ERCC4	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4	GgaAffx.12489.1.A1_at	0,541	45	0,032
RAD21L1	RAD21-like 1 (S. pombe)	GgaAffx.3857.1.S1_at	0,451	37	0,022
RAD51L3	RAD51-like 3 (S. cerevisiae)	Gga.9680.1.S1_a_at	0,602	52	0,048
RAD51L3	RAD51-like 3 (S. cerevisiae)	Gga.9680.1.S1_x_at	0,290	22	0,035
RAD23B	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)	Gga.1359.1.S1_at	0,312	24	0,037
DDB1	damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa	Gga.5146.1.S1_at	0,487	40	0,007
DDB2	damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa	GgaAffx.12520.1.S1_s_at	0,270	21	0,048
POLE	polymerase (DNA directed), epsilon	GgaAffx.4785.1.S1_at	-0,441	-26	0,003
POLE3	polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	Gga.5487.1.S1_at	-0,625	-35	0,006

RFC1	replication factor C (activator 1) 1, 145kDa	GgaAffx.20533.1.S1_s_at	0,915	89	0,000
UNG	uracil-DNA glycosylase	Gga.4682.1.S1_at	-0,419	-25	0,036
MBD4	methyl-CpG binding domain protein 4	Gga.3616.1.S1_at	-0,301	-19	0,034

Cluster 6 : Genes involved in damaged proteins repairs and degradation

MSRA	methionine sulfoxide reductase A proteasome (prosome, macropain)	GgaAffx.25021.1.S1_s_at	0,654	57	0,001
PSMA7	subunit, alpha type, 7 proteasome (prosome, macropain)	Gga.2045.2.S1_a_at	0,579	49	0,006
PSMB1	subunit, beta type, 1 proteasome (prosome, macropain)	Gga.4653.2.S1_a_at	0,384	31	0,043
PSMB3	subunit, beta type, 3 proteasome (prosome, macropain) 26S	Gga.1459.1.S1_at	0,517	43	0,000
PSMC3	subunit, ATPase, 3 proteasome (prosome, macropain) 26S	Gga.4649.1.S1_s_at	0,361	28	0,008
PSMC6	subunit, ATPase, 6 proteasome (prosome, macropain) 26S	Gga.16005.1.S1_s_at	0,601	52	0,032
PSMD4	subunit, non-ATPase, 4 proteasome (prosome, macropain)	Gga.6030.1.S1_s_at	0,330	26	0,010
PSME3	activator subunit 3	Gga.5999.2.S1_at	-0,418	-25	0,021
_	proteasome C1 subunit	GgaAffx.8554.1.S1_x_at	0,333	26	0,026
POMP	proteasome maturation protein	Gga.5765.1.S1_at	0,317	25	0,020
SMURF1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	GgaAffx.2883.1.S1_s_at	0,809	75	0,011
UBB	ubiquitin B	Gga.2501.2.S1_at	0,409	33	0,023
UBE2G2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (UBC7 homolog, yeast)	Gga.19739.1.S1_at	0,377	30	0,003
UBE4B	ubiquitination factor E4B (UFD2 homolog, yeast)	GgaAffx.25563.1.S1_s_at	0,386	31	0,014
UCHL1	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	Gga.9618.1.S1_at	2,221	366	0,000
UCHL5	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5	GgaAffx.12236.1.S1_s_at	0,607	52	0,029
UFD1L	ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast)	Gga.3094.1.S1_at	0,438	36	0,010
UIMC1	ubiquitin interaction motif containing 1	GgaAffx.766.1.S1_at	0,707	63	0,015
UIMC1	ubiquitin interaction motif containing 1	GgaAffx.768.2.S1_at	0,665	59	0,001
WWP1	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	Gga.4998.1.S1_s_at	0,451	37	0,039
WWP1	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	GgaAffx.24796.1.S1_at	0,451	37	0,022
LONP2	lon peptidase 2, peroxisomal	Gga.12947.1.S1_s_at	0,680	60	0,000
LONRF1	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1	GgaAffx.8741.1.S1_at	0,305	24	0,041
ATXN3	ataxin 3	Gga.12408.1.S2_at	-0,847	-44	0,000
NBR1	neighbor of BRCA1 gene 1	Gga.9984.1.S1_s_at	0,427	34	0,014

Cluster 7 : Other genes

DGKZ	diacylglycerol kinase, zeta 104kDa	Gga.5646.1.S1_at	0,543	46	0,020
NUDT7L	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 7	Gga.12242.1.S1_at	0,652	57	0,031
NUDT3	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 3	GgaAffx.1827.1.S1_at	0,553	47	0,017

Table 1. Microarray data analysed by the MaxRS algorithm and focused on the genes encoding proteins involved pro and anti-oxidant pathways. Transcriptomic analysis was performed from pectoral muscle biopsies collected on never-immersed or sea-acclimatized king penguin juveniles.

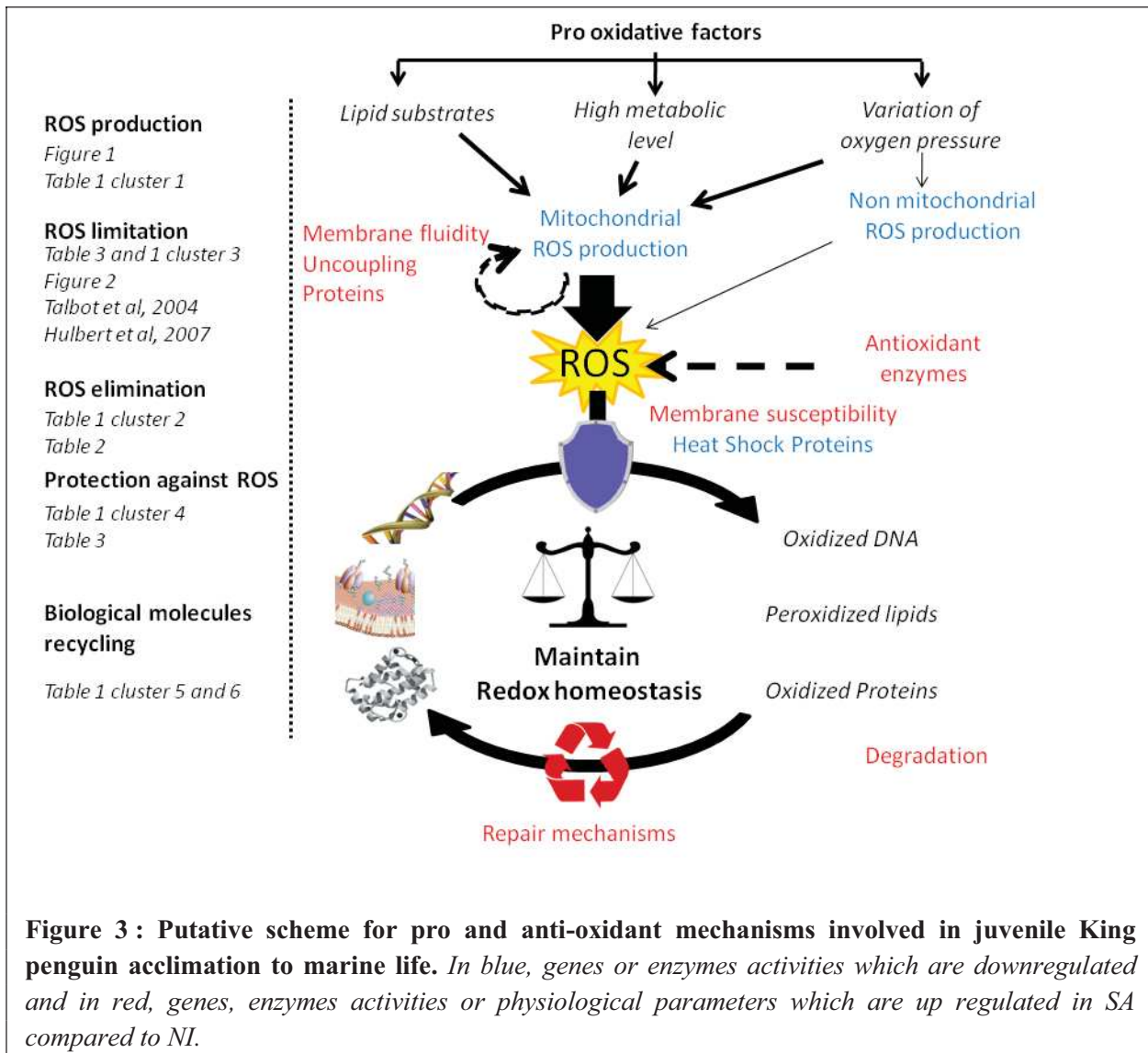


Figure 3 : Putative scheme for pro and anti-oxidant mechanisms involved in juvenile King penguin acclimation to marine life. In blue, genes or enzymes activities which are downregulated and in red, genes, enzymes activities or physiological parameters which are up regulated in SA compared to NI.

Principaux résultats présentés dans la publication 3

Effets de l'acclimatation au milieu marin sur les mécanismes producteurs de ROS

La mesure *in vitro* de la production basale d'H₂O₂ par les mitochondries indique que les manchots du groupe SA ont une production d'H₂O₂ 50% inférieure aux oiseaux du groupe NI. Ceci s'accompagne d'une diminution globale de l'expression des gènes codant pour des enzymes dont l'activité produit des ROS, tel que la NADPH oxydase (-30% ; p<0,05) ou l'aldéhyde oxydase1 (-49% ; p<0,05) par exemple.

Augmentation de l'expression et de l'activité des enzymes anti-oxydantes chez les oiseaux acclimatés au milieu marin

L'acclimatation au milieu marin induit une augmentation de l'expression des gènes codant pour les enzymes anti-oxydantes comme la superoxyde dismutase (+42% ; p<0,05), la glutathion peroxydase (+94% ; p<0,05), la glutathion-S-transférase 3 (+60% ; p<0,05), etc. Ces modifications transcriptionnelles s'accompagnent d'une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion peroxydase (+160%, +44% and +32%, respectivement).

Composition en phospholipides des membranes mitochondriales et susceptibilité aux ROS

Selon leur composition en phospholipides, les membranes sont plus ou moins susceptibles aux attaques radicalaires. L'étude de la composition des membranes mitochondriales a montré de façon surprenante que les membranes des mitochondries des manchots acclimatés au milieu marin possèdent des index d'insaturation (+18% ; p<0,05) et de peroxydation lipidique (+35% ; p<0,05) supérieurs aux manchots non acclimatés. Ceci se traduit par une augmentation de la susceptibilité membranaire aux attaques radicalaires chez les animaux SA par rapport aux NI.

Augmentation de l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation/dégradation des molécules endommagées par les ROS

Grâce à notre approche par puces à ADN, nous avons pu déterminer la variation d'expression de nombreux gènes impliqués dans les mécanismes de réparation / dégradation des molécules

endommagées par les ROS. Nous avons observé une réponse cellulaire coordonnée, en faveur d'une stimulation des mécanismes de lutte contre les altérations des différentes molécules biologiques (lipides, protéines, ADN) lors du passage du milieu terrestre au milieu marin. Ces résultats suggèrent que la vie marine favorise l'apparition de dommages sur les molécules biologiques, certainement compensés par l'activation des mécanismes de réparation/dégradation, permettant à ces oiseaux longévifs de conserver leur intégrité cellulaire.

3 –La croissance en milieu polaire, un défi énergétique pour le poussin manchot Adélie.

Les résultats présentés dans cette partie seront développés dans la publication suivante :

Publication n°4 : Growth or thermogenesis: a dilemma for Adélie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*) towards successful development in Antarctica.

.

Cyril Dégletagne, Damien Roussel, Steve Harvey, Jean-Louis Rouanet, Fanny Baudimont, Claude Duchamp and Mireille Raccurt

Soumise à Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences

Publication n°4 : Growth or thermogenesis: a dilemma for Adélie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*) towards successful development in Antarctica.

Grandir ou thermoréguler, le dilemme du poussin manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*) pour réussir son émancipation totale.

Les conditions climatiques extrêmes de l'Antarctique laissent peu de temps aux espèces endémiques pour se reproduire. Même si les ressources alimentaires marines sont abondantes, le nourrissage des nouveaux nés est entièrement dépendant de l'effort parental. Face aux contraintes de froid et d'apport énergétique réduit, un petit nombre d'espèces a développé des adaptations sophistiquées pour coloniser ces régions inhospitalières en particulier pour les endothermes, parmi lesquelles le manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*).

A l'éclosion, le poussin manchot Adélie est un organisme immature, incapable de maintenir sa température corporelle sans la protection thermique des parents. Après 2 semaines de vie et l'acquisition de son endothermie, pré-requis à son émancipation thermique, il peut quitter la poche incubatrice et permettre aux 2 parents de multiplier les voyages alimentaires. Le poussin est donc confronté à un véritable challenge énergétique puisqu'il n'a que le court été polaire pour acquérir une masse corporelle suffisante, mettre en place des processus thermogènes efficaces, gérer le coût énergétique de la mue avant son départ en mer, l'étape clé de son émancipation nutritionnelle.

Au cours de cette étude, nous avons cherché à comprendre comment le poussin manchot Adélie résout ce challenge énergétique au cours des 2 mois qui suivent l'éclosion. Dans une approche intégrative, nous avons caractérisé la stratégie utilisée par ces oiseaux pour combiner dans un temps relativement court leur croissance et le maintien de leur endothermie. Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur l'étude des différents mécanismes cellulaires et moléculaires régulant le développement du muscle pectoral, tissu thermogène dont la maturation est indispensable pour permettre la locomotion du juvénile en mer.

Growth or thermogenesis: a dilemma for Adélie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*) towards successful development in Antarctica.

by

Cyril Dégletagne¹, Damien Roussel¹, Steve Harvey², Jean-Louis Rouanet¹, Fanny Baudimont¹, Claude Duchamp¹ and Mireille Raccurt^{1*}

(1) Université de Lyon, Lyon, F69003, France ; Université Lyon 1, Villeurbanne, F69622, France ; ENTPE, Vaulx en Velin, F69518, France ; CNRS, UMR5023 Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Villeurbanne, F-69622, France.

(2) Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Alberta, Edmonton T6G 2H7, Canada

Corresponding Author : Dr Mireille Raccurt, Université de Lyon, CNRS, UMR5023 Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, 43 bld 11 novembre 1918, Villeurbanne, F-69622, France. Tel : 00 33 4 7244 8236 - fax : 00 33 4 7243 1172 - email : mireille.raccurt@univ-lyon1.fr

Abstract

Growing in a cold environment represents severe challenges of time and energy allocation for Adélie penguin chicks which must rapidly grow while developing efficient muscular thermogenic mechanisms during the short Antarctic summer. By an integrative approach including metabolic, morphological, histochemical, biochemical and genes expression analysis, the present study defines three major metabolic phases in the development of a fully endothermic Adélie penguin. During the nestling phase (age 0-11 days), when heterothermic chicks benefit of parental thermal protection, the high mRNA levels of growth hormone receptor and IGF1 receptor support a high post-natal growth rate. After a transition period of cold exposure during the crèche phase (14-40 days), chicks thermoregulate independently, becoming true endotherms at 15 days of age with the development of oxidative muscle phenotype and the ability to perform shivering efficiently. At day 30, when chicks have reached their juvenile body mass and completed their fat store, a metabolic shift from carbohydrate to lipid metabolism occurs at the onset of the development of non-shivering thermogenesis. The up-regulation of lipoprotein lipase and mitochondrial adenine nucleotide translocase and uncoupling protein at day 60, through the regulation of T3 receptor β and PGC1 α , suggest the late development of a fatty acid-enhanced muscle non-shivering thermogenesis mechanism. Present results show that high post-natal growth rate precedes the development of thermogenic processes, a fine time scheduled strategy whereby Adélie penguin succeed in their departure to sea on time.

Introduction

The maintenance of a high body temperature in harsh cold environment requires elaborate complementary processes, which include behavioral adaptation, thermal insulation and heat production. This is particularly problematic for growing chicks that exhibit a high area-to-body mass ratio, favoring heat losses (Duchamp *et al.* 2002). In this context, an early development of compensatory heat production processes would reduce growth rate (Ricklefs 1979). For instance, cold-induced loss of energy constrains ducklings to allocate substantial energy to develop thermogenic capacity, which in turn negatively impacts their growth rate, despite an increased food intake (Bénistant *et al.* 1998 ; Teulier *et al.* 2010). Because the summer period is short in polar region, this dilemma between producing heat for thermoregulatory purpose and growing fast to mature in time becomes a critical constraint for young birds.

This situation is particularly challenging for Adélie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*) that have less than two months to rapidly grow, build up energy reserves, molt and develop efficient thermogenic mechanisms to succeed in their departure to sea (Bucher *et al.* 1990 ; Raccurt *et al.* 2008). Similar to other semi-altricial penguins, hatching Adélie penguin chicks are ectothermic and cannot maintain stable body temperature without parental brooding (Taylor 1985 ; Bucher *et al.* 1990 ; Duchamp *et al.* 2002). Chicks are brooded until 12-14 days and then must thermoregulate independently. During this period of thermal emancipation, they form crèches to reduce thermal stress and encounter their parents only during brief feeding visits, until the final molting phase when parental feeding ceases to stimulate their departure to sea. The rapid ontogeny of endothermy, which is of critical importance for the survival of young penguins, is also ensured by a rapid increase in thermal insulation elicited by a high overall growth rate that decreases the area-to-body mass ratio and then enhances the capacity of young birds to thermoregulate (Duchamp *et al.* 2002). The development of adipose tissue also constitutes an insulative layer against cold and an energy store to fuel heat production and growth processes (Raccurt *et al.* 2008). The rapid growth of muscle (Raccurt *et al.* 2008), a major thermogenic organ in birds (Duchamp *et al.* 1991 ; Duchamp & Barré 1993), suggests that muscle thermogenic mechanisms should be a key element to sustain endothermy, but the exact nature of these processes (shivering or non-shivering thermogenesis) remains to be investigated in Adélie penguin chicks.

The aim of this work was therefore to investigate the ontogeny of thermoregulatory mechanisms of growing Adélie penguin chicks from hatching to full emancipation. To evaluate the capacity and characterize the nature of thermogenic processes, metabolic heat production, shivering activity and body temperature were simultaneously measured at different ambient temperatures in growing chicks. The morphological and enzymatic maturation of pectoral muscle was measured, as well as the expression of avian uncoupling protein (avUCP) and adenine nucleotide translocase

(avANT), two mitochondrial proteins which have been associated with the development of non-shivering thermogenesis (Raimbault *et al.* 2001 ; Toyomizu *et al.* 2002 ; Collin *et al.* 2003a ; Talbot *et al.* 2003 ; Talbot *et al.* 2004 ; Rey *et al.* 2010b). To explore a possible transcriptional regulation of thermogenic mechanisms, we measured the expression of genes encoded PGC1 α and thyroid receptor, which are implicated in mitochondrial biogenesis and muscle fiber specialization (Ueda *et al.* 2005). Because growing in Antarctica over the short cold summer period requires a tight regulation in the energy allocated to competitive functions (somatic growth versus heat dissipation), we also measured the muscle expression of growth factors to determine the strategy whereby Adélie penguins succeed their departure to sea on time.

Materials and methods

Ethical approval for all procedures was granted by the ethics committee of the French Ethic Committee of the Institut Polaire Paul Emile-Victor (IPEV) and by the Polar Environment Committee of the Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF). Our experiments conformed to the Code of Ethics of Animal Experimentation in the Antarctic.

Experimental design and animals

The study was conducted at Dumont d'Urville, Adélie Land (66°07'S – 140°00'E) in Pointe Geologie archipelago where about 34,000 pairs of Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*) nest every year. Tissues and blood samples were collected during three summer seasons. Following our program authorization, a total of 24 Adélie chicks were euthanized (6 chicks for each point of growth: hatching, 7, 15 and 30 days old). Adélie penguins mostly lay two eggs and the smallest chick does not usually survive, we therefore only removed the second chicks to minimize impact of our study on breeding success. All chicks were weighed before organs, muscles and diverse tissues were quickly excised, weighed and immediately frozen in liquid nitrogen. All samples were stored at -80°C until RNA extraction or histological analysis of pectoralis muscle. A biopsy of pectoralis muscle was performed on 60 days old chicks for molecular analysis only.

Metabolic rate and shivering measurements.

Metabolic rate was measured in 7, 15 and 30 days old chicks by indirect calorimetry as previously described (Barré *et al.* 1985 ; Duchamp *et al.* 1989) using an open-circuit temperature-controlled respiratory chamber. Body (stomach) temperature was continuously monitored during the

experiment with copper-constantan thermocouples. Because of the electromagnetic activity of the scientific station, shivering was not quantified by electromyography (EMG) but by accelerometry through whole body muscle tremor, using a triaxial accelerometer (model Entran FEGAS-192) fixed on the back. Previous experiments on ducklings show that EMG and accelerometry signals occurred at the same ambient temperature and that accelerometry was as sensitive as EMG. During the experiments, birds were placed unrestrained in the metabolic chamber and left to equilibrate for 1h at the highest temperature tested for each age before metabolic rate and integrated shivering was monitored over 20 min. The ambient temperature (T_a) in the metabolic chamber was then reduced by steps, and after the 1.5 hours necessary to reach thermal equilibrium and metabolic steady state, the recording procedure was repeated. Relations between metabolic rate and T_a or shivering activity and T_a were expressed by two linear regressions lines (Scholander *et al.* 1950) that intersect at the lower critical temperature (LCT) or at the shivering threshold temperature (STT) as previously described (Barré *et al.* 1985 ; Duchamp *et al.* 1989). Therefore, LCT was determined as the T_a eliciting the first increase in metabolic rate, while STT was determined as the T_a eliciting the first increase in shivering activity. The activity of non-shivering thermogenesis (NST) was calculated as the level of metabolic rate determined at the STT temperature minus the resting metabolic rate (RMR). Hence, NST is given by the highest level of MR in the cold that is not yet accompanied by shivering activity.

Muscle histochemistry.

Samples of pectoralis muscle from 1, 7, 15 and 30 days old chicks were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Serial cross-sections (10 μm thick) were cut on a cryostat. Fresh sections were stained for myosin adenosine triphosphatase (mATPase) reactivity with preincubation conditions determined in Adélie penguin at pH 4.25, 4.45 and pH 10.3. Reduced nicotine amide adenine dinucleotide tetrazolium reductase (NADH-TR) activity was also shown at the different steps of pectoralis muscle development (Suzuki *et al.* 1985). Digital images of preparations were captured by a microscope color digitizing system (Microscope: AX-70, Olympus).

Real time PCR

Total RNAs were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). For each sample, 1 μg of total RNA was converted into double-stranded cDNA using 200 U of RT-MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 100 ng of random primers, 1 mM deoxyribonucleotides and 40 U RNase inhibitor, according to the manufacturer's instructions. Then, real-time PCR was performed in a MyiQ thermal cycler (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) using IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) to measure the expression of genes involved in growth (GHR, IGF1R), thermogenesis

(avUCP, avANT) and transcriptional regulation (PGC1 α , T3R β). Primers were defined according to chicken (*Gallus gallus*) gene sequences and synthesized by Invitrogen - Life Technologies (Cergy Pontoise, France) (**Supplemental data 1**). Specific amplification of the targeted cDNAs was confirmed by sequencing which showed more than 90% of identity compared to chicken gene sequences.

The following qPCR conditions were used: 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation for 10 s at 95°C and annealing/extension for 1 min 30 s at 60°C, according to the manufacturer's instructions. All samples were run in duplicate along with dilutions of known amounts of target sequence to quantify the initial cDNA copy number (Concentration = Efficiency ^{Δ Ct}). The results are expressed as the ratio of the target gene over β -actin mRNA concentration which was verified to exhibit non-significant variation between the different groups of cDNAs.

Genes	5' primers and 3' primers	Fragment size (bp)	Genebank accession number
ggGHR	Forward : CAACGATGACTTGTGGGTTG Reverse : CTCACCTCAGGAGCCTGTCA	95	NM_001001131
ggIGF1R	Forward : CGTGGGGACCTCAAAGTTA Reverse : CCATCCCATCAGCAATCTCT	121	NM_8050321
ggT3R β	Forward : AGCAGCAGTTCGCTATGACC Reverse : ACAGCCAGTAGTGCGACAGG	484	NM_205447
avUCP	Forward : ACAACGTCCCCTGTCCTTC Reverse : TTCATGTACCGCGTCTTCAC	299	AB088685
avANT	Forward : GATGATTGCTCAGACGGTCA Reverse : GCAATCTTCCCTCCAGCAGTC	144	XM_001235391
β -actin	Forward : GAGGAGGCCAGAGCAAGAGA Reverse : GGGTGTGAAGGTCTCAAACA	225	L08165
PGC1 α	Forward : GACTCAGGTGTCAATGGAAGTG Reverse : ATCAGAACAAGCCCTGTGGT	271	NM_001006457
PPAR γ	Forward : TACATAAAGTCCTTCCCCTGACC Reverse : TCCAGTGCGTTGAACCTCACAGC	401	AF163811
LPL	Forward : GACGGTGACAGGAATGTAGT Reverse : GAGTCAATGAAGAGAGATGGATGG	584	NM205282

Supplemental data 1. Sequence of primers used for quantitative PCR

Western Blotting

Approximately 50 mg of frozen tissue were homogenized in 5% sorbitol, 25 mM histidine, 50 mM KCl buffer containing 10 μ L/mL of protease inhibitor with a TissueLyser LT (Qiagen). Homogenates were centrifuged at 1,000 g for 5 minutes at 4°C. Protein concentrations were measured

in the supernatant using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), with bovine serum albumin as standard. 30µg of proteins with laemelli buffer (Tris/HCl 0.5M pH 6.8, SDS 10%, DTE 0.5M) were boiled at 100°C for 5 min, separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a PVDF membrane. Membranes were blocked for 1 h in TBS blocking buffer containing 5% milk and incubated overnight at 4°C with a goat anti-avANT antibody (ANT SC9299, Santa Cruz, 1:1,000) or a mouse anti-chicken GH receptor antibody (GHR Ch17, 1:2,000). The binding of antibody was detected with anti-goat peroxidase antibody produced in rabbit (Sigma, 1:10,000) or anti-mouse peroxidase antibody produced in goat (Sigma, 1:10,000) respectively and an enhanced chemiluminescence (ECL Plus) detection kit (Amersham, UK). Protein size was determined using molecular-mass standard (Euromedex, France). Quantification of autoradiography was performed by scanning densitometry. Blots were stripped at 60°C for 30 min in buffer containing 100 mM β-mercapto-ethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris/HCl pH 6.8 and rinsed extensively before being re-probed with anti-β-actin for loading control.

Statistical analysis

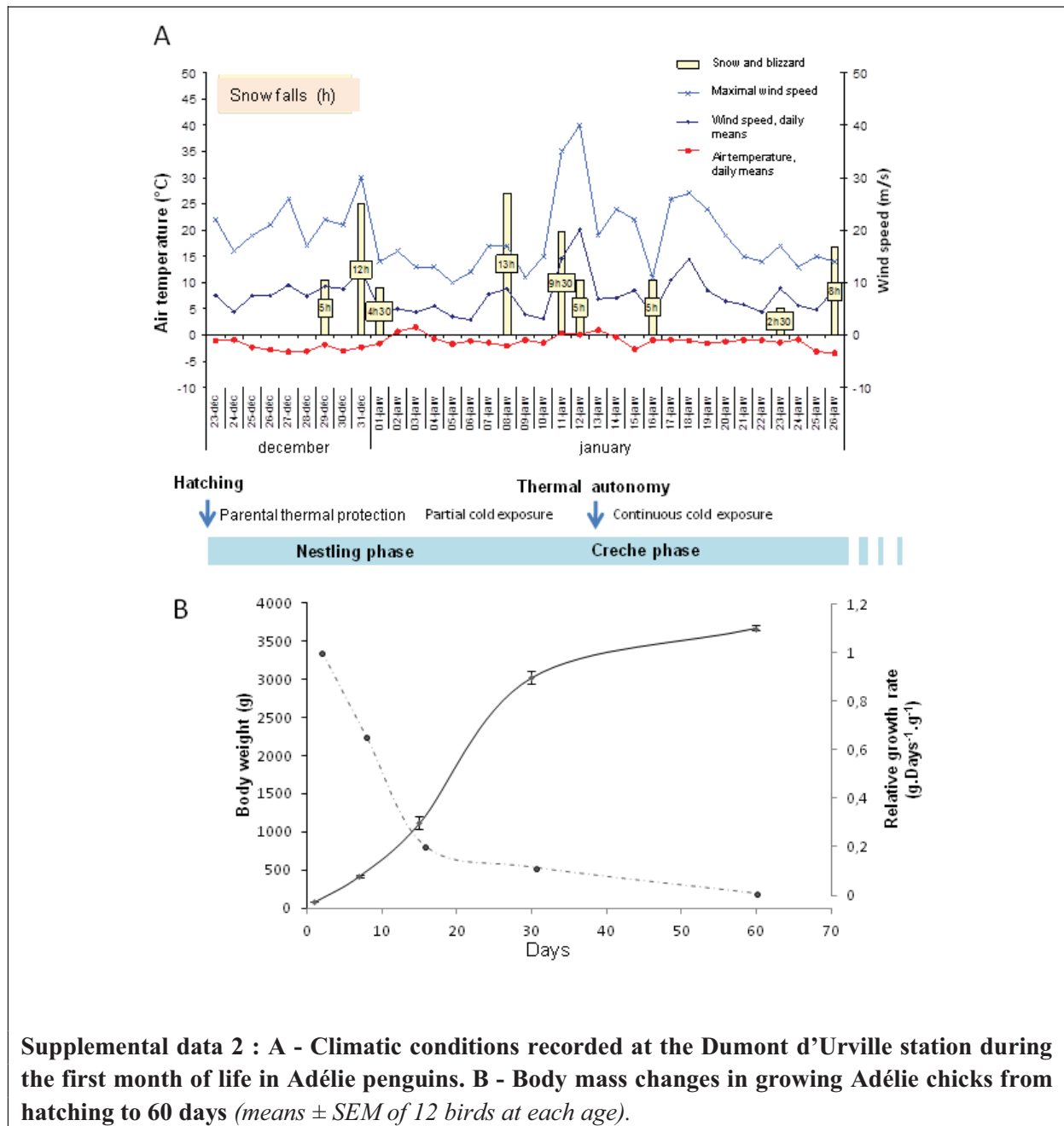
Data are expressed as mean ± S.E.M. Statistical differences have been evaluated with a Kruskal Wallis Test using StatView program. A Man Whitney post-hoc test was used for group comparison. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. A paired analysis of variance (ANOVA) was used to test at which ambient temperature shivering activity or metabolic rate became significantly different from their respective basal values. Then, regression lines were drawn as described previously (Barré *et al.* 1985 ; Teulier *et al.* 2010). The statistical significance of observed variations in metabolic parameters was assessed using one-way ANOVA. Differences between means were subsequently tested by Sheffe's test.

Results

Meteorological conditions and body growth.

Constant negative temperature, wind velocities and snow falls represent tremendous constraints for newborn and young Adélie chicks unable to maintain stable body temperature (**Supplemental data 2**). To correlate the maturation of thermoregulatory mechanisms with body growth, we therefore focus our study on 5 crucial steps of their development: hatching time (D1), day 7 (D7) characterized by optimal thermal protection, day 15 (D15) corresponding to partial exposure to

cold, day 30 (D30) when chicks are continuously exposed to harsh climatic conditions and day 60 (D60) corresponding to full emancipation.



The newly-hatched Adélie penguin chicks has a rapid growth rate, increasing its body mass more than 40-fold during the two first months and achieving 80% of its asymptotic body mass by 30 days of age while the relative growth rate decreased throughout that period (Table 1). As a consequence of body growth, surface area increased more than 12 fold from D1 to D60, while surface-to-volume ratio markedly decreased (-70%) during the first month and remained stable after (Table 1). With the increase of down thickness (Table 1), all these biological parameters allow chicks to greatly improve their insulation.

	Post-hatching age (days)				
	1	7	15	30	60
Body mass (kg)	0.087±0.001	0.427±0.015	1.116±0.082	3.023±0.083	3.670±0.031
Surface area (m ²)	0.015±0.001	0.041±0.001	0.082±0.004	0.161±0.002	0.183±0.001
S/V(cm ⁻¹)	1.736±0.011	1.046±0.013	0.750±0.017	0.533±0.004	0.499±0.001
Mean down length (mm)	7.2±0.67	11.3±0.24	15.6±0.68	36.3±1.21	–
Relative growth rate (g.Days ⁻¹ .g ⁻¹)	1	0.651	0.201	0.114	0.007

Table 1 : Changes in body mass, surface area, surface/volume ratio (S/V), mean down length and relative growth rate in growing Adélie penguin chicks. Value are mean ± sem from 6 chicks per group. Surface area was estimated from body mass ($0.077=mass^{2/3}$) according to Duchamp *et al.* 2002. Relative growth rate was estimated by calculating mass gain per day per initial mass.

Pectoralis muscle rapidly grew from D15 to D30 (x30) in comparison to quadriceps and gastrocnemius muscles (Raccurt *et al.* 2008). We therefore focused our study on pectoralis muscle because its development is essential for these marine birds capable of swimming on long distance and it represents an important source of cold-induced thermogenesis.

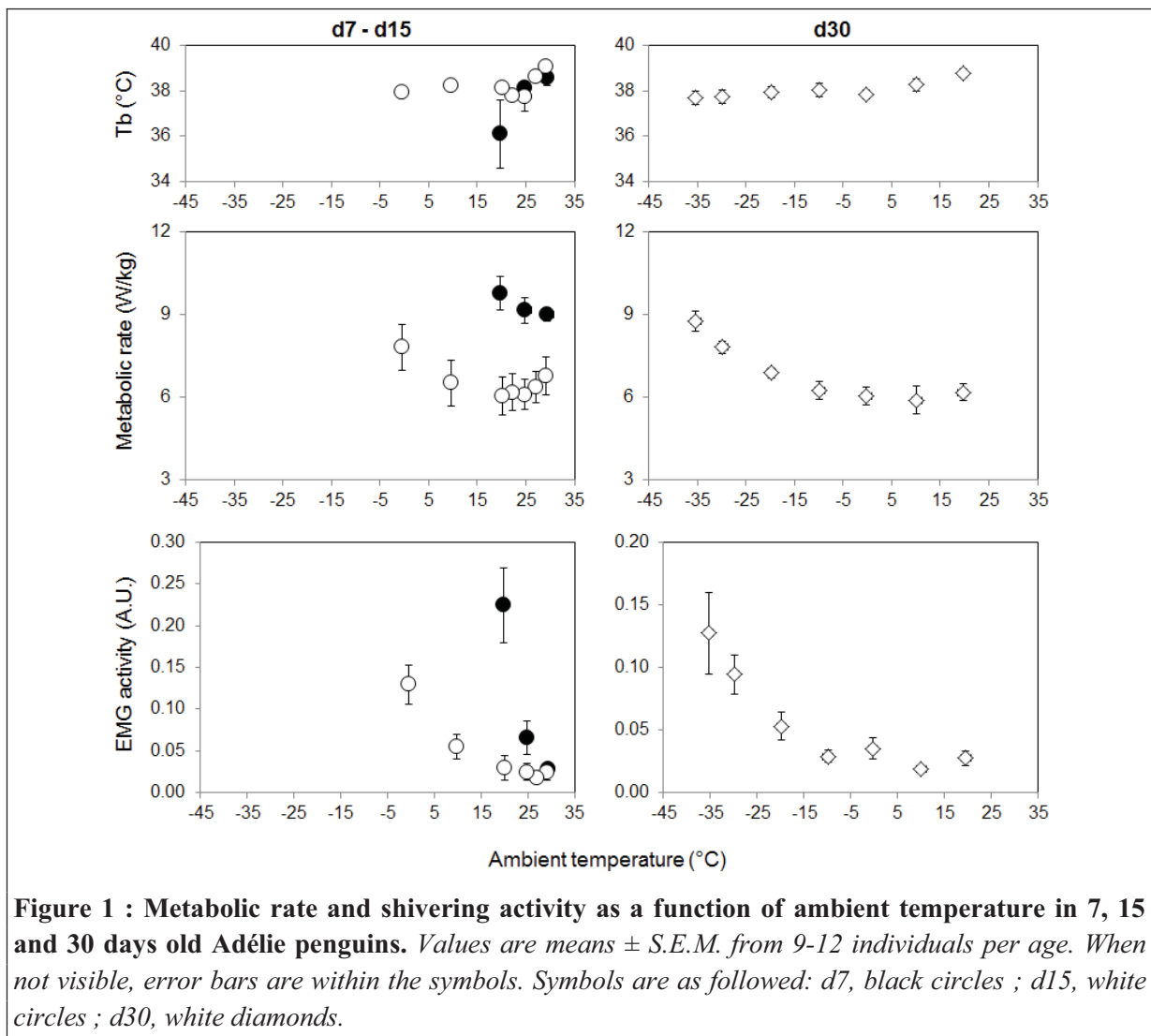
Metabolic response to cold.

LCT significantly decreased as Adélie penguin chicks grew up (**Table 2**). At temperature above LCT, RMR remained low and constant within a range of Ta that is the thermoneutral zone. Because of concomitant increases in body mass, the absolute resting energy expenditure expressed in watt per animal increased with age (**Table 2**). On the contrary, the mass specific RMR was first very high in 7-days old chicks (8.5 ± 0.2 W/kg) before to decrease during the second weeks of age to reach a plateau from 15 days (6.0 ± 0.7 W/kg) to 30 days post-hatching (5.8 ± 0.3 W/kg) (**Figure 1**). Body temperature within the thermoneutral zone was not different between groups (**Table 2**). The respiratory quotient (RQ) was high in 7-day-old chicks, indicating a predominance of carbohydrate as metabolic fuel. Then, RQ gradually decreased as penguin grew up, showing a shift from carbohydrate to lipid metabolism with increasing age. Lipids became the main energetic metabolites 30-days after hatching (**Table 2**).

	Post-hatching age (days)		
	7	15	30
Body mass (kg)	0.32 ± 0.01	0.71 ± 0.02*	2.9 ± 0.1*†
RMR (W)	2.7 ± 0.1	4.2 ± 0.6	16.6 ± 1.0*†
LCT (°C)	25.8 ± 1.0	13.7 ± 1.5*	- 11.3 ± 1.3*†
STT (°C)	> 25	13.2 ± 1.7	- 13.9 ± 1.4†
Tb in TNZ (°C)	38.2 ± 0.3	38.4 ± 0.1	38.3 ± 0.1
C (W/kg.°C)	0.34 ± 0.04	0.13 ± 0.01*	0.12 ± 0.02*
RQ	0.87 ± 0.01	0.84 ± 0.01	0.75 ± 0.01*†

Table 2: Changes in body mass, resting metabolic rates (RMR), lower critical temperature (LCT), shivering threshold temperature (STT), body temperature in thermoneutral zone (Tb in TNZ), thermal conductance (C) and respiratory quotient in growing Adélie penguin chicks. Values are means ± S.E.M. from 9-12 individuals per age. * $p < 0.05$, significantly different from 7d ; † $p < 0.05$, significantly different from 15d.

At temperature lower than the LCT, there was a significant linear increase in metabolic rate as T_a decreased (**Figure 1**). In response to cold exposure, poorly insulated 7-day-old chicks became hypothermic, indicating small capacity for regulatory thermogenesis up to the second week post-hatching period. Adélie penguins became a complete endotherm from the age of 15 days, being able to maintain their T_b in the cold (**Figure 1**). Shivering activity was simultaneously monitored with metabolic rate to determine the onset of shivering (**Figure 1**). As described for metabolic rate, the relation between shivering activity and T_a was expressed by two linear regression lines that intersect at the STT. Above this threshold temperature shivering activity was minimal and constant while below this critical temperature, shivering activity increased linearly as T_a decreased. STT decreased as penguins grew up, and it was close to LCT up to 2 weeks of age (**Table 2**). This observation indicates that shivering was the only thermogenic mechanism in growing Adélie penguin chicks during the first two weeks of age. STT became significantly different from LCT in 30-day-old chicks (**Table 2**), indicating that within this range of T_a , regulatory thermogenesis was independent of shivering. However, at 30 days of age, penguin chicks displayed a small NST capacity of 0.4 ± 0.2 W/kg (i.e. 7% above RMR).



Histochemical analysis of developmental changes in oxidative capacity of pectoralis muscle.

A morphological examination showed a progressive heightened red coloration that is characteristic of muscles possessing an oxidative form of metabolism (**Figure 2A**). Consistent with this morphological change, myofibers exhibiting strong NADH-TR activity markedly increased from D15, indicating a higher oxidative capacity (**Figure 2B**). The optimized pH conditions of myosin ATPase reactions further revealed a percentage of dark slow fibers, probably type I myofibers, reactive for acid-incubated mATPase, in the pectoralis muscle of chicks at the first steps of development ($10.8 \pm 2.5\%$ at day 1 and $9.5 \pm 2.2\%$ at day 7 ; means obtained from 500 fibers, $n=3$ chicks/age). This fiber type disappeared in pectoralis muscle of 15 day old chicks, which is entirely composed of fast-oxidative fibers reactive for alkaline-incubated mATPase, but not for acid-incubated mATPase (**Figure 2C**). On the whole, the rapid maturation of pectoral muscle in post-hatching penguin chicks was therefore characterized by a progressive increase in fast-oxidative myofiber

phenotype. Furthermore, the significant increase in pectoral muscle mass with age presumably improves its thermogenic capacity.

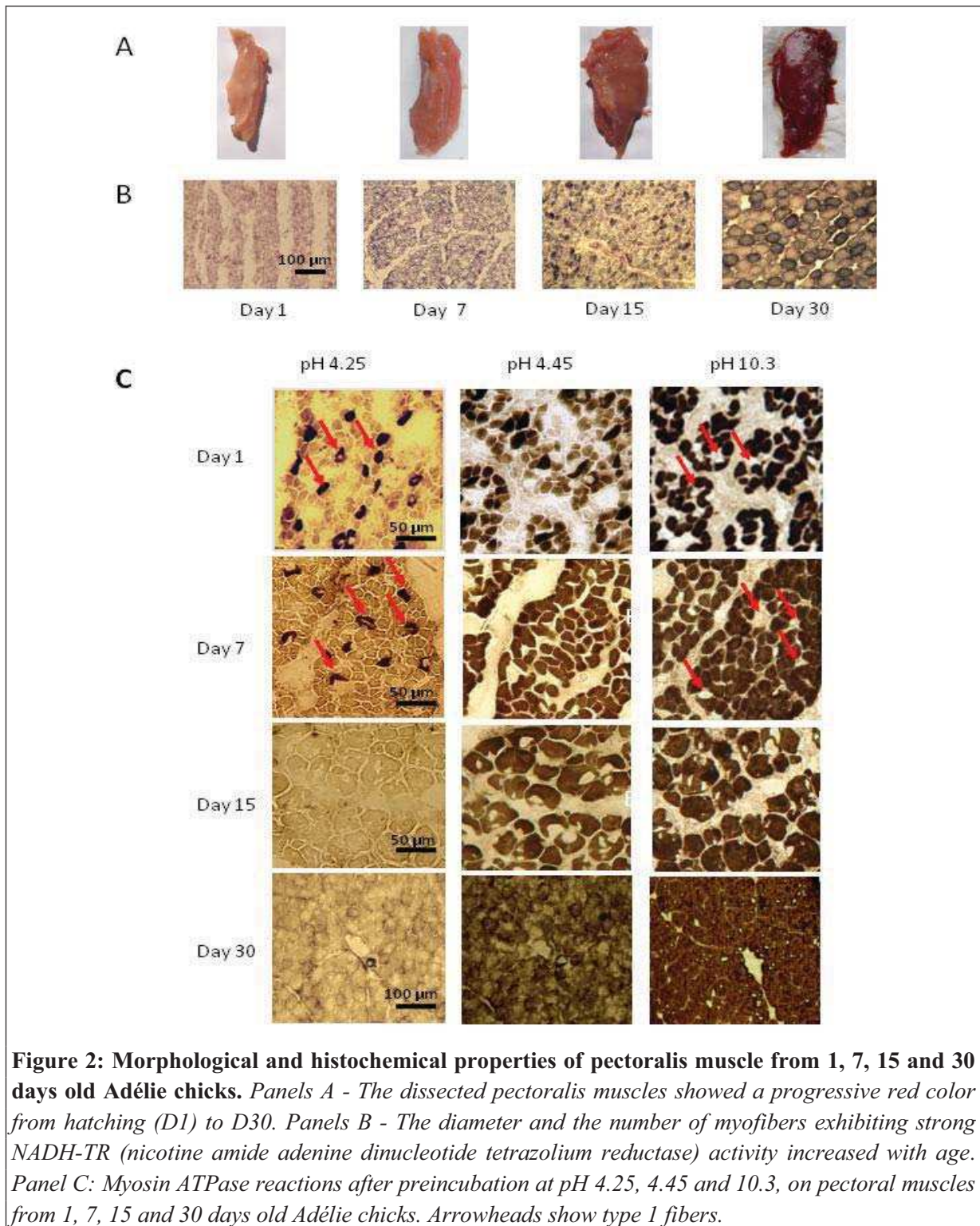


Figure 2: Morphological and histochemical properties of pectoralis muscle from 1, 7, 15 and 30 days old Adélie chicks. Panels A - The dissected pectoralis muscles showed a progressive red color from hatching (D1) to D30. Panels B - The diameter and the number of myofibers exhibiting strong NADH-TR (nicotine amide adenine dinucleotide tetrazolium reductase) activity increased with age. Panel C: Myosin ATPase reactions after preincubation at pH 4.25, 4.45 and 10.3, on pectoral muscles from 1, 7, 15 and 30 days old Adélie chicks. Arrowheads show type 1 fibers.

Genes and proteins expressions in pectoralis muscle.

To understand the regulation of muscle development, the expression of key genes and proteins implicated in growth, thermogenesis and their regulation were analyzed. The expression of GHR and the insulin like growth factor 1 receptor (IGF1R) genes markedly decreased from D1 to D15, during the nestling phase (-42% and -48% respectively ; $p < 0.05$). From D15 to D60, their relative expression remained low and stable. The kinetic of GHR expression was confirmed by western blot analysis, showing a significant decrease in protein level during the nestling phase (-56% ; $p < 0.05$) (**Figure 3**).

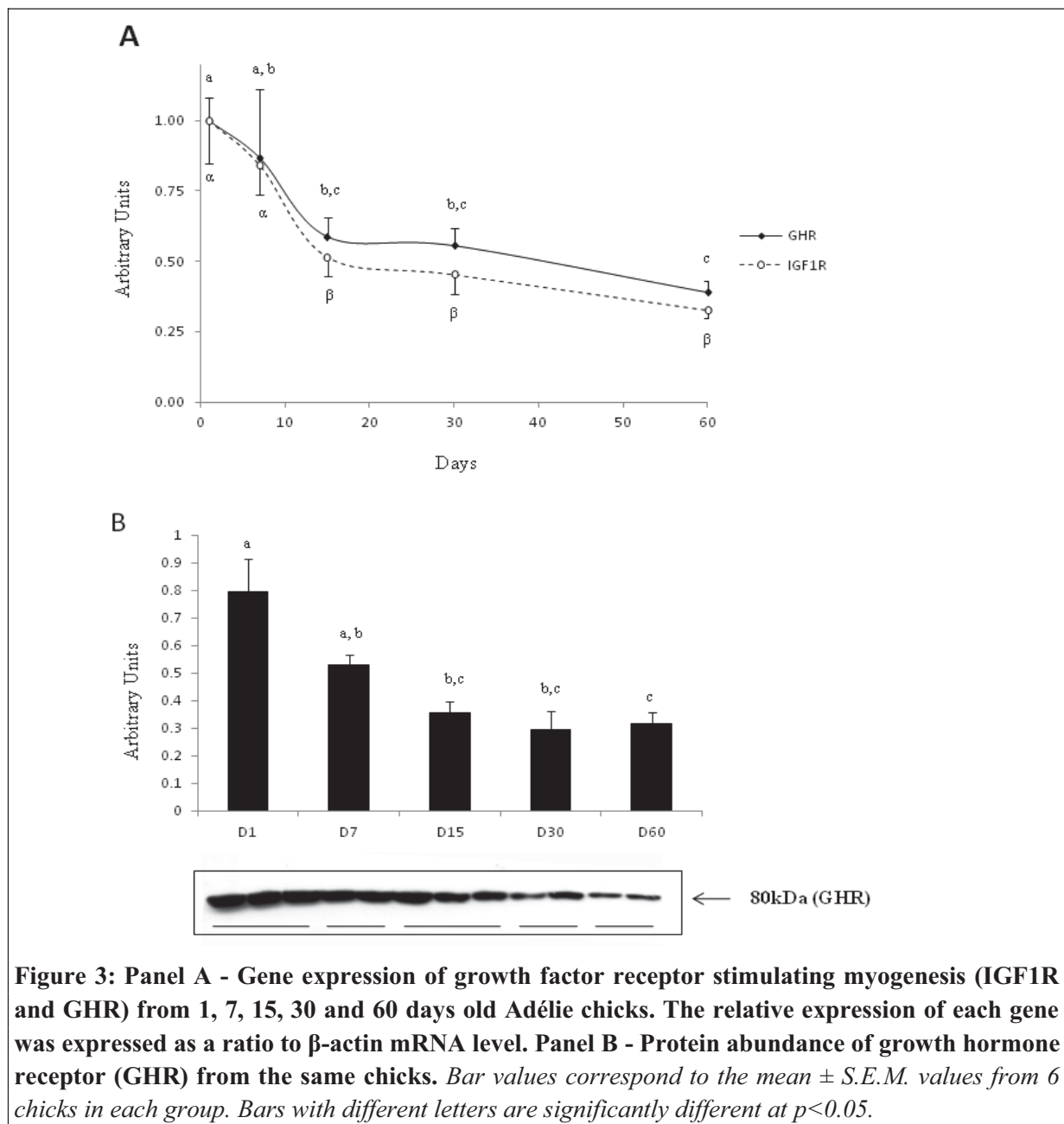


Figure 3: Panel A - Gene expression of growth factor receptor stimulating myogenesis (IGF1R and GHR) from 1, 7, 15, 30 and 60 days old Adélie chicks. The relative expression of each gene was expressed as a ratio to β -actin mRNA level. Panel B - Protein abundance of growth hormone receptor (GHR) from the same chicks. Bar values correspond to the mean \pm S.E.M. values from 6 chicks in each group. Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

To highlight thermogenic process, levels of avUCP and avANT mRNA were estimated. The expression of avUCP remained very low and stable until D30, its mRNA level became statistically

higher at D60 than at D15 (+7,100% ; $p<0.05$). The expression of avANT reached a low level at day 7 and then progressively increased until D60 (+2,300% compared with D7 ; $p<0.05$). This variation was globally confirmed at the protein level, which increased between D30 and D60 (+532% ; $p<0.05$) (Figure 4).

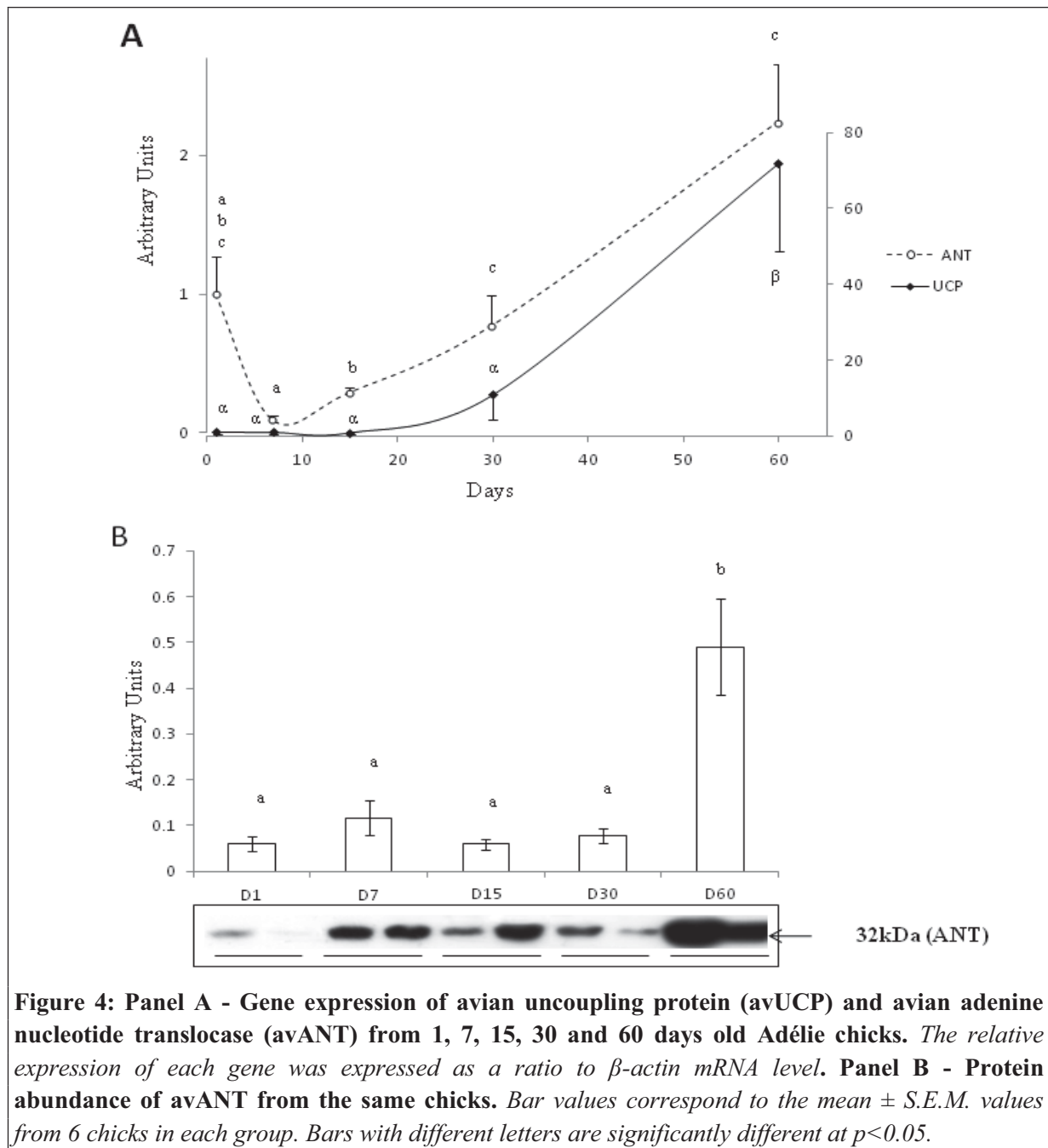


Figure 4: Panel A - Gene expression of avian uncoupling protein (avUCP) and avian adenine nucleotide translocase (avANT) from 1, 7, 15, 30 and 60 days old Adélie chicks. The relative expression of each gene was expressed as a ratio to β -actin mRNA level. Panel B - Protein abundance of avANT from the same chicks. Bar values correspond to the mean \pm S.E.M. values from 6 chicks in each group. Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$.

The triiodothyronin and its receptor (T3R subunit β) is well known to control the expression of avUCP and avANT mRNA. As seen in **figure 5**, the T3R subunit β gene expression was markedly increased from D7 to D60 (+1,100% ; $p<0.05$). Directly controlled by this receptor, the lipoprotein

lipase (LPL) expression also increased from D30 to D60 (+141% ; $p < 0.05$). PGC1 α , a transcriptional factor of avUCP, was also increased from D15 to D60 (+235% ; $p < 0.05$) (Figure 5).

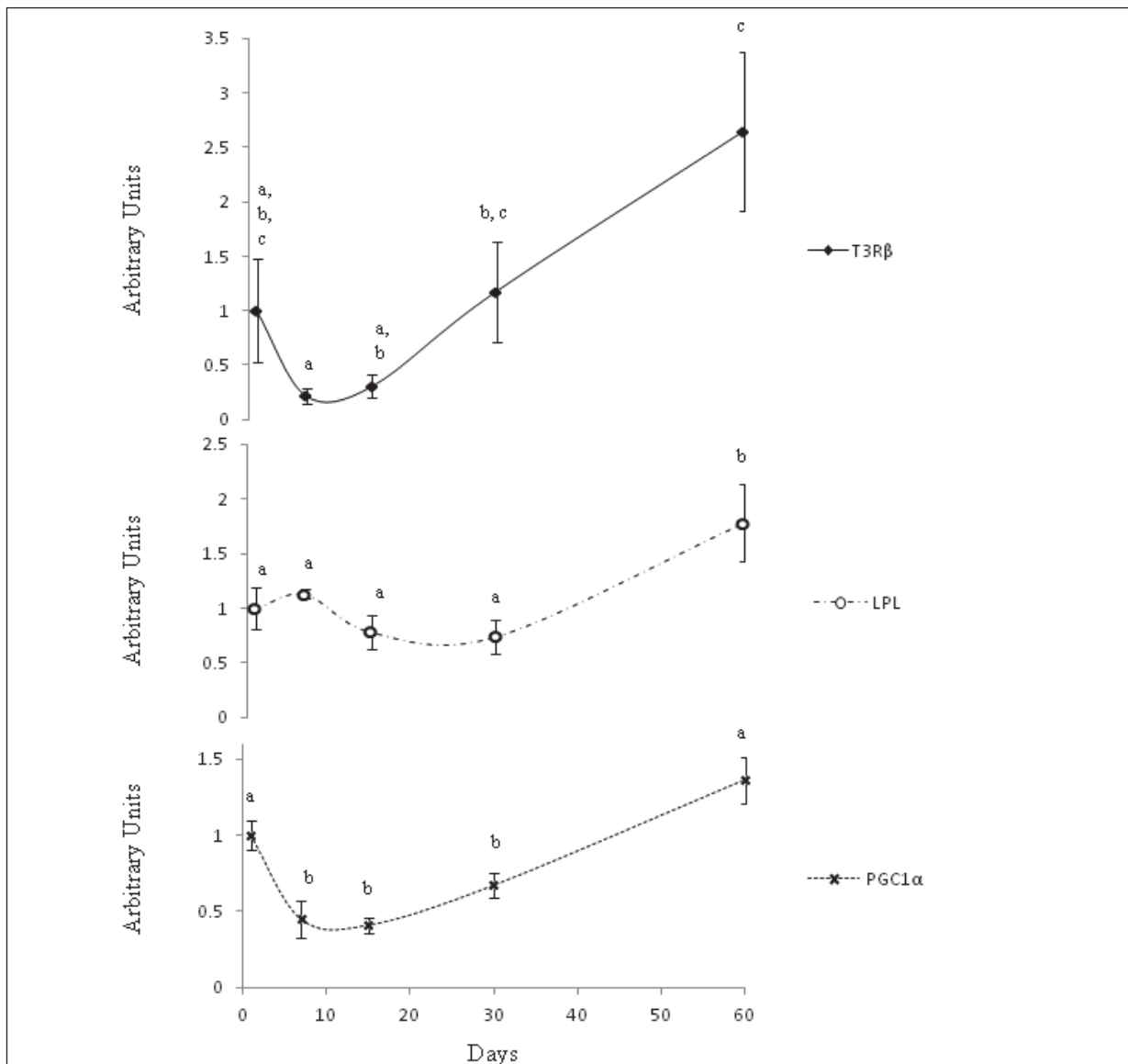


Figure 5: Gene expression of triiodothyronin receptor (T3R β), lipoprotein lipase (LPL), peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 α (PGC1 α) from 1, 7, 15, 30 and 60 days old Adélie chicks. The relative expression of each gene was expressed as a ratio to β -actin mRNA level. Bar values correspond to the mean \pm S.E.M. values from 6 chicks in each group. Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

Discussion

The present study details, for the first time, the strategy used by Adélie penguin chicks for the acquisition of fast growth and thermoregulation during the short Antarctica summer. Morphological, histological, biochemical and genes expression analysis indicate that Adélie penguin growth induces profound physiological changes in pectoralis muscle, which would assume a major thermogenic function in this marine bird.

Adélie penguin chicks promote growth during post-hatching period.

The development of chick's body mass, from hatching to molting, corresponds to a sigmoid growth curve showing a slow start, then a rapid rising phase and finally a period of low growth rate, when chick reaches its juvenile mass. As previously reported (Bucher *et al.* 1990), semi-atrial Adélie chicks had a high relative growth rate during the nestling phase, increasing their body mass by 5 fold during the first 6 days (**Table 1**). Compared to similar temperate birds (Ricklefs 1979), this intensive growth depends upon an intensive parental care, which not only offers a thermal protection against cold but also allow chicks to feed on huge amount of krill.

Among tissues, the pectoralis muscle is the one most likely to limit the overall rate of growth in birds (Ricklefs 1979). During the nestling period, the mass of this organ increased by 4 fold (Raccurt *et al.* 2008). Different molecular and endocrinological factors are known to favor skeletal muscle cell development in avian species. GH is a pleiotropic cytokine involved in cell proliferation and differentiation. Its concentration positively controls the expression of the growth hormone receptor (GHR) in avian skeletal muscle satellite cell culture (Halevy *et al.* 1996). So, the high levels of GHR mRNA and protein suggest that GH concentrations were elevated during the first days post-hatching, as observed for other avian species (Harvey 1983). This was further indicated by the over expression of the receptor for IGF1, the expression of which is known to be GH-dependent and would induce a trophic effect on muscle (Halevy *et al.* 1996). In interaction with thyroid hormones (Kühn *et al.* 2002), IGF1 production would also be favored by the high concentration level of T3 found during the early nestling period of penguin chicks (Raccurt *et al.* 2008).

Acquisition of endothermy during thermal emancipation

To acquire their endothermy, penguin chicks should improve both thermogenic and insulative capacities. Previous study showed an increase of resting metabolic rate from hatching to D11 (Bucher *et al.* 1990), which indicate an improvement of thermoregulatory process (Duchamp *et al.* 2002). However, during the nestling period (up to D7), chicks could not regulate their body temperature at a

high and constant level, despite an important stimulation of shivering activity (**Table 2** and **Figure 1**). The high surface-to-volume ratio and the low down thickness favor heat loss and could explain the inefficiency of shivering thermogenesis to maintain body temperature at 38°C at this age. This implies that chicks should be brooded by their parents in close contact with the unfeathered brooding pouch, which optimize heat transfer, to maintain their homeothermy during the early post-hatching period. From D15, chicks acquired endothermic capacities as shown by their ability to maintain a high and constant body temperature over a wide range of cold ambient temperatures. At D30, we found a slight capacity for non-shivering thermogenesis even though shivering remained by far the main thermogenic process. Development of such thermogenic mechanisms could be related to the rapid maturation of skeletal muscle, the main thermogenic organ in bird. From D15, the pectoralis muscle is entirely composed by IIA fibers and acquires a higher oxidative phenotype, in response to the partial cold exposition of chicks (**Figure 2**). Increased PGC1 α expression (**Figure 5**), a transcriptional factor that would lead to the conversion of type IIB muscle fibers to a more oxidative fiber type (Lin *et al.* 2002 ; Ueda *et al.* 2005) would ensure that thermogenic processes become efficient and sustainable for long period of time (Aulie & Tøien 1988).

These results clearly indicate that during the first month shivering was the main thermogenic mechanism, but that this thermogenic process became only efficient from D15 and beyond, after thermal insulation had been sufficiently improved by body size (decreased area-to-volume ratio), down thickness and subcutaneous fat deposition (Raccurt *et al.* 2008 and present study). As previously seen in other penguins, the control of heat loss is more important than the heat production for the acquisition of full thermal emancipation by chicks (Taylor 1985 ; Duchamp *et al.* 2002). In the windy cold polar environment, we must keep in mind that the close contact between thermal emancipated chicks in the formation of crèche are still indispensable to reduce the heat loss and the cost for thermogenesis, as seen in emperor penguin during winter (Gilbert *et al.* 2008). The reduction of energetic cost for thermoregulation in chicks could probably favor high growth rate, by directing energy resources to tissue and body growth rather than to heat production.

Metabolic adjustment of growth and thermoregulatory processes

The respiratory quotient indicates a change of fuel selection strategy, from carbohydrate at D7 and D15 to lipid at D30 (**Table 2**). Interestingly, lipids become the main energetic substrates at one month of age, once Adélie chicks display large functional mature adipocytes (Raccurt *et al.* 2008) and have almost completed their growth (**Table 2**). As far as lipid metabolism is concerned, a previous study on Adélie penguin chicks indicates that the first month of growth is a key period for the development and maturation of adipose tissue, with differentiation and growth of preadipocytes occurring by around day 15 followed for two weeks by a gradual functional maturation of adipocyte

function, including lipid uptake, storage and endocrinology (Raccurt *et al.* 2008). The present metabolic measurements further highlight the fact that Adélie penguin chicks start to preferentially oxidize lipids as energetic substrates only after the acquisition of functional adipocytes. It is accompanied by a concomitant increase of muscular LPL gene expression from D30 to D60, an enzyme implicated in lipid metabolism (**Figure 5**). In turn, these results may also suggest that the preferential use of carbohydrate substrates to fulfill the energy requirement of growth during the first month would divert lipids from diet towards membrane biogenesis (cellular proliferation and growth) and energy storage. Then, at the age of 30 days, once the main phase of growth and high fat reserves are complete, Adélie penguin chicks change their fuel utilization to preferentially exploit lipid substrates.

The lipid utilization shift also occurs at the time of the appearance of muscular NST, a thermogenic process known to be stimulated by lipid substrates in birds (Skulachev & Maslov 1960 ; Barré *et al.* 1986 ; Dumonteil *et al.* 1994a). Cold- or glucagon-increased fatty acid supply is associated with higher non-shivering thermogenic capacity and cold tolerance in birds (Duchamp *et al.* 1999). Such lipid-enhanced skeletal muscle thermogenesis may involve the activation of an ATP-consuming sarcoplasmic reticulum calcium cycling by long-chain acyl esters (Dumonteil *et al.* 1993 ; Dumonteil *et al.* 1994a), and/or the loose coupling of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation under the control of fatty acids (Skulachev & Maslov 1960 ; Barré *et al.* 1986 ; Duchamp *et al.* 1992 ; Roussel *et al.* 1998 ; Toyomizu *et al.* 2002). In the present study, these data suggest that the shift towards an effective lipid metabolism was needed to develop efficient thermogenic processes, namely non shivering thermogenesis at 30 days of age in Adélie penguin chicks.

Late development of non-shivering thermogenesis

Contrary to mammals which rapidly develop a high NST capacity after birth, penguin chicks mainly depend on shivering to maintain their endothermy after hatching, the efficiency of which improves with age (Duchamp *et al.* 2002). As previously seen in king penguins, NST became efficient later, in response to cold temperature exposure during winter (Duchamp *et al.* 1989). Among the reported biochemical mechanism underlying non shivering thermogenesis in birds, one is related to fatty acid-enhanced mitochondrial loose coupling (Skulachev & Maslov 1960 ; Barré *et al.* 1986 ; Roussel *et al.* 1998 ; Toyomizu *et al.* 2002). As in mammals (Echtay *et al.* 2002), avANT and avUCP are members of the mitochondrial transporter family that are able to increase mitochondrial inner membrane conductance in the presence of fatty acids for the former or when activated by fatty acids and radical oxygen species for the latter (Toyomizu *et al.* 2002 ; Talbot *et al.* 2003 ; Talbot *et al.* 2004 ; Rey *et al.* 2010b). Cold-induced mitochondrial avANT expression and content has been associated with an increase in avANT-mediated an inducible, fatty acid dependent uncoupling of oxidative

phosphorylation in skeletal muscle mitochondria of several bird species, including duckling, chicken and king penguin (Roussel *et al.* 2000 ; Toyomizu *et al.* 2002 ; Talbot *et al.* 2004 ; Rey *et al.* 2010b). Similarly, cold-induced upregulation of skeletal muscle avUCP has been associated with a higher avUCP activity and related increased mitochondrial inner membrane conductance in both penguins and ducklings (Talbot *et al.* 2003 ; Rey *et al.* 2010b). In addition, the increased mRNA levels of muscle lipoprotein lipase at D60 would further indicate a higher capacity of skeletal muscle to extract fatty acid from circulating lipids. Altogether, these results suggest that in Adélie penguin chicks, the upregulation of avANT, avUCP and LPL at D60, in association with the activation of lipid metabolism, would favor a fatty acid-enhanced mitochondrial non-shivering thermogenesis by loose coupling mitochondrial oxidative phosphorylation. In addition, a previous study on cold acclimated ducklings revealed that the intensity of cold-induced NST mechanism was positively correlated with the expression of the avUCP in skeletal muscle (Teulier *et al.* 2010). Even though the thermogenic function of avUCP in skeletal muscle remains controversial, these data indicate that, in cold exposed birds, the mRNA level of avUCP correlates with the capacity of skeletal muscle for NST. Based on this observation, the greater increase of avUCP expression in the pectoralis muscle of D60 chicks would strongly suggest that at this age, Adélie chicks may develop a higher capacity for NST than D30 counterparts.

During the last month of growth, Adélie penguin chicks undergo a cold stress represented by the molting period, during which the acquisition of definitive feathers decreases insulative capacities. In king penguin, molting is associated with an increase of thyroid hormones (Corbel *et al.* 2008), the main thermogenic hormones in bird (Duchamp *et al.* 1999). Such increase was suggested by the up-regulation of T3 receptor subunit β expression in D30 and D60 in Adélie penguin muscle (**Figure 5**). Previous studies have shown that cold exposure increases plasma T3 concentrations, which stimulates avUCP and avANT expression, directly or indirectly through the up-regulation of PGC1 α expression (**Figure 5**) (Collin *et al.* 2003a ; Collin *et al.* 2003b ; Ueda *et al.* 2005). Moreover, thyroid hormones also stimulate the activity of enzymes imply in lipid uptake, such as lipoprotein lipase (**Figure 5**) or FABP (Bénistant *et al.* 1998), which are energetic substrates that would favor mitochondrial uncoupling activity (Skulachev & Maslov 1960 ; Schonfeld 1990 ; Roussel *et al.* 1998). Altogether, our results strongly suggest that D60 Adélie penguin chicks should develop a fully efficient NST mechanism during the last month of growth, in order to compensate the increase of thermogenic needs induce by molting.

In conclusion, all these results, and previous studies, allow us to draw at least three main metabolic steps in the development of a mature and endothermic Adélie penguin chick. During the first month, most of the energy is allocated to the growth and the storage of energy as fat. Endothermy

becomes effective at 15 days of age with the development of oxidative muscle phenotype, that allow chicks to perform a sustainable shivering during the short period of time they are exposed to cold. At this age they also form crèches to minimize cold stress in order to complete their growth. Finally, at 30 days of age, when most of their growth is accomplished, a metabolic shift towards lipid metabolism occurs, allowing penguin chicks to develop non shivering thermogenesis, a more powerful and sustainable thermogenic process, in which lipids behave as substrates and activators.

Acknowledgements:

We are very grateful to the members of the 56, 57, and 60th mission in Adélie Land and to the French Polar Research Institute for their technical and logistical assistance (program 131). C. Déglétagne was a receipt of a fellowship from the french Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Principaux résultats présentés dans la publication 4

Forte croissance du poussin manchot Adélie durant les premiers jours de vie

Au cours des premiers jours post-éclosion, protégé par la poche incubatrice parentale, le poussin présente une très forte croissance se traduisant par une multiplication d'un facteur 5 de sa masse (entre le 1^{er} et le 7^{ème} jour). Celle-ci est associée, dans le muscle pectoral, à une forte expression des gènes GHR et IGF1R (récepteurs aux facteurs de croissance), dont l'expression diminue fortement pendant les 15 premiers jours.

L'augmentation des mécanismes d'isolation thermique et de thermogenèse favorise l'émancipation thermique du poussin

La forte croissance du poussin permet une diminution du ratio Surface / Volume, limitant les déperditions de chaleur. L'isolation thermique est renforcée par l'épaississement du duvet (multipliée par 3 entre 7 et 30 jours). Dès 15 jours, le poussin est capable de conserver son endothermie jusqu'à des températures avoisinant -5°C, grâce au développement d'une thermogenèse de frisson. Le développement de ce mécanisme de production de chaleur s'accompagne d'une modification du phénotype des fibres du muscle pectoral en faveur d'une augmentation de leurs capacités oxydatives. Durant cette période, la croissance du poussin est mise entre parenthèse, se traduisant par une diminution de l'expression des gènes GHR et IGF1R et de l'abondance de la protéine GHR dans le muscle pectoral.

Développement tardif d'un mécanisme de thermogenèse sans frisson

Dès 30 jours, nous observons le développement d'un mécanisme de thermogenèse sans frisson (7% au dessus du métabolisme de repos). Ceci s'accompagne d'une augmentation d'expression de l'avANT (+2300% entre 7 et 60 jours, $p < 0,05$) et de l'avUCP (7100% entre 15 et 60 jours, $p < 0,05$), gènes codant pour des protéines mitochondriales dont l'activation augmente le découplage mitochondrial. Par analogie avec les mécanismes observés dans le tissu adipeux brun de rongeurs exposés au froid, nous pouvons supposer que la stimulation du découplage mitochondrial pourrait renforcer la production de chaleur, et accroître l'intensité de la thermogenèse sans frisson à 60 jours. L'activation d'un mécanisme fortement thermogène, tel que la thermogenèse sans frisson, semble indispensable pour le poussin qui doit compenser l'augmentation des pertes de chaleurs engendrées par la mue ou lors de son acclimatation au milieu marin.

Ces résultats laissent supposer que le manchot alloue séquentiellement son énergie, entre 1/ une croissance rapide rendue possible grâce à la protection parentale assurant l'homéothermie du poussin, puis 2/ un développement plus tardif des mécanismes thermogènes, lorsque la croissance du poussin est accomplie.

Discussion générale
&
Conclusion

L'ensemble de nos résultats a permis de décrypter, à différents niveaux d'intégration, les mécanismes physiologiques soutenant l'acclimatation des manchots aux contraintes des milieux antarctique et sub-antarctique. Plus particulièrement, nous avons développé un outil moléculaire pour explorer l'activation et l'inhibition de gènes impliqués dans différentes voies cellulaires reflétant des orientations métaboliques développées par le manchot Royal lors de son passage du milieu terrestre au milieu marin, point de départ nous permettant de préciser leurs capacités d'acclimatation aux contraintes énergétiques et oxydatives. Nous avons mis en évidence que cette phase oblige cet oiseau à stimuler son métabolisme lipidique et à activer de nombreux mécanismes anti-oxydants pour limiter l'effet délétère des ROS sur les macromolécules telles que l'ADN, les lipides et les protéines. Fort de ces résultats, nous avons complété ces études par la caractérisation des mécanismes physiologiques permettant au poussin manchot Adélie de faire face à la présence de contraintes énergétiques concurrentielles, lors de sa croissance rapide en milieu polaire, en développant une stratégie originale d'allocation d'énergie favorisant, dans un premier temps, sa croissance puis, dans un second temps, sa thermogénèse.

1/ L'exploration du transcriptome, un atout pour les études d'écophysiologie

Le développement de nouvelles techniques d'analyse du transcriptome a permis de caractériser simultanément l'expression de nombreux gènes dans une situation donnée. L'accès à de telles informations s'est révélé essentiel pour décrypter finement les voies cellulaires soutenant différents mécanismes physiologiques ou physiopathologique jusqu'alors difficiles à appréhender par des techniques classiques. Lors de nos études, nous avons utilisé l'avantage d'une de ces techniques, la puce à ADN, pour accéder aux mécanismes physiologiques soutenant l'acclimatation du manchot Royal immatures aux diverses contraintes de l'océan antarctique que représentent l'augmentation des pertes thermiques générées par l'immersion dans l'eau, la réalisation d'exercices physiques intenses et endurants pour atteindre les zones de forte production primaire, et la gestion des réserves d'oxygène lors des épisodes de plongées en apnée liés au comportement de pêche.

a/ Utilisation des puces à ADN

En plein essor depuis le début des années 2000, cette technologie est devenue très accessible via sa commercialisation par des sociétés comme Affymetrix. Cependant, cette situation restreint son utilisation aux modèles de laboratoire ou à l'Homme, en raison de la spécificité des puces. Comme nous l'avons évoqué dans la partie « Rappels Bibliographiques », le principe de la puce est basé sur la

détection par fluorescence de la quantité d'ARNc, grâce à leur hybridation sur des sondes spécifiques, nécessitant de travailler en hybridation homologue. Cependant, l'utilisation des puces dans le cadre d'une hybridation hétérologue permet d'élargir leur champ d'application à un très grand nombre d'espèces biologiques, avec des retombées plus particulières dans le domaine de l'écophysiologie. Mais est-ce envisageable pour analyser le transcriptome du manchot Royal ? Les résultats obtenus sont-ils fiables ?

Nous avons démontré dans notre première étude que l'utilisation de la technologie puce à ADN reste possible, même entre des espèces possédant environ 100 millions d'années de divergence évolutive (Van Tuinen & Hedges 2001). Comme cela a été évoqué dans de nombreuses études (Grigoryev *et al.* 2005 ; Hammond *et al.* 2005 ; Bar-Or *et al.* 2006 ; Bar-Or *et al.* 2007), l'utilisation d'un algorithme d'analyse classique, comme GCOS pour Affymetrix, ne permet pas de détecter l'ensemble des gènes différentiellement exprimés entre nos 2 conditions physiologiques (40 gènes sur-exprimés et 21 gènes sous-exprimés dans le groupe SA par rapport au groupe NI). Le développement de l'algorithme maxRS a permis de pallier, au moins partiellement, au manque de sensibilité des algorithmes classiques (240 gènes sur-exprimés et 154 gènes sous-exprimés dans le groupe SA par rapport au groupe NI), et d'obtenir un nombre de gènes différentiellement exprimés proche de celui des études réalisées dans le cadre d'une hybridation homologue (Wang *et al.* 2007).

La validation des résultats s'est révélée nécessaire pour éviter les faux positifs, engendrant une estimation par excès du nombre de gènes différentiellement exprimés (Chuaqui *et al.* 2002). Une première approche par PCR quantitative a permis de valider les données issues de l'analyse par l'algorithme maxRS, pour 10 des 11 gènes considérés (**Publication 1 – Figure 4**). Curieusement, les résultats obtenus avec l'algorithme GCOS, plus restrictif à cause de l'utilisation des sondes *MisMatch*, semblent moins fiables avec une validation par PCR quantitative de seulement 4 gènes sur les 6 étudiés (**Publication 1 - Addfile 2**).

Mais ces variations d'expression génique obtenues par l'analyse maxRS sont-elles le reflet d'une réalité biologique ? L'étude du transcriptome du manchot Royal au cours de son acclimatation au milieu marin a permis de caractériser, dans le muscle pectoral, l'activation de différentes voies cellulaires impliquées dans le transport et l'utilisation des substrats lipidiques ainsi que l'augmentation d'expression des gènes impliqués dans la lutte contre les radicaux libres de l'oxygène. Lors des différentes études réalisées dans le cadre de cette thèse, nous avons pu compléter ces données moléculaires par des approches plus intégrées qui corroborent nos précédents résultats. En effet, nous avons observé une activation ciblée des processus soutenant le métabolisme lipidique (augmentation de l'activité de la HAD et de la citrate synthase, augmentation des respirations mitochondriales en présence de substrats lipidiques) (**Publication 2**) et favorisant la dégradation des radicaux libres de l'oxygène (augmentation de l'activité des enzymes anti-oxydantes) (**Publication 3**).

L'ensemble de ces éléments justifie l'utilisation de cette méthodologie pour décrypter les mécanismes physiologiques soutenant l'acclimatation du manchot Royal aux contraintes du milieu marin. Cependant, si nous pouvons attester du sens de variation d'expression d'un gène, il reste difficile d'estimer le pourcentage de variation de celui-ci, même dans les cas d'hybridation homologue où les variations observées par qPCR sont supérieures à celles obtenues avec les puces à ADN (pour 7 gènes sur 10 dans **l'article 1**) (Irizarry *et al.* 2005 ; Shi *et al.* 2006a). En effet, le taux de fluorescence dépend de la qualité d'hybridation qui peut être altérée par cette situation d'hybridation hétérologue (pour exemple, **Figure 27**). Dans ce cas particulier, cette technique ne nous permet pas d'avoir une donnée quantitative, mais seulement qualitative, du niveau d'expression des gènes. Ainsi, il nous a semblé prudent de nous intéresser essentiellement aux familles de gènes dont l'expression varie simultanément, pouvant induire une réponse physiologique de grande ampleur.

Malgré ces précautions, une interrogation concernant l'annotation des gènes subsiste. En effet, l'efficacité de cette approche est basée sur le postulat que la divergence de séquence entre les gènes est supérieure à la divergence entre séquences homologues des 2 espèces. Si ce postulat est faux, l'altération de la spécificité des sondes pour les séquences nucléotidiques de manchot pourrait induire une augmentation de l'hybridation croisée. Aucune des expérimentations utilisant cette technique d'hybridation hétérologue n'a mis en évidence un accroissement de l'hybridation croisée (Bar-Or *et al.* 2006 ; Bar-Or *et al.* 2007), comme en atteste les séquençages réalisés dans le cadre de **l'article 1** (**Table 3**). Nous pouvons être relativement confiants concernant l'annotation des gènes différentiellement exprimés. Mais de nombreux gènes détectés comme différentiellement exprimés ne sont pas annotés, limitant notre champ d'investigation aux gènes déjà décrits chez le poulet.

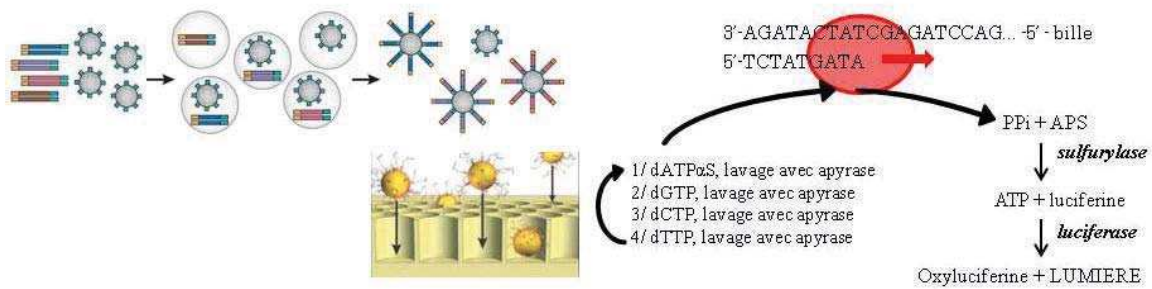
b/ Des technologies d'avenir : les techniques de séquençage dernière génération

Si la technique de puces à ADN est considérée comme la technique de référence pour l'étude du transcriptome, l'avènement des nouvelles technologies de séquençage à haut débit (NGS : next generation sequencing) pourrait bien bousculer l'ordre établi. Cette technique de pyroséquençage permet un séquençage par synthèse, basée sur une révélation en temps réel de l'activité de l'ADN polymérase, favorisant le séquençage rapide des génomes. Dernièrement, de nombreuses entreprises ont utilisé ce principe et proposé différentes technologies comme par exemple le GS FLX 454 (Roche) ou le GAIIX/hiseq (Illumina) (**Figure 27**) qui permettent d'acquérir les séquences du transcriptome de tous les organismes. Ces 2 technologies, basées sur la méthode de pyroséquençage, utilisent des méthodologies différentes pour déterminer les séquences nucléotidiques. La première (GS FLX 454) est basée sur l'insertion séquentielle des différentes bases nucléotidiques (A, T, G, C) et la détection de la fixation ou non de ces bases, et la seconde (GAIIX/hiseq) permet de détecter à chaque cycle le

type de bases fixées grâce à la liaison de chacune de ces bases nucléotidiques à un fluorochrome différent. Ces technologies permettent de séquencer rapidement des morceaux de petite taille (250pb pour le GS FLX 454 et environ 30pb pour la technologie GAIIX/hiseq) (Shendure & Ji 2008). Grâce au séquençage complet du transcriptome, ces techniques permettent de détecter la présence de certains gènes, même rares (par analogie de séquence avec des gènes connus chez d'autres espèces), d'apprécier les niveaux d'expression des gènes (en estimant le nombre de séquences identiques obtenues en fin de séquençage), et de déterminer les épissages alternatifs, chez des espèces non communes (Shendure & Ji 2008 ; Clark *et al.* 2011). Une étude sur les levures montre par ailleurs que la technologie GAIIX/hiseq (Illumina) est capable, après un traitement bioinformatique spécifique, de nous renseigner sur l'abondance des transcrits avec une résolution plus fine que les techniques actuelles de puces à ADN, surtout pour les ARN rares présents en faible concentration. De plus, cette technologie a permis de détecter des gènes ignorés par les puces, et d'estimer leur expression avec une précision équivalente aux techniques de PCR quantitative (Nagalakshmi *et al.* 2008). En effet, alors que la technologie de puces à ADN nécessite de connaître la séquence de référence de chacun des gènes afin de fabriquer des sondes spécifiques pour maximiser la qualité de l'hybridation avec l'ARNc, le séquençage massif de séquences présente l'avantage de pouvoir apprécier le transcriptome d'une espèce sans forcément connaître *à priori* la séquence de référence de celle-ci.

L'essor récent de cette technologie permettra certainement à l'avenir de proposer une alternative pertinente aux puces à ADN. En effet, elle offre l'opportunité de disposer d'informations sur la séquence et l'expression, permettant de recouper des informations actuellement utilisées indépendamment dans différents domaines comme la physiologie, l'écologie ou l'évolution. Cependant, cette technologie demande un traitement bioinformatique lourd, avec des étapes d'assemblage *de novo* et des algorithmes d'analyses relativement récents, la rendant encore peu accessible pour les laboratoires d'écophysiologie.

A : Technologie 454



B : Technologie Illumina

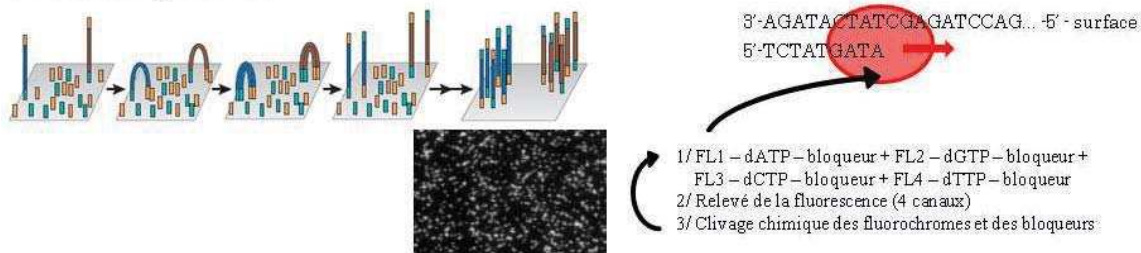


Figure 27 : Principe du séquençage à haut débit : comparatif entre les technologies 454 et Illumina.

A/ Technologie GS FLX 454 : Chaque fragment d'ADN (ou ADNc) est fixé sur une bille spécifique et inséré dans un puit. Dans chaque puit, le brin d'ADN est amplifié. Lors du séquençage, chaque nouvelle base nucléotidique est insérée indépendamment et produit du phosphate inorganique (PPI) quand elle est utilisée par la polymérase. La détection de la fixation de la base nucléotidique est basée sur la détection du PPI qui en présence de sulfurylase et de luciférase, produit de la lumière. Cette étape étant répétée, la séquence nucléotidique peut être déduite dans chacun des puits. **B/ Technologie GAIIIX/hiseq (Illumina) :** Tous les fragments d'ADN sont fixés sur différents points d'une plaque via des adaptateurs (séquences nucléotidiques spécifiques permettant la fixation de l'ADN sur la plaque). Après amplification (1000 amplifications pour 1 séquence au départ) le séquençage est réalisé en insérant en même temps les 4 bases nucléotidiques, chacune étant liée à un fluorochrome (FL) différent. A chaque cycle, une seule base peut être fixée. En effet, la présence du bloqueur empêche la suite de la polymérisation et permet à l'appareil d'enregistrer sur la plaque la présence de chacun des fluorochromes, nous renseignant sur la nature de la base nucléotidique. La réaction est relancée après clivage chimique de ces molécules empêchant la poursuite de la polymérisation (bloqueur) et des molécules fluorescentes liées aux nucléotides déjà fixés. Ainsi, en chaque point de la plaque, selon la fluorescence relevée à chaque cycle, une séquence nucléotidique peut être reconstituée. Dans tous les cas (GS FLX 454 ou GAIIIX/hiseq) un traitement informatique lourd doit être réalisé afin de réassembler les séquences et les identifier. D'après (Shendure & Ji 2008)

c/ Avantages et inconvénients des techniques de puces à ADN et de séquençage massif (NGS)

Quelle que soit la technologie utilisée, puce à ADN ou NGS, celles-ci offrent une vision assez large des modifications transcriptionnelles induites chez un organisme. Ces approches offrent un avantage pour étudier l'activation ou l'inhibition de réseaux de gènes et mettre en évidence de nouveaux gènes dont la régulation demeurerait inconnue. Cependant, ces technologies nécessitent des étapes de validation des résultats par PCR quantitative et sont limitées à l'observation des modifications transcriptionnelles. Il est ainsi préférable, dans le cadre d'études de physiologie, de compléter ces données par des approches plus intégratives pour renforcer la portée de nos conclusions. Cependant, ces approches de transcriptomique représentent une première approche très informative et permettent de mieux cibler les futures expérimentations sur l'animal sauvage, afin d'en limiter le nombre autant que possible.

2/ L'acclimatation au milieu marin du manchot Royal immature

Les multiples contraintes inhérentes à la vie dans la zone sub-antarctique de l'océan indien induisent de profondes modifications impliquant le métabolisme cellulaire et les mécanismes anti-radicalaire pour permettre aux juvéniles manchots Royaux de répondre efficacement à l'augmentation des besoins thermogènes, au soutien d'un exercice physique intense et durand et au développement d'un comportement de plongée en apnée.

a/ Les ajustements métaboliques

Nos résultats issus de la **publication 2** suggèrent une modification de l'utilisation des substrats énergétiques en faveur d'une consommation préférentielle des lipides après l'acclimatation au milieu marin du manchot Royal immature, affectant en particulier le muscle pectoral, tissu impliqué dans la nage et la thermogénèse chez cet oiseau. Ceci se traduit par une réponse cellulaire coordonnée indiquant une augmentation des capacités de transport et d'oxydation des lipides, observée par des approches transcriptionnelles (CPT +25%, acyl CoA déshydrogénase +45%) et biochimiques (activité de la HAD et de la citrate synthase +34%, accroissement de la consommation d'oxygène par la mitochondrie en présence de substrats lipidiques).

Cette réponse physiologique s'apparente aux résultats obtenus chez les oiseaux migrateurs lors de leur exposition au froid ou lors de l'accroissement de leur activité physique au cours des épisodes migratoires par exemple (Pelters *et al.* 1999 ; Guglielmo *et al.* 2002 ; Vaillancourt *et al.* 2005). Point commun de ces différentes études, ces modifications affectent le muscle pectoral, tissu exhibant majoritairement un phénotype contractile de type oxydatif-glycolytique chez ces différentes espèces (Manchots : Erbrech 2011, **Article 4** ; oiseau migrateur : Rosser *et al.* 1996 ; Scott *et al.* 2009a) capable de soutenir les mécanismes thermogènes (Aulie & Tøien 1988) et les efforts physiques intenses et prolongés (Rosser *et al.* 1996). L'utilisation des lipides, molécules retrouvées abondamment dans l'alimentation des manchots Royaux (Myctophydés et petits Céphalopodes) (Raclot *et al.* 1998), présente l'avantage de produire plus de molécules d'ATP par gramme de réserve, favorables au maintien d'une activité physique prolongée, que les substrats glucidiques (Weber 2009). De plus, l'augmentation de l'approvisionnement en acides gras lors de l'acclimatation au froid est associée à une augmentation de la thermogénèse sans frisson chez l'oiseau (Duchamp *et al.* 1999). Ceci peut s'expliquer par le rôle stimulateur des acides gras acylés à longue chaîne sur l'activité des protéines impliquées dans le cycle futile du calcium (Dumonteil *et al.* 1993 ; Dumonteil *et al.* 1994a) et/ou l'implication des acides gras dans le contrôle du découplage mitochondrial (Duchamp *et al.* 1992 ; Roussel *et al.* 1998 ; Toyomizu *et al.* 2002).

Ainsi l'utilisation préférentielle des substrats lipidiques est nécessaire au soutien de l'augmentation des besoins énergétiques imposés par le milieu marin (Barré & Roussel 1986) et à la stimulation des mécanismes thermogènes. Cette modification coordonnée du métabolisme pourrait être en partie contrôlée par les hormones thyroïdiennes, hormones thermogènes chez l'oiseau (Duchamp *et al.* 1999), dont les concentrations plasmatiques sont augmentées lors de l'exposition au froid (Collin *et al.* 2003a) et au cours du passage de la vie terrestre à la vie marine du manchot Royal (Cherel *et al.* 2004). En effet, l'augmentation de l'expression de son récepteur (T3R β , X10), que nous avons observé au cours de cette phase (**Article 2**), est corrélé par d'autres auteurs à un accroissement de la dépense énergétique, soutenue majoritairement par l'oxydation des substrats lipidiques (Taleux *et al.* 2009). Nous pouvons aussi supposer l'implication de certains phospholipides (DHA : 22:6 w3 et EPA : 20:5 w3), présents dans l'alimentation (Raclot *et al.* 1998) et considérés comme des dopants naturels, dont l'incorporation dans les membranes favorise la fluidité membranaire et active certains transporteurs comme la Carnitine-Palmitoyl-Transférase (responsable de l'entrée des lipides dans la mitochondrie). Par ailleurs, ces 2 phospholipides sont des ligands naturels des PPARs, facteurs de transcription favorisant l'expression des gènes impliqués dans la β -oxydation (Weber 2009). La présence accrue de ces molécules dans les membranes des mitochondries de manchots acclimatés au milieu marin (**Article 3**) suppose leur implication dans la stimulation du métabolisme lipidique lors de l'acclimatation du manchot Royal immature au milieu marin, à l'image de ce qui est décrit chez les oiseaux migrateurs avant leur migration (Maillet & Weber 2007 ; Weber 2009).

Une interrogation subsiste sur la sélection des substrats énergétiques au cours de la plongée. Une étude de Ponganis et collaborateurs (Ponganis *et al.* 1997) révèle une accumulation de lactate au cours de la plongée chez le manchot Empereur qui traduit une activation de la glycolyse anaérobie. Cependant, notre étude sur le manchot Royal juvénile met en évidence une diminution de l'expression de nombreux gènes de la glycolyse chez les oiseaux acclimatés au milieu marin, qui s'accompagne d'une conservation de l'activité des enzymes impliquées dans la glycolyse. Ces résultats sont d'autant plus curieux que l'expression du gène de la pyruvate déshydrogénase (PDH) est augmentée, pouvant promouvoir une utilisation aérobie des substrats glucidiques, et semblent en désaccord avec les résultats obtenus chez le manchot Empereur suggérant l'implication de la glycolyse anaérobie comme fournisseur d'ATP au cours de plongées prolongées, au-delà des capacités théoriques de plongée en aérobie (Ponganis *et al.* 1997). Par analogie avec le manchot Empereur, nous suspectons un accroissement de l'activité et de l'expression de la pyruvate déshydrogénase chez les manchots Royaux juvéniles acclimatés au milieu marin, enzyme favorable à l'augmentation de la capacité de glycolyse anaérobie pouvant accroître la durée de plongée. Cette absence de différences entre nos différents groupes pourrait s'expliquer par le stade de développement de ces oiseaux, encore juvéniles, qui n'ont peut être pas développés pleinement leurs capacités nécessaires au soutien d'une activité de plongée prolongée ou par une spécificité liée à l'espèce ; une comparaison avec des manchots Royaux adultes, réalisant ces plongées profondes (Schmidt 2006 ; Schmidt *et al.* 2006) pourrait alors nous apporter des éléments de réponse.

Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que l'utilisation des substrats glucidiques étant indispensable uniquement lors de la plongée, le manchot pourrait n'utiliser ces substrats qu'au moment adéquat. Une étude récente dans le muscle de souris a mis en évidence l'importance d'une voie HIF2 dépendante, capable de moduler rapidement la sélection des substrats énergétiques dans le cas d'une ischémie aiguë, induisant une privation d'oxygène que nous pourrions comparer dans notre cas aux plongées profondes (Aragonés *et al.* 2008 ; Dang & Gao 2008). En effet, en présence d'oxygène, PHD1 est capable de dégrader la sous-unité HIF2 α , qui ne peut réprimer l'activité de la PDH via son inhibiteur, la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4). Or l'activité de PHD1 est très rapidement modulable, et en l'absence d'oxygène, l'absence de dégradation de HIF2 va stimuler PPAR α qui oriente, *via* l'activité de PDK4, l'utilisation du glucose par la voie anaérobie et produit du lactate (Aragonés *et al.* 2008 ; Dang & Gao 2008) (**Figure 28**). Cette mobilisation du glucose pourrait être d'autant plus rapide du fait d'une glycémie élevée chez les oiseaux (Beuchat & Chong 1998).

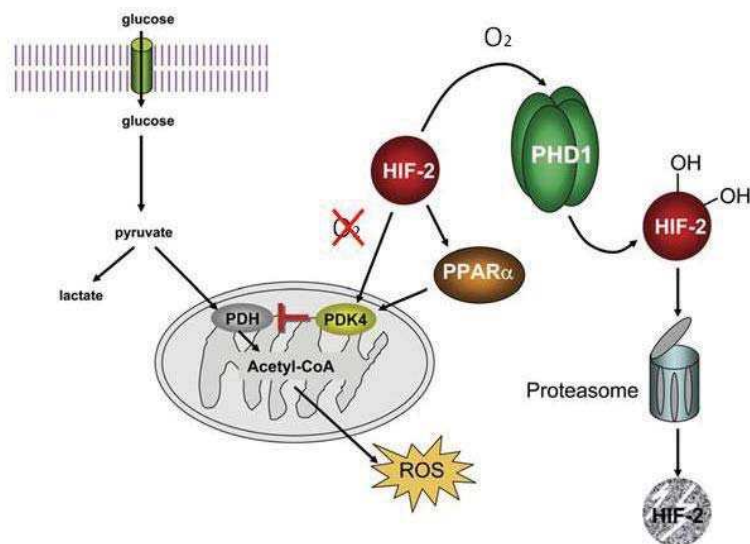


Figure 28 : Illustration de la voie de régulation HIF2 dépendante et son influence sur le métabolisme glucidique. D'après (Dang & Gao 2008)

De plus, par analogie avec l'oie à Tête Barrée qui est exposée à des épisodes d'hypoxie prolongée lors de ses vols migratoires à haute altitude, nous pouvons émettre l'hypothèse que, chez le manchot, des mécanismes ont été développés permettant de recourir le moins possible à un métabolisme anaérobie *via* l'augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (Meir & Ponganis 2009 ; Scott 2011), la vascularisation des muscles et la redistribution des mitochondries à proximité des membranes (mitochondries sub-sarcolemmales), afin de diminuer la distance de diffusion de l'oxygène au niveau intracellulaire (Scott *et al.* 2009a). Cependant, ces mitochondries ont une respiration plus faible et produisent moins d'ATP que les mitochondries intermyofibrillaires (Roussel *et al.* 1998), permettant certes de conserver un métabolisme lipidique aérobie mais avec une efficacité moindre (Scott *et al.* 2009a). De plus, cette redistribution peut entraver les mouvements intracellulaires d'ATP, nécessitant la présence de mécanismes de transport efficaces, comme la créatine kinase (Scott *et al.* 2009a ; Scott *et al.* 2009b).

b/ La contrainte oxydative

Comme nous l'avons détaillé dans la partie « Rappels Bibliographiques », le comportement de pêche du manchot implique des plongées longues et répétées en apnée, exposant cet oiseau à des hypoxies intermittentes (Culik *et al.* 1996 ; Handrich *et al.* 1997 ; Froget *et al.* 2004 ; Ponganis *et al.* 2007 ; Williams *et al.* 2011). De plus, les mécanismes physiologiques développés au cours de la plongée consistent en des ajustements cardiovasculaires favorisant des ischémies / reperfusion tissulaires et des variations du rythme cardiaque, décrit chez le manchot Empereur adulte (Butler &

Jones 1997 ; Meir *et al.* 2008). Tous ces mécanismes affectant la disponibilité en oxygène sont connus pour accroître la production de ROS, particulièrement lors des épisodes de réoxygénation des tissus (Halliwell & Gutteridge 1999 ; Clanton 2007). Cette production d'espèces réactives pourrait être renforcée par la forte glycémie observée chez ces oiseaux ($\approx 15\text{mM}$), dont l'auto-oxydation produit des ROS (Beuchat & Chong 1998), et la stimulation du métabolisme lipidique (**Article 2**), connu pour accroître le ratio NADH/NAD⁺ et réduire le complexe I mitochondrial (Pamplona & Costantini 2011). En accord avec ces hypothèses, nos résultats de la publication n°3 décrivent une stimulation coordonnée d'un ensemble de mécanismes anti-oxydants attestant d'une augmentation de la production de ROS dans le muscle pectoral de manchot Royal juvénile lors de sa vie dans la zone sub-antarctique de l'océan indien. Une confrontation de nos résultats avec d'autres issus d'expérimentation sur des oiseaux adultes permettrait de mieux appréhender l'efficacité de ces mécanismes anti-radicalaires en déterminant si la réponse observée chez ces oiseaux immatures est définitive ou va encore se développer chez les manchots adultes, pleinement acclimatés aux contraintes oxydatives liées à la vie dans le milieu marin.

Ces mécanismes anti-oxydants agissent à différents niveaux : 1/ la limitation de la production de ROS, 2/ la dégradation des ROS et 3/ la réparation ou l'élimination des dégâts induits par les ROS (Storey 1996). Nos résultats montrent une diminution de l'expression des gènes codant pour les enzymes produisant des ROS (NADPH oxydase -19%) ainsi qu'une diminution de la production basale de ROS mitochondriaux (-50%). Cette dernière peut être expliquée par la modification de la composition membranaire des mitochondries, dont l'augmentation de l'index d'insaturation membranaire peut être corrélé positivement avec l'accroissement modéré de la perméabilité de la membrane (+18%), diminuant fortement la production de ROS par mg de mitochondrie (-50%) (Miwa & Brand 2003 ; Hulbert *et al.* 2007). Cependant, ce résultat doit être modulé par l'augmentation de la quantité de mitochondries présentes par g de muscle pectoral (environ +50% - Rey 2008), suggérant que cette modification membranaire permettrait uniquement de compenser la surproduction de ROS liée à la multiplication de ces organites. Ceci s'accompagne d'une augmentation de l'expression des gènes codant pour les enzymes anti-oxydantes (Métallothionéine +180 à +316%) et celles impliquées dans les mécanismes de réparation et de dégradation des molécules endommagées (Méthionine sulfoxide réductase +57%), ainsi qu'un accroissement de l'activité des enzymes anti-oxydantes (SOD +160%, catalase +44%, GPX +32%), déjà très élevée chez les différentes espèces de manchot de la zone polaire par rapport aux autres espèces d'oiseaux (Zenteno-Savin *et al.* 2010).

Si l'activation de ces mécanismes semble favorable à une diminution de la production de ROS, sont-ils suffisants pour empêcher la survenue d'un stress oxydant? La réponse à cette question nécessiterait une investigation des dégâts sur les molécules biologiques (peroxydation lipidique, carbonylation des protéines, présence de 8oxoG sur l'ADN, etc.) que nous n'avons pu réaliser pour

cause de problèmes techniques (la forte présence de myoglobine empêche la mesure de la peroxydation lipidique, manque de spécificité de l'anticorps anti-8-oxoG). Les données concernant l'importance du métabolisme lipidique (**Article 2**), le comportement alimentaire de ces animaux (Schmidt 2006), ainsi que la modification de la composition membranaire mitochondriale qui augmente la susceptibilité de peroxydation de ces lipides (+35%) (Hulbert *et al.* 2007), pourraient suggérer que ces mécanismes ne sont pas totalement suffisants pour empêcher la survenue d'un stress oxydant. Cette production d'espèces radicalaires serait alors un mal nécessaire pour que le manchot Royal puisse assurer ses capacités de thermogenèse et soutenir une activité physique intense et endurante, alors nécessaires à sa survie à court terme.

Notre hypothèse va à l'encontre des théories radicalaires du vieillissement, le manchot étant un animal longévif (Le Bohec *et al.* 2007 ; Lescroël *et al.* 2009), il devrait limiter au maximum sa production de ROS et/ou posséder des membranes moins susceptibles aux attaques radicalaires, non vérifié dans notre étude (Barja 1998 ; Hulbert *et al.* 2007). L'explication d'une telle longévité, alors que le manchot est exposé la majorité de sa vie à un environnement pro-oxydant, pourrait être supportée par 2 hypothèses non exclusives. La première s'appuie sur la sur-expression et l'augmentation de l'activité de la protéine découplante avUCP lors de l'acclimatation au milieu marin observée chez le manchot Royal immature (Talbot *et al.* 2003 ; Talbot *et al.* 2004). Cette protéine, activée à la fois par les acides gras et les ROS, limiterait la production de ROS par la mitochondrie via un effet de découplage modéré (Miwa & Brand 2003). La seconde est liée à de nouvelles études de génétique sur le vieillissement qui ont mis en évidence l'importance de certaines voies cellulaires, impliquant notamment DAF16, et qui permettraient d'allonger la durée de vie chez les drosophiles, les nématodes, certains amphibiens et mammifères. Un stress oxydant modéré pourrait activer ces voies cellulaires, et par conséquent, allonger la durée de vie d'un organisme, remettant ainsi en cause certaines conclusions de la théorie radicalaire du vieillissement (Finch & Austad 2010 ; Kenyon 2010 ; Pan 2011 ; Ristow & Schmeisser 2011 ; Speakman & Selman 2011).

Quels que soient les mécanismes physiologiques sous-jacents permettant d'expliquer la longévité chez cet oiseau, nous avons pu mettre en évidence que la vie marine le contraint à développer un ensemble de mécanismes anti-oxydants pour limiter au maximum l'influence des ROS sur ces molécules biologiques, indispensable pour conserver l'intégrité et la fonctionnalité de ses cellules. Le développement de ces mécanismes, probablement très coûteux en énergie, oblige le manchot Royal à des compromis d'allocation énergétique puisque son comportement de plongée en apnée à l'origine d'une production importante de ROS lui permet d'accéder à sa ressource alimentaire et d'assurer sa survie.

Comme nous l'avons vu au cours de ces 2 études, l'acclimatation du manchot Royal au milieu marin nécessite le développement simultané de multiples mécanismes physiologiques efficaces pour

répondre aux différentes contraintes parfois antagonistes dues à la vie en milieu marin. Nous avons principalement axé nos recherches sur la plasticité métabolique et les mécanismes anti-oxydants chez cet oiseau. Cependant, l'analyse sans a priori des puces à ADN révèle des modifications d'expression de nombreux autres gènes impliqués dans d'autres voies cellulaires participant certainement au succès de cette période cruciale de la vie du manchot : le passage en mer (Table 5).

Catégories	p-value
Développement des organes	0,0058
Développement musculaire	0,0009
Glycolyse	0,0284
Métabolisme de l'oxygène et de ses dérivés réactifs	0,0366
Réponse au stress	0,0346
Réponse au stress oxydant	0,0050
Réponse au stimulus abiotique	0,0288
Réponse au stimulus chimique	0,0123
Réponse en phase aiguë	0,0001
Régulation de l'adhésion cellulaire	0,0306
Transport des anions inorganiques	0,0288

Table 5 : Classement des gènes différentiellement exprimés (test de Smyth associé à la correction de Benjamini et Hochberg (Benjamini & Hochberg 1995 ; Smyth 2004)) dans les différentes catégories Gene Ontology à l'aide du logiciel GeneSpring.

Dans le même domaine de gestion énergétique imposé par l'environnement antarctique et/ou le cycle biologique de l'animal, nous nous sommes interrogés sur la stratégie adoptée par le manchot Adélie lors d'une autre phase critique de son cycle de vie, la croissance.

3/ La croissance en milieu polaire

Les résultats de notre publication 4 montrent que le poussin manchot Adélie répond au défi représenté par la croissance rapide dans un environnement thermiquement très défavorable en allouant séquentiellement ses ressources énergétiques à sa croissance puis au développement de ses mécanismes thermogènes.

a/ Favoriser la croissance...

A l'instar des autres espèces d'oiseaux polaires, qu'elles soient nidicoles ou nidifuges, les manchots Adélie ont un taux de croissance élevé, par rapport aux espèces vivant à proximité de l'équateur (Ricklefs 1979 ; Bucher *et al.* 1990 ; Schekkerman *et al.* 2003). La croissance est essentiellement réalisée durant les premiers jours post-embryonnaires, période durant laquelle le poussin est capable de multiplier sa masse par 5 en moins d'une semaine (**Article 4**), cette croissance rapide étant retrouvée d'autres espèces de manchots comme les poussins manchots Royaux (Duchamp *et al.* 2002). Cette croissance pondérale et structurale observée chez les différentes espèces de manchots s'accompagne d'un développement particulièrement rapide des os (chez le manchot Royal - de Margerie *et al.* 2004), des muscles et du tissu adipeux (chez les manchots Adélie et Royaux respectivement - Raccurt *et al.* 2008 ; Erbrech 2011). Nous avons mis en évidence, chez le manchot Adélie, que cette phase est médiée, entre autre, par la GH et l'IGF1, dont l'expression de leurs récepteurs respectifs est élevée durant les premiers jours, dans les tissus adipeux et musculaires (Raccurt *et al.* 2008 ; **Article 4**), favorisant la prolifération cellulaire (Halevy *et al.* 1996). Cette dernière doit être totalement réalisée avant la maturation des tissus car l'acquisition de leur fonctionnalité bloque toute possibilité de division.

Cependant, la croissance post-embryonnaire peut être influencée par différents facteurs tel que l'abondance et la qualité de la nourriture ingérée (Martin 1987). Pour exemple, la richesse en lipides des proies rapportées au nid contrôle positivement le taux de croissance des poussins des oiseaux marins, tels que le guillemot colombin (*Cepphus columba*) (Golet *et al.* 2000). A l'inverse, une étude sur le cormoran huppé (*Phalacrocorax aristotelis*) a montré que la restriction calorique s'accompagne d'une réduction de la masse de certains organes, comme le tissu adipeux et le muscle (Moe *et al.* 2004). Ces études soulignent que la limitation des ressources alimentaires oblige le poussin à réaliser des compromis énergétiques pour assurer les fonctions biologiques prioritaires. Dans le cas du poussin manchot Adélie, la croissance rapide et la mise en place des mécanismes thermogènes représentent un coût énergétique qu'il ne peut gérer simultanément même s'il est bien nourri par ses parents (Culik 1994). Il va donc profiter de la période de protection thermique au contact de la poche incubatrice pour orienter son métabolisme vers la croissance ; cette dernière diminuera dès lors que l'animal devra maintenir seul son endothermie.

b/ ... pour mieux développer les mécanismes thermogènes

La thermogénèse de frisson est mise en place très précocement dans le muscle pectoral des poussins manchots Adélie mais ce mécanisme n'est pas suffisant pour maintenir leur température interne (**Article 4**). Nos résultats montrent, comme pour le manchot Royal (Duchamp *et al.* 2002), que l'émancipation thermique nécessite une réduction des pertes thermique, *via* la diminution du ratio Surface/Volume (-70% entre J1 et J30) et le développement d'un duvet isolant. Cette phase s'accompagne d'une augmentation de la production de chaleur due au frisson thermique, nécessitant le développement de l'activité ATPase myofibrillaire dans les fibres musculaires (Hohtola & Visser 1998 dans Erbrech 2011 ; **Article 4**). Le muscle pectoral est alors essentiellement composé de fibres rapides oxydo-glycolytiques, favorables au développement du frisson thermique (Aulie & Tøien 1988). Malgré ce mécanisme thermogène, les poussins doivent se regrouper en crèche, comportement connu pour diminuer le coût de la thermogénèse chez les adultes (Ancel *et al.* 1997 ; Gilbert *et al.* 2008), leur permettant d'achever leur croissance. Les parents peuvent alors laisser leur progéniture seule sur la colonie et multiplier les voyages alimentaires pour subvenir aux besoins nutritionnels des poussins.

Dès 30 jours, le poussin montre des capacités de thermogénèse sans frisson qui semblent s'intensifier jusqu'à J60. En effet, l'accroissement de l'expression du gène avUCP (+7100% entre J15 et J60) dans le muscle pectoral pourrait être corrélé à l'augmentation de l'intensité de la NST, comme ceci a été évoqué lors de l'acclimatation des canetons au froid (Teulier *et al.* 2010). De plus, cette phase est concomitante avec une modification du métabolisme en faveur de l'oxydation des lipides, substrat énergétique connu pour stimuler les mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans la NST, tel que le cycle futile du calcium (Dumonteil *et al.* 1993 ; Dumonteil *et al.* 1994a) ou le découplage mitochondrial favorisé par l'augmentation de l'activité de l'avUCP et/ou l'avANT, déjà observé chez différentes espèces aviaires en réponse à l'exposition au froid (Toyomizu *et al.* 2002 ; Talbot *et al.* 2003 ; Rey *et al.* 2010b). La diminution de l'expression des récepteurs des hormones de croissance (GHR -42%, IGF1R -48% entre J1 et J15) observée dans le muscle (**Article 4**) et le tissu adipeux (Raccurt *et al.* 2008) durant cette phase traduit une diminution de la croissance tissulaire qui permet au poussin manchot Adélie d'allouer préférentiellement l'énergie disponible à la maturation musculaire et au développement des mécanismes thermogènes, indispensables à la survie du manchot Adélie juvénile dans l'océan antarctique.

4/ L'énergétique cellulaire, au cœur des mécanismes d'acclimatation

Au cours de nos différents travaux, nous avons pu observer que les manchots sont capables de répondre efficacement aux différentes contraintes liées à leur environnement et leur cycle de vie, en développant des mécanismes cellulaires et moléculaires spécifiques. Or l'exposition à ces contraintes implique soit une augmentation de la dépense énergétique directement et/ou *via* le développement de voies cellulaires particulières (sur-expression des enzymes du métabolisme lipidique, maturation des mécanismes thermogènes, développement des mécanismes anti-oxydants) (**Articles 2, 3, 4**), soit une diminution de la disponibilité en énergie (manque d'oxygène lors de la plongée, quantité de nourriture, jeûne alimentaire, etc.) (**Articles 2, 4**, Culik 1994). L'organisme doit constamment composer avec d'un côté le développement de mécanismes physiologiques, et de l'autre ses ressources énergétiques. Il est donc légitime de penser que le développement des mécanismes d'acclimatation, soutenu entre autre par des variations d'expression génique, va être en partie contrôlé par des mécanismes/enzymes capables de déterminer la quantité d'énergie disponible dans la cellule. Cette régulation est cruciale dans le muscle pectoral, tissu très consommateur d'énergie, dont le fonctionnement peut être modifié profondément pour répondre aux différentes contraintes auxquelles le manchot est confronté.

Parmi les molécules signal capables de renseigner l'état énergétique de la cellule, nous pouvons citer les substrats énergétiques (glycogène, acides gras), les produits du métabolisme (NADH, FADH₂, ATP, AMP, créatine phosphate) et d'autres molécules ou paramètres physiologiques influençant le métabolisme (O₂, ROS, pH). Ces signaux cellulaires vont agir sur différents « senseurs » (**Figure 29**), dont l'activation influence l'expression de nombreux gènes et le fonctionnement de différents acteurs cellulaires, comme les voies métaboliques ou la mitochondrie (review dans Freyssenet 2007). En effet, cet organite, véritable centrale énergétique de la cellule, est très fortement liée à l'expression de différents gènes nucléaires, codant pour des protéines agissant directement sur son activité (NO synthase, UCP, ANT, mitofusine) (Freyssenet 2007 ; Rey 2008). A l'inverse, de nombreuses molécules produites par la mitochondrie (ATP, ROS) vont aussi influencer l'expression des gènes nucléaires et l'activité cellulaire. Cette communication entre les différents compartiments cellulaires, sous contrôle de ces « senseurs » énergétiques (AMPK, Sirtuin, PPARs), apparaît cruciale pour la mise en place d'une réponse cellulaire coordonnée, à la base des mécanismes d'acclimatation mis en évidence au cours de nos travaux.

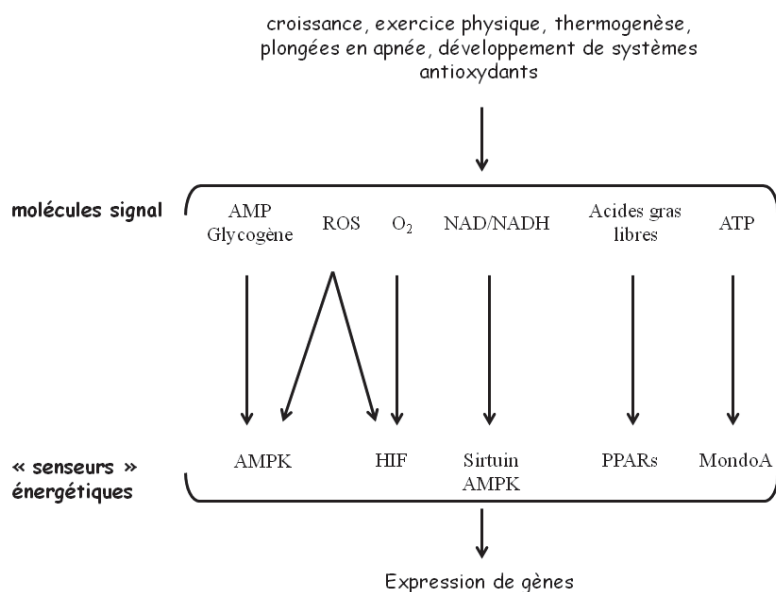


Figure 29 : Influence des différentes contraintes environnementales ou liées au cycle biologique du manchot sur l'expression des gènes. Ce schéma met en évidence l'importance des voies impliquées dans l'énergétique cellulaire. (D'après Freyssenet 2007)

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu, grâce à une technologie d'analyse du transcriptome, mettre en évidence des activations et inhibitions de familles de gènes qui sous-tendent l'extraordinaire complexité des mécanismes d'acclimatation par lesquels le manchot Royal et le manchot Adélie surmontent les différents compromis énergétiques imposés par leur vie dans les environnements polaires (contraintes métabolique vs oxydative / croissance vs thermogénèse). Nous avons ensuite décrypté ces mécanismes par différentes approches plus intégratives pour évaluer l'optimisation de ces processus physiologiques face aux diverses contraintes rencontrées par ces animaux tout au long de leur vie. La survie de ces oiseaux résulte à la fois de l'efficacité et de la coordination des réponses métaboliques pour qu'ils puissent croître, maintenir leur homéothermie, soutenir une activité physique endurante lors des voyages alimentaires, réaliser des plongées longues et profondes en apnée et gérer la production d'espèces réactives de l'oxygène (**Figure 30**).

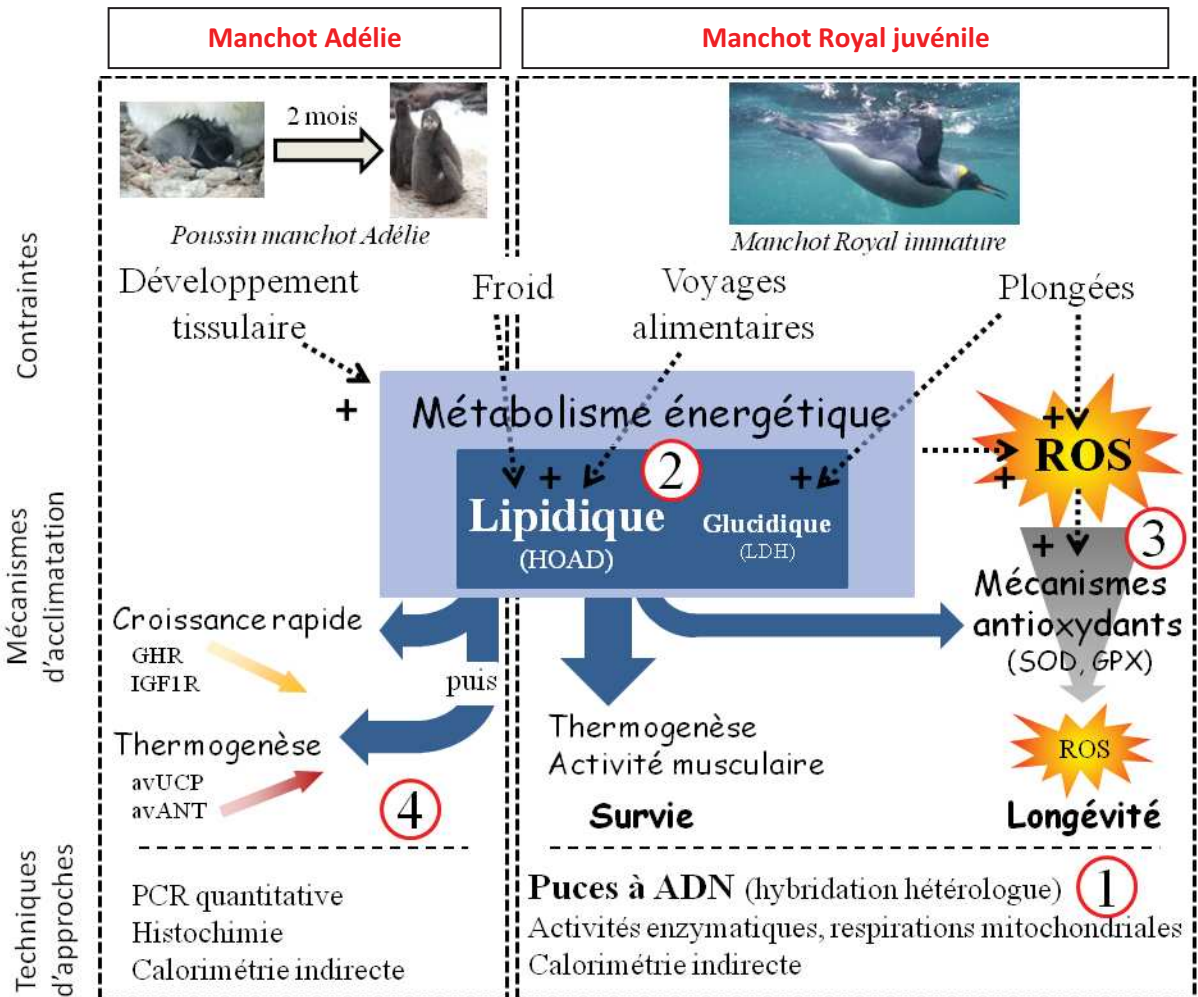


Figure 30 : Schéma synthétique des mécanismes d'acclimatation développés par les manchots pour surmonter les contraintes liées à la croissance rapide en milieu froid chez le poussin manchot Adélie et à la première exposition aux contraintes du milieu marin chez le manchot Royal juvénile. Les différentes contraintes vont influencer le métabolisme énergétique chez les 2 espèces de manchot. i/ Lors de la croissance rapide du poussin manchot Adélie, l'activation du métabolisme permet de fournir séquentiellement l'énergie (flèches pleines) à la croissance du poussin puis au développement de ses mécanismes thermogènes, stratégie soutenue par une expression séquentielle des gènes codant pour les protéines stimulant la croissance (GHR, IGF1R) puis la thermogénèse (avUCP, avANT), garantissant la réussite de cette phase. ii/ Au cours du passage en mer du manchot Royal, la stimulation du métabolisme lipidique permet de soutenir l'activité physique endurante et la thermogénèse, nécessaire à sa survie dans l'océan antarctique. Le métabolisme glucidique anaérobie est utilisé transitoirement lors des phases de plongées en apnée. La production de ROS, stimulée par les plongées et la stimulation du métabolisme énergétique, est limitée par l'action de différents mécanismes anti-oxydants, consommateurs d'énergie. Ces processus sont indispensables pour assurer la longévité de ces oiseaux. L'étude de ces mécanismes intervenant lors du passage en mer du manchot Royal a été possible grâce à l'utilisation d'une technologie de transcriptomique à haut débit, la puce à ADN. Les numéros des articles dans lesquels nous abordons ces processus biologiques sont indiqués entourés en rouge dans la figure.

La survie des organismes dépend de leur capacités d'adaptation. La caractérisation de ces mécanismes représente donc une étape indispensable pour évaluer la vulnérabilité des espèces, plus particulièrement face aux changements climatiques annoncés. Ces évaluations ne pourront se faire sans le concours des nouvelles techniques de biologie moléculaire, technologies d'espoir pour l'écophysiologie de demain.

5/ Perspectives

Ce travail de thèse a permis de déterminer l'implication de différents mécanismes physiologiques soutenant l'acclimatation des manchots lors de 2 phases cruciales de leur cycle biologique : la croissance et le passage du milieu terrestre au milieu marin. Grâce à des techniques d'analyse du transcriptome, nous avons mis en évidence des modifications coordonnées d'expression de gènes dans le muscle pectoral, permettant à ces oiseaux de répondre efficacement aux multiples contraintes énergétiques liées à leur vie en milieu polaire.

Néanmoins, nos résultats soulèvent de nombreuses questions auxquelles nos futures expérimentations essaieront de répondre.

Tout d'abord, il convient de compléter les données obtenues dans les articles 3 et 4 pour renforcer la portée de nos conclusions.

- Article 3 : **déterminer l'existence (ou non) d'un stress oxydant lors de l'acclimatation au milieu marin du manchot Royal.** La mesure des dégâts oxydatifs sur les molécules biologiques devra être entreprise en utilisant de nouveaux marqueurs comme l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), le 4 hydroxynonéal (4 HNE), les protéines carbonylées, la présence d'adduit sur l'ADN.
- Article 4 : **prouver l'existence d'un mécanisme de thermogenèse sans frisson chez le poussin manchot Adélie de 60 jours,** et le comparer à nos valeurs obtenues sur des manchots adultes. Ceci permettrait de déterminer la part de l'exposition au froid (en milieu terrestre) et celle de l'acclimatation au milieu marin dans le développement de la NST.

Ensuite, il serait intéressant de **décrypter plus précisément l'influence des différentes contraintes (thermique, activité physique, plongée) au cours de l'acclimatation du manchot Royal immature au milieu marin.** Un groupe d'oiseaux NI a été artificiellement acclimaté au milieu marin (protocole décrit dans Barré & Roussel 1986) et une analyse par puce à ADN réalisée. Ce protocole devrait permettre d'isoler l'effet de la contrainte thermique des autres contraintes, et représenter alors un stade intermédiaire, comme ceci a été observé par Talbot et collaborateurs (Talbot *et al.* 2004) lors de l'étude de l'activité des protéines découplantes mitochondriales. Nos résultats sont inattendus, avec la caractérisation d'une majorité de gènes dont l'expression est réprimée après ce traitement, semblables aux réponses observées chez des cellules qui ont subi un stress thermique

(Sonna *et al.* 2002). Cette expérimentation mimant les bains réalisés par les manchots au cours de leur acclimatation au milieu marin, nous pouvons faire l'hypothèse que ces manchots sont dans une dynamique d'acclimatation précédant probablement le développement d'une réponse physiologique plus complète. Ces résultats demandent de plus amples investigations.

Pour valider et compléter nos résultats obtenus chez les juvéniles acclimatés au milieu marin, il serait intéressant de les comparer aux **manchots Royaux adultes**, oiseaux qui ont pleinement développé leurs mécanismes d'acclimatation au milieu marin et qui réalisent fréquemment des plongées à grandes profondeurs et de longues durées. Se pose alors le problème de savoir à quel stade du cycle reproduction et dans quel état nutritionnel nous devrions choisir ces oiseaux.

Nous avons suggéré **l'importance de l'énergétique cellulaire dans le développement des mécanismes d'acclimatation**. Plus particulièrement, nous avons supposé le rôle essentiel de nombreuses enzymes, comme l'AMP kinase, pour moduler l'expression génique, et à terme, participer à l'élaboration des mécanismes d'acclimatation du manchot aux multiples contraintes de son environnement.

- Dans ce cadre, il apparaît pertinent d'observer la variation d'expression et d'activité de cette enzyme lors des phases clés du cycle de vie de cet oiseau. Des résultats préliminaires montrent d'ailleurs une modification de l'expression de certaines sous-unités de l'AMPK lors du jeûne alimentaire du manchot Royal.
- Pour compléter cette approche, nous pourrions utiliser une approche *ex vivo*, développée au cours de la campagne d'été 2009-2010. Nous sommes en mesure de conserver des biopsies musculaires pendant plusieurs heures dans un milieu de culture et observer des variations d'expression géniques en relation avec des stimulations hormonales (T3, isoprotérénol). Nous pourrions alors stimuler l'activité de cette enzyme pharmacologiquement (via AICAR) et déterminer son influence sur le fonctionnement cellulaire (expression des gènes impliqués dans les mécanisme »s d'acclimatation, activités enzymatiques et respiration sur fibres isolées).

Enfin, si ces travaux montrent l'importance des mécanismes d'acclimatation tout au long du cycle biologique du manchot, il serait intéressant de voir leur implication à une échelle plus vaste,

l'échelle évolutive. En effet, certaines théories soutiennent que la plasticité phénotypique (variation d'expression de gènes) précède l'adaptation (changement de séquence d'un gène pouvant modifier l'activité de la protéine qu'il code) lors des phénomènes de spéciation (Waddington 1942). La sélection d'adaptation aura pour corollaire une diminution de la plasticité phénotypique, rendant les manchots potentiellement vulnérables à un changement environnemental rapide (Waddington 1942). Or des analyses phylogéographiques (Banks *et al.* 2006 ; Jouventin *et al.* 2006) ont montré que les masses d'eau de l'Océan Austral ont un rôle prépondérant sur la structure génétique des populations de gorfous sauteurs. En effet, l'aire de répartition de cette espèce est traversée par le Front Sub-tropical, une barrière océanographique majeure séparant les eaux sub-tropicales des eaux sub-antarctiques, plus froides de 10°C. Les datations moléculaires suggèrent que la divergence entre les gorfous sub-antarctiques et sub-tropicaux pourrait être liée à la transition du Pléistocène Moyen, un changement climatique majeur qui s'est accompagné d'un décalage vers le Sud des isothermes des masses d'eau de l'Océan Austral. Cette redistribution des températures pourrait avoir causé une spéciation vicariante en séparant écologiquement des populations de manchots auparavant génétiquement indifférenciées (de Dinechin *et al.* 2009), et permis la sélection d'adaptations propres à chaque masse d'eau.

L'utilisation des technologies de pyroséquençage (Illumina) permettrait de rechercher simultanément les principaux gènes impliqués dans le développement de mécanismes d'acclimatation liés à des différences de conditions environnementales ainsi que le polymorphisme pouvant attester d'un mécanisme adaptatif. Outre la détermination de l'implication des mécanismes d'acclimatation à l'échelle évolutive, cette étude pourrait permettre d'évaluer dans quelle mesure les gorfous sauteurs sont adaptés à une plage de températures restreinte, et de là leur sensibilité potentielle à des changements de températures.

Références bibliographiques

A

- Abei, H. 1984 Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**, 121-126.
- Adán, C., Ardévol, A., Remesar, X., Alemany, M. & Fernández-López, J. 1995 Hindleg muscle energy and substrate balances in cold-exposed rats. *Journal of Experimental Biology* **198**, 1243.
- Affymetrix. <http://www.affymetrix.com>
- Ainley, D., Ballard, G., Emslie, S., Fraser, W., Wilson, P. & Woehler, E. 2003 Adélie penguins and environmental change. *Science* **300**, 429.
- Altieri, F., Grillo, C., Maceroni, M. & Chichiarelli, S. 2008 DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & Redox Signaling* **10**, 891-938.
- Ancel, A., Visser, H., Handrich, Y., Masman, D. & Maho, Y. L. 1997 Energy saving in huddling penguins. *Nature* **385**, 304-305.
- Aragonés, J., Schneider, M., Van Geyte, K., Fraisl, P., Dresselaers, T., Mazzone, M., Dirkx, R., Zacchigna, S., Lemieux, H. & Jeoung, N. H. 2008 Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nature genetics* **40**, 170-180.
- Arigon, A. M., Perrière, G. & Gouy, M. 2006 HoSeqI: automated homologous sequence identification in gene family databases. *Bioinformatics* **22**, 1786.
- Aulie, A. & Tøien, Ø. 1988 Threshold for shivering in aerobic and anaerobic muscles in bantam cocks and incubating hens. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **158**, 431-435.

B

- Baldwin, J., Jardel, J. P., Montague, T. & Tomkin, R. 1984 Energy metabolism in penguin swimming muscles. *Molecular physiology* **6**, 33-41.
- Bandman, E. & Rosser, B. W. C. 2000 Evolutionary significance of myosin heavy chain heterogeneity in birds. *Microscopy Research and Technique* **50**, 473-491.
- Banks, J., Van Buren, A., Cherel, Y. & Whitfield, J. B. 2006 Genetic evidence for three species of rockhopper penguins, *Eudyptes chrysocome*. *Polar Biology* **30**, 61-67.
- Bannasch, R. 1995 Hydrodynamics of penguins—an experimental approach. *The penguins*, 141-176.
- Bar-Or, C., Bar-Eyal, M., Gal, T., Kapulnik, Y., Czosnek, H. & Koltai, H. 2006 Derivation of species-specific hybridization-like knowledge out of cross-species hybridization results. *BMC Genomics* **7**, 110.
- Bar-Or, C., Czosnek, H. & Koltai, H. 2007 Cross-species microarray hybridizations: a developing tool for studying species diversity. *TRENDS in Genetics* **23**, 200-207.
- Barja, G. 1998 Mitochondrial Free Radical Production and Aging in Mammals and Birds. *Annals of the New York Academy of Sciences* **854**, 224-238.
- Barré, H. 1978 Dépense énergétique du poussin de manchot Royal *Aptenodytes patagonicus* (JF Miller) au cours de la croissance. *Journal of Physiology - Paris* **74**, 555-561.
- Barré, H. 1984a Metabolic and insulative changes in winter-and summer-acclimatized king penguin chicks. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **154**, 317-324.

- Barré, H. 1984b Recherche sur la thermogenèse de régulation chez l'oiseau : étude expérimentale chez le poussin de manchot Royal et le caneton de Barbarie. Thèse. Université Paris 6.
- Barré, H., Chatonnet, J., Le Maho, Y. & Valatx, J. L. 2001 Physiologie énergétique. *Editions Belin*.
- Barré, H., Geloën, A., Chatonnet, J., Dittmar, A. & Rouanet, J. L. 1985 Potentiated muscular thermogenesis in cold-acclimated muscovy duckling. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **249**, R533.
- Barré, H., Nedergaard, J. & Cannon, B. 1986 Increased respiration in skeletal muscle mitochondria from cold-acclimated ducklings: uncoupling effects of free fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **85**, 343-348.
- Barré, H. & Rouanet, J. L. 1983 Calorigenic effect of glucagon and catecholamines in king penguin chicks. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **244**, R758.
- Barré, H. & Roussel, B. 1986 Thermal and metabolic adaptation to first cold-water immersion in juvenile penguins. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **251**, 456.
- Beaulieu, M., Ropert-Coudert, Y., Le Maho, Y., Ancel, A. & Criscuolo, F. 2010 Foraging in an oxidative environment: relationship between ^{13}C values and oxidative status in Adélie penguins. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**, 1087.
- Beckman, K. B. & Ames, B. N. 1998 The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* **78**, 547.
- Benistant, C. 1997 Transport plasmatique et cellulaire des acides gras chez les oiseaux développant une thermogenèse sans frisson : Etude comparée chez le caneton de Barbarie acclimaté au froid et le poussin de manchot Royal en conditions naturelles: Université Claude Bernard Lyon 1.
- Bénistant, C., Duchamp, C., Cohen-Adad, F., Rouanet, J. L. & Barré, H. 1998 Increased in vitro fatty acid supply and cellular transport capacities in cold-acclimated ducklings (*Cairina moschata*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **275**, R683.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. 1995 Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 289-300.
- Bertelli, S. & Giannini, N. P. 2005 A phylogeny of extant penguins (Aves: Sphenisciformes) combining morphology and mitochondrial sequences. *Cladistics* **21**, 209-239.
- Beuchat, C. A. & Chong, C. R. 1998 Hyperglycemia in hummingbirds and its consequences for hemoglobin glycation. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* **120**, 409-416.
- Bezaire, V., Seifert, E. & Harper, M. 2007 Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *The FASEB Journal* **21**, 312.
- Blondel, J. 2000 Evolution and ecology of birds on islands: trends and prospects. *Vie et milieu* **50**, 205-220.
- Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H. & White, J. S. S. 2009 Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **24**, 127-135.
- Bolstad, B., Irizarry, R., Astrand, M. & Speed, T. 2003 A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**, 185.
- Bost, C., Georges, J., Guinet, C., Cherel, Y., Pütz, K., Charrassin, J., Handrich, Y., Zorn, T., Lage, J. & Le Maho, Y. 1997 Foraging habitat and food intake of satellite-tracked king penguins during the austral summer at Crozet Archipelago. *Marine Ecology Progress Series* **150**, 21-33.

- Bracken, C.P., Whitelax, M.L. & Peet, D.J. 2003 The hypoxia-inducible factors : key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 1376-1393.
- Brand, M. 2000 Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology* **35**, 811-820.
- Bucher, T. L., Chappell, M. A. & Morgan, K. R. 1990 The ontogeny of oxygen consumption and ventilation in the Adélie penguin, *Pygoscelis adeliae*. *Respiration physiology* **82**, 369-388.
- Buckley, B. A. 2007 Comparative environmental genomics in non-model species: using heterologous hybridization to DNA-based microarrays. *Journal of Experimental Biology* **210**, 1602.
- Butler, P. J. 2010 High fliers: The physiology of bar-headed geese. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* **156**, 325-329.
- Butler, P. J. & Jones, D. R. 1997 Physiology of diving of birds and mammals. *Physiological Reviews* **77**, 837.
- Buttemer, W. A., Abele, D. & Costantini, D. 2010 From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Functional Ecology*.
- Buttemer, W. A., Battam, H. & Hulbert, A. 2008 Fowl play and the price of petrel: long-living Procellariiformes have peroxidation-resistant membrane composition compared with short-living Galliformes. *Biology letters* **4**, 351.

C

- Cannon, B. & Nedergaard, J. 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews* **84**, 277.
- Châinier, F., Roussel, D., Georges, B., Meister, R., Rouanet, J. L., Duchamp, C. & Barré, H. 2000 Cold acclimation or grapeseed oil feeding affects phospholipid composition and mitochondrial function in duckling skeletal muscle. *Lipids* **35**, 1099-1106.
- Charrassin, J. & Bost, C. 2001 Utilisation of the oceanic habitat by king penguins over the annual cycle. *Marine Ecology Progress Series* **221**, 285-298.
- Chen, W., Yang, Q. & Roeder, R. 2009 Dynamic Interactions and Cooperative Functions of PGC-1 α and MED1 in TR α -Mediated Activation of the Brown-Fat-Specific UCP-1 Gene. *Molecular cell* **35**, 755-768.
- Chen, W., Zhang, X., Birsoy, K. & Roeder, R. 2010 A muscle-specific knockout implicates nuclear receptor coactivator MED1 in the regulation of glucose and energy metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 10196.
- Cheng, G., Salerno, J. C., Cao, Z., Pagano, P. J. & Lambeth, J. D. 2008 Identification and characterization of VPO1, a new animal heme-containing peroxidase. *Free Radical Biology and Medicine* **45**, 1682-1694.
- Cheng, S., Leonard, J. & Davis, P. 2010 Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine reviews* **31**, 139.
- Cherel, Y., Charrassin, J.B. & Challet, E. 1994 Energy and protein requirements for molt in the king penguin *Aptenodytes patagonicus*. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **266**, R1182-R1188.
- Cherel, Y., Charrassin, J. B. & Handrich, Y. 1993 Comparison of body reserve buildup in prefasting chicks and adults of king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *Physiological zoology*, 750-770.

- Cherel, Y., Durant, J. & Lacroix, A. 2004 Plasma thyroid hormone pattern in king penguin chicks: a semi-altricial bird with an extended post-hatching developmental period. *General and comparative endocrinology* **136**, 398-405.
- Chuaqui, R. F., Bonner, R. F., Best, C. J. M., Gillespie, J. W., Flaig, M. J., Hewitt, S. M., Phillips, J. L., Krizman, D. B., Tangrea, M. A. & Ahram, M. 2002 Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nature genetics* **32**, 509-514.
- Clanton, T. L. 2007 Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* **102**, 2379.
- Clark, M. S., Thorne, M. A. S., Toullec, J. Y., Meng, Y., Peck, L. S. & Moore, S. 2011 Antarctic Krill 454 Pyrosequencing Reveals Chaperone and Stress Transcriptome. *PloS one* **6**, e15919.
- Clarke, A., Aronson, R. B., Crame, J. A., Gili, J. M. & Blake, D. B. 2004 Evolution and diversity of the benthic fauna of the Southern Ocean continental shelf. *Antarctic Science* **16**, 559-568.
- Clarke, A., Crame, J. A., Stromberg, J. O. & Barker, P. 1992 The Southern Ocean benthic fauna and climate change: a historical perspective [and discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **338**, 299.
- Clarke, J. A., Ksepka, D. T., Stucchi, M., Urbina, M., Giannini, N., Bertelli, S., Narváez, Y. & Boyd, C. A. 2007 Paleogene equatorial penguins challenge the proposed relationship between biogeography, diversity, and Cenozoic climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 11545.
- Collin, A., Buyse, J., Van As, P., Darras, V., Malheiros, R., Moraes, V., Reyns, G., Taouis, M. & Decuypere, E. 2003a Cold-induced enhancement of avian uncoupling protein expression, heat production, and triiodothyronine concentrations in broiler chicks. *General and comparative endocrinology* **130**, 70-77.
- Collin, A., Taouis, M., Buyse, J., Ifuta, N. B., Darras, V. M., Van As, P., Malheiros, R. D., Moraes, V. & Decuypere, E. 2003b Thyroid status, but not insulin status, affects expression of avian uncoupling protein mRNA in chicken. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism* **284**, E771.
- Corbel, H., Morlon, F. & Groscolas, R. 2008 Is fledging in king penguin chicks related to changes in metabolic or endocrinal status? *General and Comparative Endocrinology* **155**, 804-13.
- Corsolini, S., Nigro, M., Olmastroni, S., Focardi, S. & Regoli, F. 2001 Susceptibility to oxidative stress in Adélie and emperor penguin. *Polar Biology* **24**, 365-368.
- Costantini, D. 2008 Oxidative stress in ecology and evolution : lessons from avian studies. *Ecology Letters* **11**, 1238-1251.
- Costantini, D., Dell'Araccia, G. & Lipp, H. P. 2008 Long flights and age affect oxidative status of homing pigeons (*Columba livia*). *Journal of Experimental Biology* **211**, 377.
- Costantini, D. & Verhulst, S. 2009 Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? *Functional Ecology* **23**, 506-509.
- Culik, B. 1994 Energetic costs of raising pygoscelid penguin chicks. *Polar Biology* **14**, 205-210.
- Culik, B., Pütz, K., Wilson, R., Allers, D., Lage, J., Bost, C. & Le Maho, Y. 1996 Diving energetics in king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *Journal of Experimental Biology* **199**, 973.

D

- Dang, C. V. & Gao, P. 2008 Muscle Fatigue from Losing Your PHD. *Cell Metabolism* **7**, 191-192.
- Davies, K. J. A. 2000 Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life* **50**, 279-289.
- Dawson, C., Vincent, J. F. V., Jeronimidis, G., Rice, G. & Forshaw, P. 1999 Heat transfer through penguin feathers. *Journal of theoretical biology* **199**, 291-295.
- de Dinechin, M. 2009 Patrons et processus de spéciation dans l'Océan Austral : L'exemple des Manchots (Aves : *Spheniscidae*). Thèse. SUPAGRO.
- de Dinechin, M., Ottvall, R., Quillfeldt, P. & Jouventin, P. 2009 Speciation chronology of rockhopper penguins inferred from molecular, geological and palaeoceanographic data. *Journal of Biogeography* **36**, 693-702.
- de Margerie, E., Robin, J. P., Verrier, D., Cubo, J., Groscolas, R. & Castanet, J. 2004 Assessing a relationship between bone microstructure and growth rate: a fluorescent labelling study in the king penguin chick (*Aptenodytes patagonicus*). *Journal of Experimental Biology* **207**, 869.
- Dégletagne, C., Rey, B., Keime, C., de Dinechin, M., Rouanet, J., Roussel, D. & Duchamp, C. 2009 Transcriptional analysis of skeletal muscle adaptations to marine life in king penguin juveniles (*Aptenodytes patagonicus*). *The FASEB Journal* **23**, 629.5.
- Donmez, G. & Guarente, L. 2010 Aging and disease: connections to sirtuins. *Aging Cell* **9**, 285-290.
- Dozin, B., Magnuson, M. A. & Nikodem, V. M. 1986 Thyroid hormone regulation of malic enzyme synthesis. Dual tissue-specific control. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 10290.
- Dröge, W. 2002 Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* **82**, 47.
- Duchamp, C. 1990 Démonstration d'un thermogénèse sans frisson d'origine musculaire chez l'oiseau : étude chez le caneton de Barbarie et le poussin de manchot Royal. Thèse. Université Claude Bernard Lyon 1.
- Duchamp, C. & Barré, H. 1993 Skeletal muscle as the major site of nonshivering thermogenesis in cold-acclimated ducklings. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **265**, R1076.
- Duchamp, C., Barré, H., Delage, D., Rouanet, J., Cohen-Adad, F. & Minaire, Y. 1989 Nonshivering thermogenesis and adaptation to fasting in king penguin chicks. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **257**, 744.
- Duchamp, C., Barré, H., Rouanet, J., Lanni, A., Cohen-Adad, F., Berne, G. & Brebion, P. 1991 Nonshivering thermogenesis in king penguin chicks. I. Role of skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **261**, 1438.
- Duchamp, C., Chatonnet, J., Dittmar, A. & Barré, H. 1993 Increased role of skeletal muscle in the calorogenic response to glucagon of cold-acclimated ducklings. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **265**, R1084.
- Duchamp, C., Cohen-Adad, F., Rouanet, J. & Barré, H. 1992 Histochemical arguments for muscular non-shivering thermogenesis in muscovy ducklings. *The Journal of Physiology* **457**, 27.
- Duchamp, C., Marmonier, F., Denjean, F., Lachuer, J., Eldershaw, T., Rouanet, J., Morales, A., Meister, R., Benistant, C. & Roussel, D. 1999 Regulatory, cellular and molecular aspects of avian muscle nonshivering thermogenesis. *Ornis Fennica* **76**, 151-166.
- Duchamp, C., Rouanet, J. L. & Barré, H. 2002 Ontogeny of thermoregulatory mechanisms in king penguin chicks (*Aptenodytes patagonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* **131**, 765-773.

- Ducharme, M. & Lounsbury, D. 2007 Self-rescue swimming in cold water: the latest advice. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* **32**, 799-807.
- Dumonteil, E., Barré, H. & Meissner, G. 1993 Sarcoplasmic reticulum Ca (2+)-ATPase and ryanodine receptor in cold-acclimated ducklings and thermogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **265**, C507.
- Dumonteil, E., Barré, H. & Meissner, G. 1994a Effects of palmitoyl carnitine and related metabolites on the avian Ca (2+)-ATPase and Ca²⁺ release channel. *The Journal of Physiology* **479**, 29.
- Dumonteil, E., Barré, H., Rouanet, J., Diarra, M. & Bouvier, J. 1994b Dual core and shell temperature regulation during sea acclimatization in Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **266**, 1319.
- Duret, L., Perrière, G. & Gouy, M. 1999 HOVERGEN: database and software for comparative analysis of homologous vertebrate genes. *Bioinformatics Databases and Systems*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 13–29.
- Duteil, D., Chambon, C., Ali, F., Malivindi, R., Zoll, J. & Kato, S. 2010 The Transcriptional Coregulators TIF2 and SRC-1 Regulate Energy Homeostasis by Modulating Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscles. *Cell Metabolism* **12**, 496-508.

E

- Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J. C. & Brand, M. D. 2002 Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**, 96-99.
- Eckert, R., Randall, D., Burggren, W. & French, K. 1999 Physiologie animale: Bruxelles, De Boeck Université.
- Eddy, S. & Storey, K. 2008 Comparative molecular physiological genomics. Heterologous probing of cDNA arrays. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **410**, 81.
- Eichhorn, G., Groscolas, R., Le Glaunec, G., Parisel, C., Arnold, L., Medina, P. & Handrich, Y. 2011 Heterothermy in growing king penguins. *Nature Communications* **2**, 435.
- Emboss. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>
- Erbrech, A. 2011 Maturation morpho-fonctionnelle de l'appareil locomoteur chez le poussin de manchot Royal. Strasbourg: Université de Strasbourg.
- Erbrech, A., Robin, J. P., Guérin, N., Groscolas, R., Gilbert, C. & Martrette, J. M. 2011 Differential muscular myosin heavy chain expression of the pectoral and pelvic girdles during early growth in the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) chick. *The Journal of Experimental Biology* **214**, 1829.

F

- Favier, A. 2003 Le stress oxydant. *l'actualité chimique*, 108.
- Finch, C. E. & Austad, S. N. 2010 Blind cave salamanders age very slowly: A new member of Methuselah's Bestiary. *BioEssays*.
- Finkel, T. & Holbrook, N. J. 2000 Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *NATURE-LONDON-*, 239-247.

- Flohe, L. 1984 Superoxide dismutase assays. *Methods in enzymology* **105**, 93-104.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G. 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* **226**, 497-509.
- Forcada, J., Trathan, P. N. & Murphy, E. J. 2008 Life history buffering in Antarctic mammals and birds against changing patterns of climate and environmental variation. *Global Change Biology* **14**, 2473-2488.
- Freyssenet, D. 2007 Energy sensing and regulation of gene expression in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* **102**, 529.
- Froget, G., Butler, P., Woakes, A., Fahlman, A., Kuntz, G., Le Maho, Y. & Handrich, Y. 2004 Heart rate and energetics of free-ranging king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *Journal of Experimental Biology* **207**, 3917.
- Froget, G., Handrich, Y., Le Maho, Y., Rouanet, J.L., Woakes, A.J. & Butler, P.J. 2002 The heart rate/oxygen consumption relationship during cold exposure of the king penguin : a comparison with that during exercise. *Journal of Experimental Biology* **205**, 2511-2517.

G

- Gavazza, M., Marmunti, M., Montalti, D. & Gutiérrez, A. M. 2008 Liver and heart mitochondria obtained from Adélie penguin (*Pygoscelis adeliae*) offers high resistance to lipid peroxidation. *Acta Biologica Hungarica* **59**, 185-194.
- Gilad, Y., Rifkin, S. A., Bertone, P., Gerstein, M. & White, K. P. 2005 Multi-species microarrays reveal the effect of sequence divergence on gene expression profiles. *Genome research* **15**, 674.
- Gilbert, C., Blanc, S., Le Maho, Y. & Ancel, A. 2008 Energy saving processes in huddling emperor penguins: from experiments to theory. *Journal of Experimental Biology* **211**, 1.
- Goglia, F. & Skulachev, V. P. 2003 A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *The FASEB Journal* **17**, 1585.
- Golet, G. H., Kuletz, K. J., Roby, D. D. & Irons, D. B. 2000 Adult prey choice affects chick growth and reproductive success in pigeon guillemots. *The Auk* **117**, 82-91.
- Grant, S., Antarctic, C., WWF-Australia & Peregrine. 2006 *Bioregionalisation of the Southern Ocean: Report of the Experts Workshop (Hobart, September 2006)*: WWF-Australia Head Office.
- Green, J., Boyd, I., Woakes, A., Green, C. & Butler, P. 2005 Do seasonal changes in metabolic rate facilitate changes in diving behaviour? *Journal of Experimental Biology* **208**, 2581.
- Grigoryev, D., Ma, S. F., Simon, B., Irizarry, R., Ye, S. & Garcia, J. 2005 In vitro identification and in silico utilization of interspecies sequence similarities using GeneChip® technology. *BMC Genomics* **6**, 62.
- Groscolas, R. 1988 The use of body mass loss to estimate metabolic rate in fasting sea birds : A critical examination based on emperor penguins (*Aptenodytes forsteri*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **90A**, 361-366
- Guglielmo, C. 2010 Move that fatty acid : fuel selection and transport in migratory birds and bats. *Integrative and Comparative Biology* **50**, 336-345
- Guglielmo, C., Haunerland, N., Hochachka, P. & Williams, T. 2002 Seasonal dynamics of flight muscle fatty acid binding protein and catabolic enzymes in a migratory shorebird. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **282**, R1405.

H

- Halevy, O., Hodik, V. & Mett, A. 1996 The effects of growth hormone on avian skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. *General and comparative endocrinology* **101**, 43-52.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. 1999 Antioxidant defences. *Free radicals in biology and medicine* **220**.
- Haman, F., Peronnet, F., Kenny, G., Massicotte, D., Lavoie, C., Scott, C. & Weber, J. 2002 Effect of cold exposure on fuel utilization in humans: plasma glucose, muscle glycogen, and lipids. *Journal of Applied Physiology* **93**, 77.
- Hammond, J. P., Broadley, M. R., Craigon, D. J., Higgins, J., Emmerson, Z. F., Townsend, H. J., White, P. J. & May, S. T. 2005 Using genomic DNA-based probe-selection to improve the sensitivity of high-density oligonucleotide arrays when applied to heterologous species. *Plant Methods* **1**, 10.
- Handrich, Y., Bevan, R., Charrassin, J., Butler, P., Ptz, K., Woakes, A., Lage, J. & Le Maho, Y. 1997 Hypothermia in foraging king penguins. *Nature* **388**, 64-67.
- Hanuise, N., Bost, C. A., Huin, W., Auber, A., Halsey, L. G. & Handrich, Y. 2010 Measuring foraging activity in a deep-diving bird: comparing wiggles, oesophageal temperatures and beak-opening angles as proxies of feeding. *Journal of Experimental Biology* **213**, 3874.
- Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A. & Hudson, E. R. 2003 Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS letters* **546**, 113-120.
- Harman, D. 1956 Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* **11**, 298.
- Harvey, S. 1983 Neuroendocrine control of growth hormone secretion in birds. *Nistico, G and Bolis, L, Editors*, 207-237.
- Heath, R. & Randall, R. 1985 Growth of Jackass Penguin chicks (*Spheniscus demersus*) hand reared on different diets. *Journal of Zoology* **205**, 91-105.
- Hermes-Lima, M. & Zenteno-Savín, T. 2002 Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **133**, 537-556.
- Hittel, D. & Storey, K. B. 2001 Differential expression of adipose-and heart-type fatty acid binding proteins1 in hibernating ground squirrels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* **1522**, 238-243.
- Hohtola, E. 2004 Shivering thermogenesis in birds and mammals.
- Hohtola, E. & Visser, G. H. 1998 Development of locomotion and endothermy in altricial and precocial birds. *Avian growth and development: evolution within the Altricial-Precocial spectrum*, 157-173.
- Holloszy, J. O., Smith, E., Vining, M. & Adams, S. 1985 Effect of voluntary exercise on longevity of rats. *Journal of Applied Physiology* **59**, 826.
- Holman, R. T. 1954 Autoxidation of fats and related substances. *Progress in the chemistry of fats and other lipids* **2**, 51-98.
- Hörak, P. & Cohen, A. 2010 How to measure oxidative stress in an ecological context: methodological and statistical issues. *Functional Ecology*.
- Hulbert, A. 2008 Explaining longevity of different animals: is membrane fatty acid composition the missing link? *Age* **30**, 89-97.
- Hulbert, A., Pamplona, R., Buffenstein, R. & Buttemer, W. 2007 Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological Reviews* **87**, 1175.

I, J

- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. & Speed, T. P. 2003 Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249.
- Irizarry, R. A., Warren, D., Spencer, F., Kim, I. F., Biswal, S., Frank, B. C., Gabrielson, E., Garcia, J. G. N., Geoghegan, J. & Germino, G. 2005 Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nature methods* **2**, 345-350.
- Jenni-Eiermann, S., Jenni, L., Kvist, A., Lindstrom, A., Piersma, T. & Visser, G. 2002 Fuel use and metabolic response to endurance exercise: a wind tunnel study of a long-distance migrant shorebird. *Journal of Experimental Biology* **205**, 2453-2460.
- Ji, W., Zhou, W., Gregg, K., Yu, N. & Davis, S. 2004 A method for cross-species gene expression analysis with high-density oligonucleotide arrays. *Nucleic acids research* **32**, e93.
- Joubert, R. 2009 Rôles et régulations de la protéine découplante aviaire dans le métabolisme mitochondrial de l'oiseau: Université François Rabelais de Tours.
- Jouventin, P., Cuthbert, R. & Ottvall, R. 2006 Genetic isolation and divergence in sexual traits: evidence for the northern rockhopper penguin *Eudyptes moseleyi* being a sibling species. *Molecular Ecology* **15**, 3413-3423.
- Jouventin, P., Le Maho, Y. & Mougin, J. 1980 Les Manchots. *Pour la Science* **30**, 79-91.

K

- Kalmar, B. & Greensmith, L. 2009 Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced drug delivery reviews* **61**, 310-318.
- Keime, C. 2006 Etude de l'autorenouvellement cellulaire par des approches de transcriptomique et de transcriptomique comparative: Université Claude Bernard Lyon 1.
- Kenyon, C. J. 2010 The genetics of ageing. *Nature* **464**, 504-512.
- Khaitovich, P., Weiss, G., Lachmann, M., Hellmann, I., Enard, W., Muetzel, B., Wirkner, U., Ansorge, W. & Pääbo, S. 2004 A neutral model of transcriptome evolution. *PLoS biology* **2**, e132.
- Kleiber, M. & Dougherty, J. 1934 The influence of environmental temperature on the utilization of food energy in baby chicks. *The Journal of General Physiology* **17**, 701.
- Kooyman, G., Cherel, Y., Le Maho, Y., Croxall, J., Thorson, P., Ridoux, V. & Kooyman, C. 1992 Diving behavior and energetics during foraging cycles in king penguins. *Ecological Monographs* **62**, 143-163.
- Kooyman, G., Croxall, J.P. & Costa, D.P. 1982 Diving depths and energy requirements of king penguins. *Science* **217**, 726-727
- Kooyman, G., Gentry, R., Bergman, W. & Hammel, H. 1976 Heat loss in penguins during immersion and compression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **54**, 75-80.
- Kooyman, G. L. 1989 *Diverse divers: physiology and behavior*: Springer-Verlag Berlin.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. & Starkov, A. A. 1997 High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letter* **416**, 15-8
- Kowald, A. 2001 The mitochondrial theory of aging. *Neurosignals* **10**, 162-175.

- Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F. & Vercesi, A. E. 2009 Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* **47**, 333-343.
- Kühn, E. R., Vleurick, L., Edery, M., Decuypere, E. & Darras, V. M. 2002 Internalization of the chicken growth hormone receptor complex and its effect on biological functions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **132**, 299-308.
- Kültz, D. 2005 Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*. **67**, 225-257.

L

- Lack, D. L. 1968 *Ecological adaptations for breeding in birds*: Methuen.
- Le Bohec, C., Gauthier Clerc, M., Grémillet, D., Pradel, R., Bechet, A., Gendner, J. P. & Maho, Y. 2007 Population dynamics in a long lived seabird: I. Impact of breeding activity on survival and breeding probability in unbanded king penguins. *Journal of Animal Ecology* **76**, 1149-1160.
- Le Maho, Y. 1981 Adaptations métaboliques au jeûne prolongé : les manchots antarctiques et l'oie. Thèse. Université Claude Bernard Lyon 1.
- Le Maho, Y., Delclitte, P. & Chatonnet, J. 1976 Thermoregulation in fasting emperor penguins under natural conditions. *American Journal of Physiology--Legacy Content* **231**, 913.
- Lee, I. 1995 Exercise intensity and longevity in men. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **273**, 1179.
- Lescroël, A., Dugger, K. M., Ballard, G. & Ainley, D. G. 2009 Effects of individual quality, reproductive success and environmental variability on survival of a long lived seabird. *Journal of Animal Ecology* **78**, 798-806.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C. Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L. F., Puigserver, P., Isotani, E. & Olson, E. N. 2002 Transcriptional co-activator PGC-1 drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797-801.
- Lindstedt, S. L. & Calder, W. A. 1976 Body size and longevity in birds. *Condor* **78**, 91-94.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P. A., Gingeras, T. R. & Lockhart, D. J. 1999 High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature genetics* **21**, 20-24.
- Lowry, O. & Passonneau, J. 1972 *A flexible system of enzymatic analysis*: Academic Press, New York.

M, N, O

- Ma, Y., Freitag, P., Zhou, J., Brüne, B., Frede, S. & Frandrey, J. 2004 Thyroid hormone induces erythropoietin gene expression through augmented accumulation of hypoxia-inducible factor-1. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **287**, R600-R607.
- Mackintosh, N. 1960 The pattern of distribution of the Antarctic fauna. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **152**, 624-631.
- Maillet, D. & Weber, J. M. 2007 Relationship between n-3 PUFA content and energy metabolism in the flight muscles of a migrating shorebird: evidence for natural doping. *Journal of Experimental Biology* **210**, 413.

- Marion, R. 1995 Guide des manchots. *Delachaux et Niestlé*.
- Martin, T. E. 1987 Food as a limit on breeding birds: a life-history perspective. *Annual review of ecology and systematics*, 453-487.
- Masoro, E. J. 2006 Caloric restriction and aging: controversial issues. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **61**, 14.
- McFarlan, J. T., Bonen, A. & Guglielmo, C. G. 2009 Seasonal upregulation of fatty acid transporters in flight muscles of migratory white-throated sparrows (*Zonotrichia albicollis*). *Journal of Experimental Biology* **212**, 2934-40.
- Meir, J. U. & Ponganis, P. J. 2009 High-affinity hemoglobin and blood oxygen saturation in diving emperor penguins. *Journal of Experimental Biology* **212**, 3330.
- Meir, J. U., Stockard, T. K., Williams, C. L., Ponganis, K. V. & Ponganis, P. J. 2008 Heart rate regulation and extreme bradycardia in diving emperor penguins. *Journal of Experimental Biology* **211**, 1169.
- Meyers, R. A. 1992 The morphological basis of folded wing posture in the American Kestrel, *Falco sparverius*. *The Anatomical Record* **232**, 493-498.
- Mitchell, P. 1961 Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148.
- Miwa, S. & Brand, M. 2003 Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochemical Society Transactions* **31**, 1300-1301.
- Moe, B., Brunvoll, S., Mork, D., Brobakk, T. E. & Bech, C. 2004 Developmental plasticity of physiology and morphology in diet-restricted European shag nestlings (*Phalacrocorax aristotelis*). *Journal of Experimental Biology* **207**, 4067.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M. & Snyder, M. 2008 The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* **320**, 1344.
- Nagy, K.A., Kooyman, G.L. & Ponganis, P.J. 2001 Energetic cost of foraging in free-diving emperor penguins. *Physiological and Biochemical Zoology* **74**, 541-547
- Omnibus, G. E. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE17725>
- Otto, T. & Fandrey, J. 2008 Thyroid hormone induces hypoxia-inducible factor 1 α gene expression through thyroid hormone receptor β /retinoid X receptor α -dependent activation of hepatic leukemia factor. *Endocrinology* **149**, 2241-2250.

P

- Pamplona, R. & Costantini, D. 2011 Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **301**, R843-R863.
- Pan, Y. 2011 Mitochondria, reactive oxygen species, and chronological aging: A message from yeast. *Experimental Gerontology*.
- Parker, G. & George, J. 1975 Glycogen utilization by the white fibres in the pigeon pectoralis as main energy process during shivering thermogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **50**, 433-434, IN1-IN4, 435-437.
- Patarnello, T., Bargelloni, L., Varotto, V. & Battaglia, B. 1996 Krill evolution and the Antarctic ocean currents: evidence of vicariant speciation as inferred by molecular data. *Marine Biology* **126**, 603-608.

- Pelsers, M. M. A. L., Butler, P. J., Bishop, C. M. & Glatz, J. F. C. 1999 Fatty acid binding protein in heart and skeletal muscles of the migratory barnacle goose throughout development. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **276**, R637.
- Pepke, S., Wold, B. & Mortazavi, A. 2009 Computation for ChIP-seq and RNA-seq studies. *Nature methods* **6**, S22-S32.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. 2002 Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* **30**, e36.
- Ponganis, P. & Kooyman, G. 2000 Diving physiology of birds: a history of studies on polar species. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* **126**, 143-151.
- Ponganis, P., Kooyman, G., Starke, L., Kooyman, C. & Kooyman, T. 1997 Post-dive blood lactate concentrations in emperor penguins, *Aptenodytes forsteri*. *Journal of Experimental Biology* **200**, 1623.
- Ponganis, P., Stockard, T., Meir, J., Williams, C., Ponganis, K., Van Dam, R. & Howard, R. 2007 Returning on empty: extreme blood O₂ depletion underlies dive capacity of emperor penguins. *Journal of Experimental Biology* **210**, 4279.
- Prévost, J. 1961 *Écologie du manchot empereur Aptenodytes forsteri Gray*: Hermann.
- Pütz, K. 2002 Spatial and temporal variability in the foraging areas of breeding King Penguins. *The Condor* **104**, 528-538.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M. & Spiegelman, B. M. 1998 A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839.

R

- Raccurt, M., Baudimont, F., Tirard, J., Rey, B., Moureaux, E., Géloën, A. & Duchamp, C. 2008 Growing in Antarctica, a challenge for white adipose tissue development in Adélie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **295**, R1671.
- Raclot, T., Groscolas, R. & Cherel, Y. 1998 Fatty acid evidence for the importance of myctophid fishes in the diet of king penguins, *Aptenodytes patagonicus*. *Marine Biology* **132**, 523-533.
- Raimbault, S., Dridi, S., Denjean, F., Lachuer, J., Couplan, E., Bouillaud, F., Bordas, A., Duchamp, C., Taouis, M. & Ricquier, D. 2001 An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochemical Journal* **353**, 441.
- Renn, S., Aubin-Horth, N. & Hofmann, H. 2004 Biologically meaningful expression profiling across species using heterologous hybridization to a cDNA microarray. *BMC Genomics* **5**, 42.
- Rey, B. 2008 Implication de la protéine découplante aviaire dans l'ontogenèse des mécanismes thermogènes et/ou anti-radicalaires : Etude expérimentale sur le manchot Royal et le caneton de Barbarie. Thèse. Université Claude Bernard Lyon 1.
- Rey, B., Halsey, L., Dolmazon, V., Rouanet, J., Roussel, D., Handrich, Y., Butler, P. & Duchamp, C. 2008 Long-term fasting decreases mitochondrial avian UCP-mediated oxygen consumption in hypometabolic king penguins. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **295**, R92.
- Rey, B., Roussel, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rouanet, J., Desplanches, D., Sibille, B., Servais, S. & Duchamp, C. 2010a Up-regulation of avian uncoupling protein in cold-acclimated and

- hyperthyroid ducklings prevents reactive oxygen species production by skeletal muscle mitochondria. *BMC physiology* **10**, 5.
- Rey, B., Roussel, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rouanet, J. L., Desplanches, D., Sibille, B., Servais, S. & Duchamp, C. 2010b Up-regulation of avian uncoupling protein in cold-acclimated and hyperthyroid ducklings prevents reactive oxygen species production by skeletal muscle mitochondria. *BMC physiology* **10**, 5.
- Rey, B., Roussel, D., Teulier, L., Eyenga, P., Dégletagne, C., Belouze, M. & Duchamp, C. 2011 Functional argument for the existence of an avian nitric oxide synthase in muscle mitochondria: Effect of cold acclimation. *FEBS letters*.
- Reymond, N. 2004 Bioinformatique des puces à ADN et application à l'analyse du transcriptome de *Buchnera aphidicola*: Ecole Normale Supérieure de Lyon.
- Ricklefs, R. E. 1979 Adaptation, constraint, and compromise in avian postnatal development. *Biological Reviews* **54**, 269-290.
- Ristow, M. & Schmeisser, S. 2011 Extending lifespan by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Roberts, T., Weber, J., Hoppeler, H., Weibel, E. & Taylor, C. 1996 Design of the oxygen and substrate pathways. II. Defining the upper limits of carbohydrate and fat oxidation. *Journal of Experimental Biology* **199**, 1651-1658.
- Rosser, B., Waldbillig, D., Wick, M. & Bandman, E. 1996 Heterogeneity of myosin heavy-chain expression in fast-twitch fiber types of mature avian pectoralis muscle. *Biochemistry and cell biology* **74**, 715-728.
- Rosser, B. W. C., Waldbillig, D. M., Wick, M. & Bandman, E. 1994 Muscle fiber types in the pectoralis of the white pelican, a soaring bird. *Acta Zoologica* **75**, 329-336.
- Roussel, D., Chainier, F., Rouanet, J. L. & Barré, H. 2000 Increase in the adenine nucleotide translocase content of duckling subsarcolemmal mitochondria during cold acclimation. *FEBS letters* **477**, 141-144.
- Roussel, D., Rouanet, J. L., Duchamp, C. & Barré, H. 1998 Effects of cold acclimation and palmitate on energy coupling in duckling skeletal muscle mitochondria. *FEBS letters* **439**, 258-262.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. 2000 Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* **132**, 365-386.

S

- Sachdev, S. & Davies, K. J. A. 2008 Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 215-223.
- Salihoglu, B., Fraser, W. R. & Hofmann, E. E. 2001 Factors affecting fledging weight of Adélie penguin (*Pygoscelis adeliae*) chicks: a modeling study. *Polar Biology* **24**, 328-337.
- Sapin-Jaloustre, J. 1960 *Ecologie du manchot Adélie*: Hermann.
- Schekkerman, H., Tulp, I., Piersma, T. & Visser, G. H. 2003 Mechanisms promoting higher growth rate in arctic than in temperate shorebirds. *Oecologia* **134**, 332-342.
- Schew, W. A. & Ricklefs, R. E. 1998 Developmental plasticity. *Avian growth and development: evolution within the altricial-precocial spectrum*, 288-304.
- Schmidt, A. 2006 Etude de la thermorégulation en mer chez le manchot Royal: mécanismes et conséquences énergétiques. Thèse. Université Louis Pasteur de Strasbourg.

- Schmidt, A., Alard, F. & Handrich, Y. 2006 Changes in body temperature in king penguins at sea: the result of fine adjustments in peripheral heat loss? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **291**, R608-18.
- Schmutz, S., Däpp, C., Wittwer, M., Vogt, M., Hoppeler, H. & Flück, M. 2006 Endurance training modulates the muscular transcriptome response to acute exercise. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **451**, 678-687.
- Scholander, P., Hock, R., Walters, V., Johnson, F. & Irving, L. 1950 Heat regulation in some arctic and tropical mammals and birds. *The Biological Bulletin* **99**, 237.
- Schonfeld, P. 1990 Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria? *FEBS letters* **264**, 246-248.
- Scott, G. R. 2011 Elevated performance: the unique physiology of birds that fly at high altitudes. *The Journal of Experimental Biology* **214**, 2455-2462.
- Scott, G. R., Egginton, S., Richards, J. G. & Milsom, W. K. 2009a Evolution of muscle phenotype for extreme high altitude flight in the bar-headed goose. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **276**, 3645.
- Scott, G. R., Richards, J. G. & Milsom, W. K. 2009b Control of respiration in flight muscle from the high-altitude bar-headed goose and low-altitude birds. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **297**, R1066.
- Servais, S. 2004 Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effet de l'âge et d'une supplémentation en Oméga-3: Université de Lyon.
- Shaffer, S. A., Tremblay, Y., Weimerskirch, H., Scott, D., Thompson, D. R., Sagar, P. M., Moller, H., Taylor, G. A., Foley, D. G. & Block, B. A. 2006 Migratory shearwaters integrate oceanic resources across the Pacific Ocean in an endless summer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 12799.
- Shendure, J. & Ji, H. 2008 Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* **26**, 1135-1145.
- Shi, L., Reid, L., Jones, W., Shippy, R., Warrington, J., Baker, S., Collins, P., De Longueville, F., Kawasaki, E. & Lee, K. 2006a The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nature biotechnology* **24**, 1151-1161.
- Shi, L., Reid, L. H., Jones, W. D., Shippy, R., Warrington, J. A., Baker, S. C., Collins, P. J., De Longueville, F., Kawasaki, E. S. & Lee, K. Y. 2006b The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nature biotechnology* **24**, 1151-1161.
- Skulachev, V. & Maslov, S. 1960 The role of nonphosphorylating oxidation in temperature regulation. *Biochemistry* **25**, 1058-1064.
- Smyth, G. 2004 Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* **3**, 1027.
- Sonna, L. A., Fujita, J., Gaffin, S. L. & Lilly, C. M. 2002 Invited review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *Journal of Applied Physiology* **92**, 1725.
- Speakman, J. R. & Selman, C. 2011 The free radical damage theory: Accumulating evidence against a simple link of oxidative stress to ageing and lifespan. *BioEssays*.
- St-Pierre, J., Buckingham, J., Roebuck, S. & Brand, M. 2002 Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 44784.
- Stahel, C. & Nicol, S. 1988 Ventilation and oxygen extraction in the little penguin (*Eudyptula minor*) at different temperatures in air and water. *Respiration physiology* **71**, 387-398.
- Steinberg, G. R. S. G. R. 2009 Role of the AMP-activated protein kinase in regulating fatty acid metabolism during exercise. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* **34**, 315-322.

- Stockard, K., Heil, J., Meir, J., Sato, K., KV, P. & PJ, P. 2005 Air sac PO 2 and oxygen depletion during dives of emperor penguins. *Journal of Experimental Biology* **208**, 2973–2980.
- Storey, K. B. 1996 Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **29**, 1715-1733.
- Suarez, R. K. & Gass, C. L. 2002 Hummingbird foraging and the relation between bioenergetics and behaviour. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* **133**, 335-343.
- Suzuki, A., Tsuchiya, T., Ohwada, S. & Tamate, H. 1985 Distribution of myofiber types in thigh muscles of chickens. *Journal of Morphology* **185**, 145-154.

T

- Talbot, D. A., Duchamp, C., Rey, B., Hanuise, N., Rouanet, J. L., Sibille, B. & Brand, M. D. 2004 Uncoupling protein and ATP/ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins. *Journal of Physiology* **558**, 123-35.
- Talbot, D. A., Hanuise, N., Rey, B., Rouanet, J. L., Duchamp, C. & Brand, M. D. 2003 Superoxide activates a GDP-sensitive proton conductance in skeletal muscle mitochondria from king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *Biochemical and biophysical research communications* **312**, 983-988.
- Taleux, N., Guigas, B., Dubouchaud, H., Moreno, M., Weitzel, J., Goglia, F., Favier, R. & Leverve, X. 2009 High expression of thyroid hormone receptors and mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the liver is linked to enhanced fatty acid oxidation in Lou/C, a rat strain resistant to obesity. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 4308.
- Tappel, A. 1978 Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods in enzymology* **52**, 506-513.
- Taylor, J. R. E. 1985 Ontogeny of thermoregulation and energy metabolism in pygoscelid penguin chicks. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **155**, 615-627.
- Teulier, L. 2010 Adaptations métaboliques du caneton de Barbarie (*Cairina moschata*) et du manchot Royal (*Aptenodytes patagonicus*) en réponse à un stress chronique froid. Thèse. Université Claude Bernard Lyon 1.
- Teulier, L., Rouanet, J. L., Letexier, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rey, B., Duchamp, C. & Roussel, D. 2010 Cold-acclimation-induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency. *Journal of Experimental Biology* **213**, 2476-82.
- Thil, M. A., Speake, B. & Groscolas, R. 2003 Changes in tissue fatty acid composition during the first month of growth of the king penguin chick. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **173**, 199-206.
- Tidyman, W. E., Moore, L. A. & Bandman, E. 1997 Expression of fast myosin heavy chain transcripts in developing and dystrophic chicken skeletal muscle. *Developmental dynamics* **208**, 491-504.
- Toyomizu, M., Ueda, M., Sato, S., Seki, Y., Sato, K. & Akiba, Y. 2002 Cold-induced mitochondrial uncoupling and expression of chicken UCP and ANT mRNA in chicken skeletal muscle. *FEBS letters* **529**, 313-318.
- Trawa, G. 1970 Note préliminaire sur la vascularisation des membres des Spheniscides de terre Adélie. *Oiseau RFO* **40**, 142–156.

Turner, J., Bindschadler, R., Convey, P., Di Prisco, G., Fahrbach, E., Gutt, J., Hodgson, D., Mayewski, P. & Summerhayes, C. 2009 Antarctic climate change and the environment. *SCAR & Scott Polar Research Institute, Cambridge*, 526pp **1**.

U, V

- Ueda, M., Watanabe, K., Sato, K., Akiba, Y. & Toyomizu, M. 2005 Possible role for avPGC-1 [alpha] in the control of expression of fiber type, along with avUCP and avANT mRNAs in the skeletal muscles of cold-exposed chickens. *FEBS letters* **579**, 11-17.
- Vaillancourt, E., Haman, F. & Weber, J. 2009 Fuel selection in Wistar rats exposed to cold: shivering thermogenesis diverts fatty acids from re-esterification to oxidation. *The Journal of Physiology* **587**, 4349.
- Vaillancourt, E., Prud'Homme, S., Haman, F., Guglielmo, C. & Weber, J. 2005 Energetics of a long-distance migrant shorebird (*Philomachus pugnax*) during cold exposure and running. *Journal of Experimental Biology* **208**, 317-325.
- Vaisman, N., Kaysar, N., Zaruk-Adasha, Y., Pelled, D., Brichon, G., Zwingelstein, G. & Bodennec, J. 2008 Correlation between changes in blood fatty acid composition and visual sustained attention performance in children with inattention: effect of dietary n-3 fatty acids containing phospholipids. *The American journal of clinical nutrition* **87**, 1170.
- Van Dam, R., Ponganis, P., Ponganis, K., Levenson, D. & Marshall, G. 2002 Stroke frequencies of emperor penguins diving under sea ice. *Journal of Experimental Biology* **205**, 3769.
- Van Tuinen, M. & Hedges, S. B. 2001 Calibration of avian molecular clocks. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 206.
- Vázquez-Medina, J. P., Zenteno-Savín, T. & Elsner, R. 2006 Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **142**, 198-204.
- Vina, J., Borrás, C. & Miquel, J. 2007 Theories of ageing. *IUBMB life* **59**, 249-254.
- von Schalburg, K., Rise, M., Cooper, G., Brown, G., Gibbs, A. R., Nelson, C., Davidson, W. & Koop, B. 2005 Fish and chips: various methodologies demonstrate utility of a 16,006-gene salmonid microarray. *BMC Genomics* **6**, 126.

W, Z

- Waddington, C. H. 1942 Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* **150**, 563.
- Walter, I., Hegarty, B. & Seebacher, F. 2010 AMP-activated protein kinase controls metabolism and heat production during embryonic development in birds. *Journal of Experimental Biology* **213**, 3167.
- Wang, H. B., Li, H., Wang, Q. G., Zhang, X. Y., Wang, S. Z., Wang, Y. X. & Wang, X. P. 2007 Profiling of chicken adipose tissue gene expression by genome array. *BMC Genomics* **8**, 193.
- Watanuki, Y., Niizuma, Y., Geir, W. G., Sato, K. & Naito, Y. 2003 Stroke and glide of wing-propelled divers: deep diving seabirds adjust surge frequency to buoyancy change with depth. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **270**, 483.

- Weber, J. 2009 The physiology of long-distance migration: extending the limits of endurance metabolism. *Journal of Experimental Biology* **212**, 593-7.
- Weber, J. M. 2011 Metabolic fuels: regulating fluxes to select mix. *Journal of Experimental Biology* **214**, 286.
- Williams, C. L., Meir, J. U. & Ponganis, P. J. 2011 What triggers the aerobic dive limit? Patterns of muscle oxygen depletion during dives of emperor penguins. *Journal of Experimental Biology* **214**, 1802.
- Williams, J. B. & Tieleman, B. I. 2005 Physiological adaptation in desert birds. *Bioscience* **55**, 416-425.
- Wilson, R. & Culik, B. 1991 The cost of a hot meal: facultative specific dynamic action may ensure temperature homeostasis in post-ingestive endotherms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **100**, 151-154.
- Wilson, R. P., Hustler, K., Ryan, P. G., Burger, A. E. & Noldeke, E. C. 1992 Diving birds in cold water: do Archimedes and Boyle determine energetic costs? *American Naturalist*, 179-200.
- Woehler, E. J. 1993 The distribution and abundance of Antarctic and Subantarctic penguins. *SCAR*.
- Woehler, E. J. 2001 A statistical assessment of the status and trends of Antarctic and Subantarctic seabirds. *SCAR*.
- Woehler, E. J., Poncet, S. & Research, I. C. o. S. U. S. C. o. A. 1993 The distribution and abundance of Antarctic and Subantarctic penguins. *Scientific Committee on Antarctic Research (SCAR)*.
- Wunsch, C. 2002 What is the thermohaline circulation? *Science* **298**, 1179.
- Zenteno-Savin, T., St Leger, J. & Ponganis, P. 2010 Hypoxemic and ischemic tolerance in emperor penguins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **152**, 18-23.
- Zhu, P., Tan, M. J., Huang, R. L., Tan, C. K., Chong, H. C., Pal, M., Lam, C. R. I., Boukamp, P., Pan, J. Y. & Tan, S. H. 2011 Angiopoietin-like 4 Protein Elevates the Prosurvival Intracellular O₂:-: H₂O₂ Ratio and Confers Anoikis Resistance to Tumors. *Cancer Cell* **19**, 401-415.

Titre : Acclimatations des manchots aux contraintes de l'environnement polaire : Approches transcriptomique et intégrative sur le manchot Royal (*Aptenodytes patagonicus*) et le manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*)

Résumé : Les manchots ont colonisé les écosystèmes froids en développant des mécanismes physiologiques dont la compréhension est encore imparfaite. Ce travail de thèse a pour but de décrypter, à différents niveaux d'intégration, les réponses développées par ces oiseaux pour survivre aux contraintes des milieux polaires lors de 2 phases cruciales de leur cycle de vie: le passage de la vie terrestre à la vie marine du manchot Royal immature et la croissance rapide du poussin manchot Adélie.

Pour explorer les variations d'expression génique musculaire chez le manchot Royal, nous avons utilisé des puces à ADN Affymetrix de poulet, nécessitant le développement et la validation d'un algorithme d'analyse des puces dans le cadre d'une hybridation hétérologue. Cette approche moléculaire, associée à des approches intégratives, a révélé une modification coordonnée du métabolisme énergétique en faveur d'une utilisation préférentielle des substrats lipidiques pour subvenir aux forts besoins énergétiques induit par sa vie marine. Nos résultats ont aussi révélé le développement d'une réponse antioxydante globale permettant au manchot de se protéger contre la production de ROS induite lors des phases de plongée en apnée longues et répétées.

Parallèlement, notre étude sur le poussin manchot Adélie a révélé la mise en place de mécanismes cellulaires et moléculaires soutenant une stratégie originale d'orientation séquentielle de son métabolisme vers la croissance puis vers la thermogenèse.

Ces 2 espèces de manchots sont capable de développer des réponses physiologiques complexes et coordonnées pour surmonter les contraintes de l'environnement polaire illustrant leur remarquable plasticité phénotypique.

Mots clés : Puces à ADN, Physiologie intégrative, Métabolisme énergétique, Stress oxydant, Croissance, Thermogenèse, Manchot Royal et manchot Adélie, Analyse du transcriptome.

Title : Penguin acclimatization to polar environmental constraints : a transcriptomic and integrative study in King (*Aptenodytes patagonicus*) and Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*).

Abstract : King penguins have successfully colonized cold ecosystems of the southern hemisphere by developing physiological mechanisms that are not well understood. The aim of this study was to investigate, at different integrative levels from the gene to the whole animal, the functional responses developed by penguins to overcome polar constraints. We focused on acclimatization mechanisms enabling the first departure to sea of king penguin immatures and the rapid growth of Adélie penguin chicks.

To explore differentially expressed genes in pectoralis muscle during penguin's first sea acclimatization, we used Affymetrix microarrays design for chicken. We first set up and validated a new method to analyze heterologous hybridization transcriptomic profiles. We highlighted a selective shift in metabolic pathways favoring the use of lipids as fuel to sustain highly energetic needs imposed by marine life-style. Our results revealed a development of a global antioxidant response, potential consequences of penguin marine life-style that imposes repeated dives under apnea.

Secondly, our integrative study on Adélie penguin's chick revealed the development of molecular and cellular mechanisms which sustain an original strategy by first allocating most of the energy to growth and then promoting thermogenic processes.

Our results showed that both king and Adélie penguins develop complex and coordinated physiological responses to energetic constraints highlighting their high phenotypic plasticity.

Keywords : Microarray, integrative physiology, metabolism, oxydative stress, growth, thermogenesis, King penguin and Adélie penguin, transcriptomic analysis.

Adresse du laboratoire : UMR 5023 – LEHNA, Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés – Université Claude Bernard Lyon 1- CNRS - 43, boulevard du 11 novembre 1918, Bât Darwin C, 69622 Villeurbanne Cedex.